

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE  
DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN HÍBRIDOS  
INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus* x  
*Tithonia rotundifolia***

**BRICIA ANAYANKY BARRERA ROMO**

**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

**Universidad Autónoma Agraria**

**Antonio Narro**



**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**Diciembre de 2010**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA  
EN HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS *Helianthus annuus* x *Tithonia  
rotundifolia***

**T E S I S**

POR:

**BRICIA ANAYANKY BARRERA ROMO**

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada  
como requisito parcial, para optar al grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

Asesor:

\_\_\_\_\_  
M.C. Leticia Escobedo Bocado

Asesor:

\_\_\_\_\_  
M.C. Francisca Ramírez Godina

\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Ruíz Zárate  
Subdirector de Postgrado

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2010**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Humberto Reyes**, por brindarme la oportunidad de trabajar en este interesante proyecto de investigación, por sus enseñanzas tanto en el aula como en el trabajo de tesis, así mismo mi admiración y respeto por su calidad como maestro e investigador vanguardista.

A la M.C. **Martha Gómez**, por brindarme sus consejos y apoyo técnico en la elaboración de este trabajo, además de ser una gran amiga y consejera.

A la M.C. **Leticia Escobedo** por su valiosa asesoría e inducción en el área de biotecnología y revisión del presente trabajo de tesis.

A la M.C. **Francisca Ramírez** por compartir la experiencia de su trabajo de investigación, su instrucción en el laboratorio de citogenética, así como por su apropiada participación como asesora del presente trabajo.

A la Bióloga **Ana María Ochoa** por su gran disposición, enseñanza y colaboración en el área de cultivo de tejidos, así también por ser una excelente persona.

A **Leticia Portos** por su extensa colaboración y el adiestramiento en las técnicas citogenéticas.

Al Dr. **Juan Manuel Martínez**, por sus enseñanzas en clase así como por su valiosa asesoría en el área de citogenética y su gran apoyo desinteresado.

A mis compañeros: **Borre, Licho, Macchi, Nájera, Campeche, Tenango, Paco y Cahua**, quienes compartieron conmigo muchísimas experiencias y conocimientos, pero sobre todo por su gran apoyo como compañeros y amigos.

Al **CONACYT** por el otorgamiento del soporte financiero para el desarrollo de esta investigación científica.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Silvia Estela Romo Ramírez, quien con su esfuerzo ejemplar y apoyo incondicional, nos impulsó a aprovechar y a disfrutar de los grandes beneficios de la mejor herencia... la educación.

A mis hermanos Sofía, Lizett, Francisco, Romario y Josué, quienes me han brindado su cariño y a Sergio Boelmi Roblero Santeliz por su gran apoyo en todos los sentidos.

## COMPENDIO

**Desarrollo de un protocolo de duplicación cromosómica en híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia***

POR

**BRICIA ANAYANKY BARRERA ROMO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2010**

**Dr. M. Humberto Reyes Valdés –Asesor-**

**Palabras clave:** *Helianthus annuus*, *Tithonia rotundifolia*, colchicina, poliploidía, viabilidad de polen.

La duplicación cromosómica con colchicina es uno de los métodos más importantes para el restablecimiento de la fertilidad de híbridos obtenidos de una cruce intergenérica o interespecífica, debido a que este tipo de cruzamientos normalmente presentan anomalías en el apareamiento meiótico por incompatibilidad cromosómica. Estas anomalías se presentaron en el cruzamiento intergenérico entre *Helianthus annuus* y *Tithonia rotundifolia* lo que produjo híbridos estériles.

El objetivo del presente trabajo fue probar distintos tratamientos con colchicina en meristemas, para obtener tetraploides en los progenitores del híbrido intergenérico *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia* y después aplicar el mejor tratamiento al híbrido para restaurar su fertilidad.

El mejor tratamiento fue de 200 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante 5 horas con un 36 % de células tetraploides en mitosis. Después de 5 horas este porcentaje disminuyó y los poliploides mayores a 4x aumentaron. Sin embargo en todos los tratamientos se presentaron mosaicismos lo que probablemente originó el restablecimiento del nivel de diploidía, comprobado mediante análisis meióticos en diacinesis con 17 cromosomas bivalentes.

