

CULTIVO DE ANTERAS DE FRESA *in vitro* Y OBSERVACIONES ULTRAESTRUCTURALES*

VÍCTOR M. VILLALOBOS A.

Rama de Genética, Colegio de Postgraduados,
Chapingo, Méx.

RESUMEN

Con el objeto de lograr la diferenciación de tejidos a partir de anteras de fresa, se inocularon en condiciones asépticas, anteras de los cultivares Hokowase y Donner, utilizando el medio de cultivo de Linsmaier y Skoog, adicionado con 30 g/l de sacarosa, 10 ppm de 6-BA (6-benciladamina), 1 ppm de ANA (ácido naftalenacético) y 8 g/l de agar. Después de 30 días de cultivo a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y en luz continua de aproximadamente 1500 lux, se indujo la diferenciación de 9 plantas y la formación de 639 callos de 2970 anteras inoculadas. Para un análisis más completo de las respuestas *in vitro*, se realizaron observaciones con los microscopios óptico, electrónico de transmisión y de barrido.

SUMMARY

In order to induce tissue differentiation from anthers of strawberry plants, anthers from plants of the Hokowase and Donner cultivars were inoculated on Linsmaier and Skoog medium under aseptic conditions, adding 30 g/l sucrose, 10 ppm 6-BA, 1 ppm NAA and 8 g/l agar. After 30 days in culture at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and under approximately 1500 lux of continuous light, the differentiation of 9 out of 2970 anthers were induced, to stems and leaves. Observations were made with optical microscopy, transmission and scanning electron microscopy to be able to make a more complete analysis of the responses *in vitro*.

INTRODUCCION

La necesidad de contar con plantas cada vez más eficientes en rendimiento, resistencia a enfermedades, precocidad y demás características agronómicas, ha propiciado el desarrollo de metodologías especializadas como el cultivo de anteras *in vitro*. Esta técnica ha permitido la obtención de plantas haploides a partir del desarrollo de las microsporas en tabaco (Linsmaier y Skoog, 1965), crisantemo (Iizuka *et al.*, 1973; Watanabe *et al.*, 1972), *Datura* (Guha y Maheshwari, 1964, 1966; Sopory y Maheshwari, 1976), maíz (Tsun-Wen *et al.*, 1975), trigo (Tsun-Wen *et al.*, 1973) y otras especies.

Al inicio de la década de los setentas, se describe por vez primera la utilización de esta metodología en la fresa, posiblemente justificada por la importancia econó-

* Parte del trabajo desarrollado en la Universidad de Nagoya, Japón en el año de 1976.

mica que reviste su explotación comercial y el tiempo que tarda el mejoramiento genético tradicional. La posibilidad de obtener plantas homocigóticas a través del desarrollo y diferenciación de las microsporas, ha sido una perspectiva que brinda un atractivo panorama para este tipo de estudios; sin embargo, no se han satisfecho completamente estos objetivos al carecer de información suficiente, respecto al comportamiento de las anteras de fresa *in vitro*.

Fowler *et al.* (1971) comunican por vez primera el cultivo de anteras de fresa, señalando la formación de callos en el cultivar Surecrop, al comparar cuatro diferentes estados de madurez de las anteras; los análisis al microscopio indicaron que dichos callos fueron originados en la región vascular de la antera y en algunos casos en el tapete. El mayor número de callos se observó en las anteras que provenían de las flores más jóvenes de los cuatro estados de desarrollo probados.

Nishi *et al.* (1974) lograron la diferenciación de plantas de fresa en dos cultivares a partir de anteras sometidas a 25°C y 12 horas de fotoperiodo a una intensidad lumínica de 3,000 lux, utilizando el medio de Linsmaier y Skoog (1965).

Rosati *et al.* (1975) determinaron las condiciones para la obtención de callos aproximadamente en un 70% al probar 9 diferentes cultivares y la diferenciación de plantas a partir de estos callos a los 70 días de cultivo; estos autores obtuvieron 46 plantas de cuatro diferentes cultivares. Todas las plantas tuvieron igual número cromosómico que las cultivadas, ya que se formaron de tejidos somáticos.

Angel* enfatiza la obtención de callos a partir de anteras de fresa, señalando que éstos se originaron del tejido epidérmico de la antera.

La poca información que se ha obtenido de los resultados experimentales acerca del comportamiento de las anteras de fresa, motivo la realización de esta investigación, cuya finalidad fue la de evaluar las condiciones de cultivo *in vitro* para anteras de fresa y estudiar el origen estructural de las callosidades obtenidas, para lo cual la utilización de la microscopía electrónica fue un auxiliar en la observación y estudio de algunas fases importantes de la organogénesis.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo de Anteras

Se seleccionaron botones florales de aproximadamente 3 mm de largo en los cultivares Hokowase y Donner crecidos en invernadero; fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de calcio al 4% durante 15 minutos. Las anteras en general fueron de 1 mm de largo, tamaño que estuvo correlacionado con el estado uninucleado de los granos de polen según observaciones previas. Fueron inoculadas 9 anteras en cada tubo de ensaye que contenía 8 ml de medio de cultivo Linsmaier y Skoog (1965), complementado con 30 g/l de sacarosa, 10 ppm de 6-BA, 1 ppm de ANA y 8 g/l de agar. El pH del medio de cultivo se

* Comunicación personal Ing. Arcelia Angel P., Ayudante de Investigación de la Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1977.

ajustó a 5.7-5.8, utilizando HCL y NaOH, IN. Un total de 2,970 anteras de ambos cultivares fueron inoculadas en un tiempo de tres meses y se mantuvieron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz continua de 1,500 lux aproximadamente.

2. *Microscopía Electrónica*

De las anteras cultivadas que evidenciaron cambios con respecto a las no cultivadas, se seleccionaron muestras para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU-12A) y el microscopio de barrido (Hitachi modelo HSE-S). Para las observaciones al microscopio de transmisión, los tejidos fueron fijados con OsO_4 (tetróxido de osmio) al 2% durante 9 h, deshidratados con una serie de etanol, tratados con óxido de propileno e incluidos con resina Spurr (1969). Las ultrasecciones se cortaron con navajas de cristal utilizando un ultramicrotomo (Sorvall MT-2) y se tiñeron con acetato de uranilo. Previo a la observación ultraestructural, los primeros cortes de cada material incluido, fueron pasados a un portaobjetos, teñidos con azul de metileno y observados con microscopio óptico para tener una visión general del material a observarse en el microscopio electrónico de transferencia. El plano de corte para todas las observaciones fue transversal. Para el microscopio de barrido el material se fijó con glutaral-dehído al 4% durante 4 h, utilizando un amortiguador de fosfato pH 7.3, 0.1 m y finalmente los tejidos fueron cubiertos con oro.

RESULTADOS

A los ocho días de inoculadas se observó que algunas anteras mostraron color claro y otras se ennegrecieron, independientemente del cultivar utilizado; las de color claro generalmente se encontraban "hinchadas" y las negras no mostraron cambio aparente. Cumplidos los 15 días de cultivo, las anteras negras fueron desechadas al no manifestarse ningún cambio.

El resto fue observado al estereomicroscopio a los 30 días apreciándose la ruptura de la epidermis y la emergencia de callosidades (Fig. 1A). A los 30 días después de la inoculación se cuantificó la formación de callos (Tabla I) y se apreció la diferenciación de tallos y primordios foliares, siendo observada en dos casos para el cultivar Hokowase y siete para Donner (Fig. 2).

Las anteras en condiciones de cultivo mostraron cambios morfológicos comparativamente con las no cultivadas (Fig. 1B). La división celular y la organogénesis ocurrieron alrededor del haz vascular (Fig. 1D). En observaciones ultraestructurales se advirtieron perfiles redondos en los espacios intercelulares y abundantes aparatos de Golgi y granos de almidón en el interior de las células somáticas en cultivo (Figs. 1E y F).

En estas investigaciones, los granos de polen observados en las anteras al momento de la inoculación se encontraron en estado uninucleado (Fig. 1C).

ajustó a 5.7-5.8, utilizando HCL y NaOH, IN. Un total de 2,970 anteras de ambos cultivares fueron inoculadas en un tiempo de tres meses y se mantuvieron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz continua de 1,500 lux aproximadamente.

2. *Microscopía Electrónica*

De las anteras cultivadas que evidenciaron cambios con respecto a las no cultivadas, se seleccionaron muestras para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU-12A) y el microscopio de barrido (Hitachi modelo HSE-S). Para las observaciones al microscopio de transmisión, los tejidos fueron fijados con OsO_4 (tetróxido de osmio) al 2% durante 9 h, deshidratados con una serie de etanol, tratados con óxido de propileno e incluidos con resina Spurr (1969). Las ultrasecciones se cortaron con navajas de cristal utilizando un ultramicrotomo (Sorvall MT-2) y se tiñeron con acetato de uranilo. Previo a la observación ultraestructural, los primeros cortes de cada material incluido, fueron pasados a un portaobjetos, teñidos con azul de metileno y observados con microscopio óptico para tener una visión general del material a observarse en el microscopio electrónico de transferencia. El plano de corte para todas las observaciones fue transversal. Para el microscopio de barrido el material se fijó con glutaral-dehído al 4% durante 4 h, utilizando un amortiguador de fosfato pH 7.3, 0.1 m y finalmente los tejidos fueron cubiertos con oro.

RESULTADOS

A los ocho días de inoculadas se observó que algunas anteras mostraron color claro y otras se ennegrecieron, independientemente del cultivar utilizado; las de color claro generalmente se encontraban "hinchadas" y las negras no mostraron cambio aparente. Cumplidos los 15 días de cultivo, las anteras negras fueron desechadas al no manifestarse ningún cambio.

El resto fue observado al estereomicroscopio a los 30 días apreciándose la ruptura de la epidermis y la emergencia de callosidades (Fig. 1A). A los 30 días después de la inoculación se cuantificó la formación de callos (Tabla I) y se apreció la diferenciación de tallos y primordios foliares, siendo observada en dos casos para el cultivar Hokowase y siete para Donner (Fig. 2).

Las anteras en condiciones de cultivo mostraron cambios morfológicos comparativamente con las no cultivadas (Fig. 1B). La división celular y la organogénesis ocurrieron alrededor del haz vascular (Fig. 1D). En observaciones ultraestructurales se advirtieron perfiles redondos en los espacios intercelulares y abundantes aparatos de Golgi y granos de almidón en el interior de las células somáticas en cultivo (Figs. 1E y F).

En estas investigaciones, los granos de polen observados en las anteras al momento de la inoculación se encontraron en estado uninucleado (Fig. 1C).

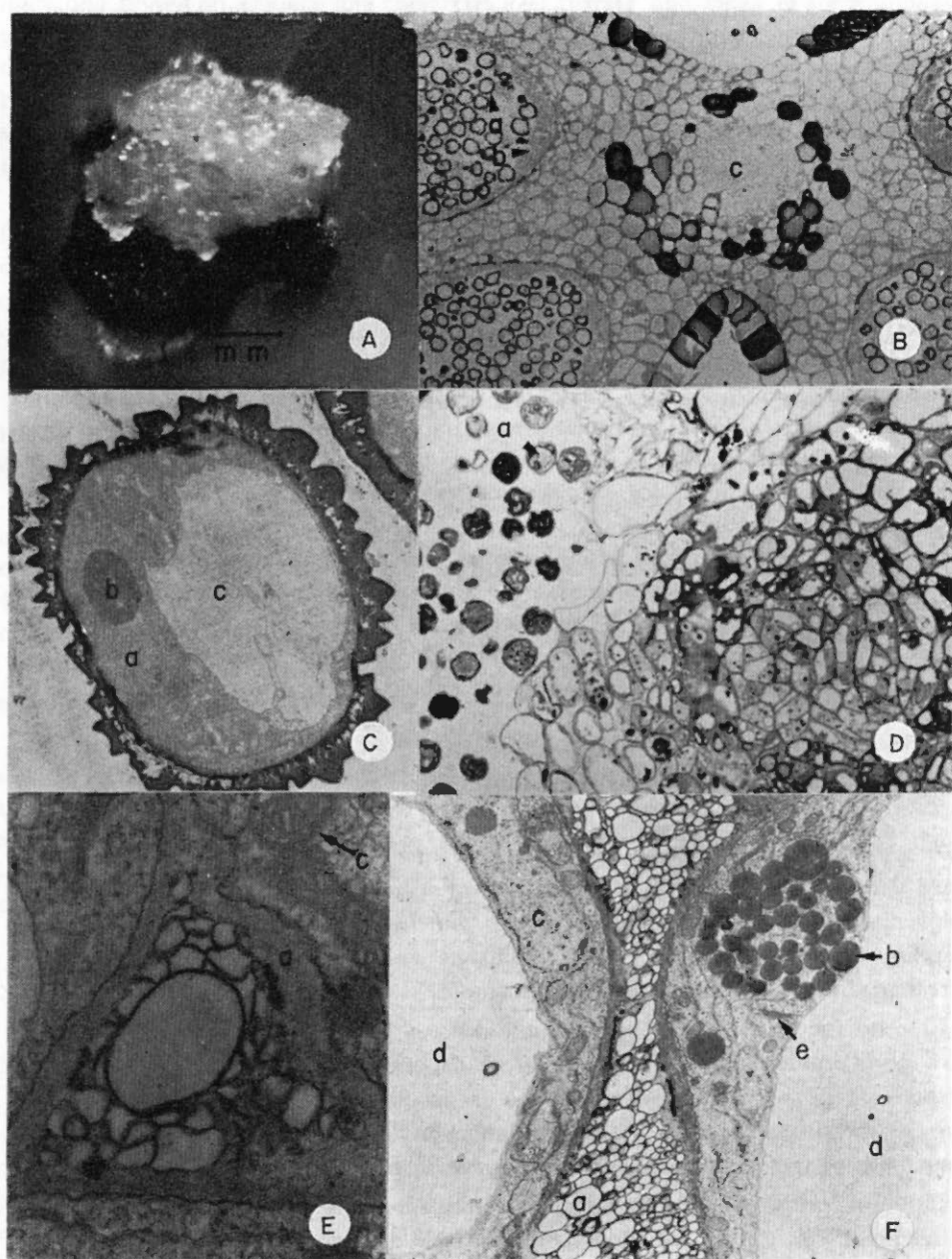


Figura 1. Anteras de fresa cultivadas *in vitro*. (A). Apariencia de la antera y callos a los 30 días de incubada. (B). Corte transversal de una antera en condiciones normales: a, granos de polen; b, tapete; c, tejido conectivo (110X). (C). Ultraestructura de un grano de polen mostrando estado uninucleado: a, núcleo; b, nucléolo; c, vacuola (2300X). (D). División de células del parénquima; a, granos de polen (218X). (E). Espacio intercelular mostrando vesículas: a, membrana plasmática; b, retículo endoplasmático; c, mitocondria (11400X). (F). Espacio intercelular; a, vesículas; b, lípidos; c, núcleo; d, vacuolas; e, aparato de Golgi f, retículo endoplasmático (6340X).

TABLA I. FORMACION DE CALLOS Y PLANTAS A LOS 30 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION DE LAS ANTERAS

	<i>Cantidad de tubos</i>	<i>Cantidad de anteras inoculadas</i>	<i>Formación de callos (mm)</i>				<i>Total % de anteras con callos por cultivo</i>	<i>Total de plantas diferenciadas</i>
			<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>		
Hokowase	115	1 035	155	214	155	0	46.7	2
Donner	215	1 935	92	23	0	0	5.9	7

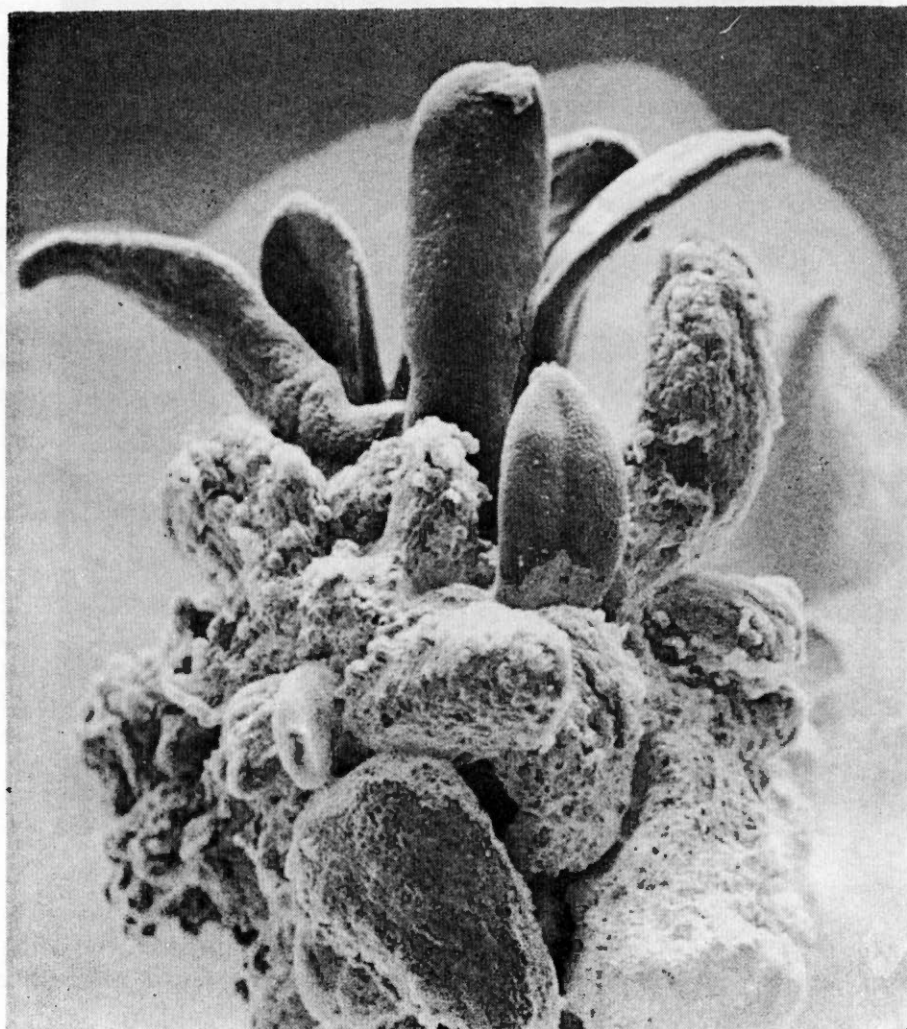


Figura 2. Diferenciación de primordios foliares a partir de callosidades formadas en anteras de fresa (100X).

El estudio con el microscopio de barrido mostró que los callos se originaron en la parte interna de la antera, rompiendo la epidermis de ésta y que los granos de polen observados aparentemente no sufrieron división alguna (Fig. 3).

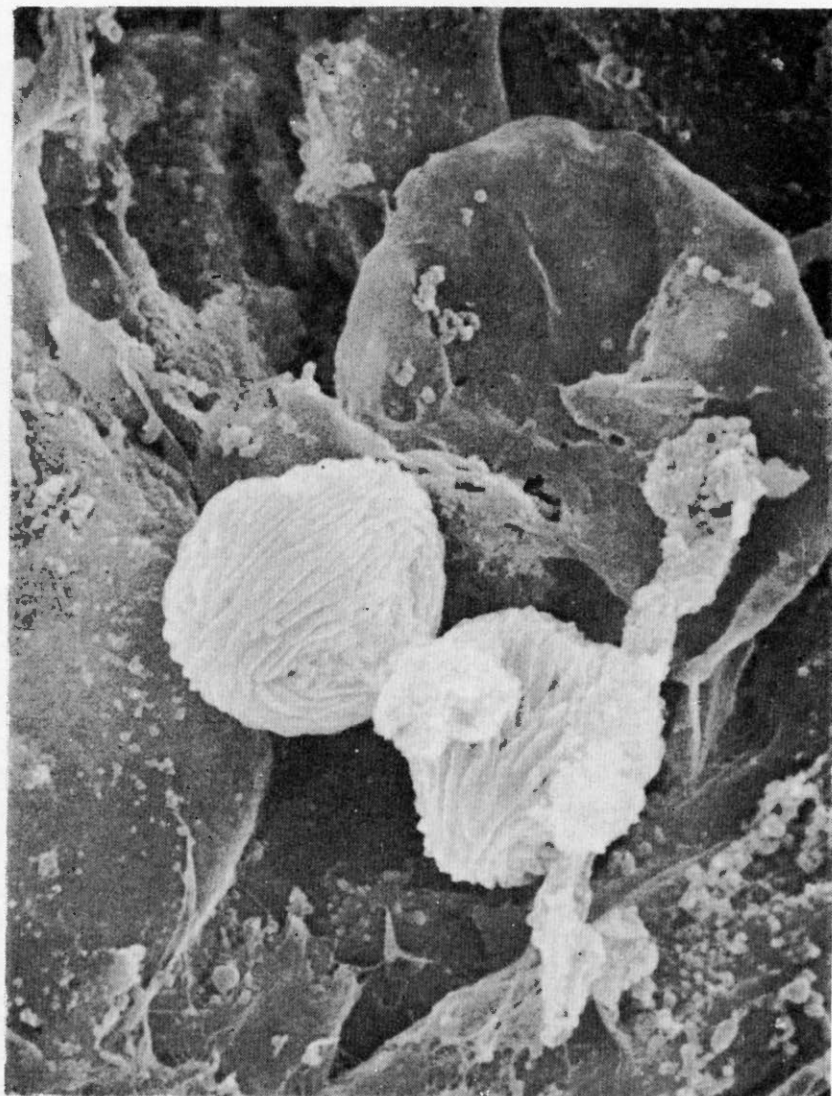


Figura 3. Apariencia de los granos de polen en el interior de la antera 30 días después de la inoculación (1430X).

DISCUSION

La utilización de anteras jóvenes con granos de polen en estado de tétrada o uninucleado, trae como consecuencia la formación de callos de acuerdo con dife-

rentes autores (Nishi *et al.*, 1974; Sopori y Maheshwari 1976; Tsun-Wen 1972, 1973 y Watanabe *et al.*, 1972); en la presente investigación, el tamaño de las anteras se trató de correlacionar con el estado de desarrollo de las microsporas, coincidiendo el estado uninucleado (Fig. 1C) con 1 mm de tamaño, la formación de callos fue inducida en las células de parénquima alrededor del haz vascular (Fig. 1D).

El comportamiento de los cultivares en la formación de callos fue diferente, aun cuando crecieron en las mismas condiciones de cultivo; al respecto se han encontrado respuestas similares en tejidos de otras especies (Villalobos, 1977).

La diferenciación se manifestó en la obtención de nueve plantas (Fig. 2), observadas a los 30 días *in vitro*. Rosati *et al.* (1975) observaron la diferenciación de plantas a partir de anteras de fresa, después de 70 días de cultivo y sucesivos trasplantes de callosidades. En este trabajo, solamente se dan a conocer resultados hasta los 30 días de cultivo.

Las observaciones al microscopio de barrido mostraron que las anteras perdieron su forma al ser rota la epidermis por la división interna de las células. Observaciones similares se han hecho en anteras de crisantemo cultivadas *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1972).

Análisis ultraestructurales mostraron la presencia de vesículas en los espacios intercelulares de células en cultivo (Fig. 1E y F), no observándose tales estructuras en anteras en condiciones naturales. Se carece de evidencias sobre el origen de estas vesículas; sin embargo, se observaron numerosos aparatos de Golgi y granos de almidón en el interior de la célula cerca de la membrana celular; la presencia de estos organelos, denota indicios de actividad celular y que posiblemente estas vesículas sean excretadas del interior de la célula.*

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron plantas a partir del tejido conectivo de anteras de fresa en los cultivares Hokowase y Donner.
2. De las 2970 anteras inoculadas se formaron 639 callosidades y se diferenciaron 9 plantas independientemente de los cultivares.
3. Se manifestó diferente porcentaje en la formación de callos para los dos cultivares en estudio, aun cuando crecieron en iguales condiciones.
4. Ultraestructuralmente se observaron vesículas en los espacios intercelulares de las anteras en cultivo, comparativamente con las no cultivadas.
5. Los granos de polen no se dividieron ni crecieron bajo condiciones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a Japan International Cooperation Agency (JICA), por el sostenimiento de la presente investigación en la Universidad de Nagoya, al Dr.

* Comunicación personal Dr. Hisachi Matsushima, Profesor visitante de la Rama de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1976.

Eizo Maeda, Jefe del Laboratorio del Institute of Biochemical Regulation Faculty of Agriculture por su asesoramiento (al Dr. Armando García V. y al Dr. Emil Mark Engleman por las sugerencias al presente escrito.

LITERATURA

- FOWLER, C. W., HUGHES, H. C. y JANICK, K. (1971). Callus formation from strawberry anthers. Hort. Res. 11, 116-117.
- GUHA, S. y MAHESHWARI, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204, 497.
- GUHA, S. y MAHESHWARI, S. C. (1966). Cell division and differentiation in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature 212, 97-98.
- IZUKA, M., MATSUMOTO, E., AKITA, D., MADRIGAL, R. y FUKISHIMA, A. (1973). Tabular floret culture of *Chrysanthemum* and *Cineraria in vitro*. Jap. J. Genet. 48, 79-87.
- LINSMAIER, E. M. y SKOOG, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18, 100-127.
- NISHI, S., OHSAWA, K. y TOYODA, T. (1974). Differentiation of young seedling of some vegetable crops from calli formed by anther culture. Jap. J. Breed. 20, 28-59.
- ROSATI, P., DEVREUX, M. y LANERI, V. (1975). Anther culture of strawberry. Hort. Sci. 10, 119-120.
- SOPORY, S. K. y MAHESHWARI, S. C. (1976). Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. J. Exp. Bot. 27, 58-68.
- SPURR, A. R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastr. Res. 26, 31-43.
- TSUN-WEN, O., HAN, H., CHIA-CHUN, C. y CHUN-CHI, T. (1972). Investigation on the induction and genetic expression of rice pollen plants. Scientia Sinica 17, 209-296.
- . (1973). Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Scientia Sinica. 16, 79-95.
- . (1975). Primary study of induction of pollen plants of *Zea mays*. Scientia Sinica 2, 138-145.
- VILLALOBOS, V. M. (1977). Cultivo meristemático de *Fragaria* spp *in vitro*. Tesis profesional, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- WATANABE, K., NISHII, Y. y TANAKA R. (1972). Anatomical observation on the high frequency callus formation from anther culture of *Chrysanthemum*. Jap. J. Genet. 47, 249-255.