Las altas concentraciones de colchicina provocaron una disminución en la viabilidad del polen, probablemente a consecuencia de alteraciones en la fisiología de la planta.

No se observaron diferencias estadísticas significativas en las mediciones fenotípicas en ambas especies que pudieran evidenciar un aumento en el nivel de ploidía, tal como se ha detectado en otras especies duplicadas con colchicina.

## ABSTRACT

**Development of a chromosome duplication protocol in intergeneric hybrids *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia***

BY

**BRICIA ANAYANKY BARRERA ROMO**

**MASTER OF SCIENCES**

**PLANT BREEDING**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2010**

**Dr. M. Humberto Reyes Valdés –Advisor-**

**Key words:** *Helianthus annuus*, *Tithonia rotundifolia*, colchicine, polyploidy, pollen viability.

Chromosomal duplication with colchicine is one of the main methods for restoring fertility in hybrids derived from intergeneric and interspecific crosses, because these types of hybrids usually have abnormalities in the meiotic chromosome pairing. These abnormalities occurred in the intergeneric cross between *Helianthus annuus* and *Tithonia rotundifolia*, which produced sterile hybrids.

The aim of this study was to test different treatments with colchicine in meristems to obtain tetraploid in progenitors of the intergeneric hybrid *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia* and then apply the best treatment in the hybrid to restore its fertility.

The best treatment was colchicine at a concentration of 200 mg L<sup>-1</sup> for 5 hours with 36 % of tetraploid cells in mitosis. After 5 hours this percentage decreased and 4x and higher polyploids increased. However, in all treatments mosaicism was induced which probably caused the restoration of the diploidy level, found by analysis meiotic chromosomal in diakinesis with 17 bivalents. Also, high concentrations of colchicine caused a decrease in pollen viability, probably due to changes in plant physiology.

No significant statistical differences were observed in both species that could indicate an increase in ploidy level, as it has been detected in other species with colchicine-induced duplication.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
Meta.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen y distribución de <i>Tithonia</i> .....	4
Importancia de <i>Tithonia. rotundifolia</i> .....	4
Origen y distribución de <i>Helianthus annuus</i> .....	5
Importancia de <i>Helianthus annuus</i> .....	6
Relación filogenética entre <i>H. annuus</i> y <i>T. rotundifolia</i> .....	7
Cruzamientos intergenéricos entre <i>H. annuus</i> y <i>T. rotundifolia</i> .....	8
Origen de la colchicina.....	10
Características de la colchicina.....	11
Acción de la colchicina.....	11
Objetivos de la duplicación cromosómica.....	12
Efectos de la colchicina en las plantas.....	14
Ejemplos de duplicación cromosómica con colchicina en <i>H. annuus</i> ..	15
Ejemplos de duplicación cromosómica con colchicina en <i>T. rotundifolia</i> .....	16
Determinación del tratamiento óptimo de colchicina.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
a) Tratamientos en los progenitores.....	18
Análisis mitóticos.....	20
Análisis meióticos.....	23
Mediciones fenotípicas.....	24
Análisis de viabilidad del polen.....	24
b) Tratamientos en el híbrido.....	25

Cultivo <i>in vitro</i> .....	25
Tratamiento en semilla.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
a) Tratamientos en los progenitores .....	29
Análisis mitóticos.....	29
Análisis meióticos .....	37
Mediciones fenotípicas.....	39
Análisis de viabilidad del polen .....	40
b) Tratamientos en el híbrido.....	42
Cultivo <i>in vitro</i> .....	42
Tratamiento en semilla.....	44
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RESUMEN.....	47
VII. LITERATURA CITADA .....	48
VIII. ANEXOS.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Clasificación taxonómica de <i>H. annuus</i> y <i>T. rotundifolia</i> . ....	8
<b>Cuadro 3.1.</b> Experimentos de duplicación cromosómica realizados en HA 89 y <i>T. rotundifolia</i> . ....	19
<b>Cuadro 3.2.</b> Composición basal de las soluciones madre para la preparación del medio de cultivo Murashige Skoog (1962). ....	26
<b>Cuadro 3.3.</b> Medios nutritivos usados para obtener plantas completas de híbridos F <sub>1</sub> de <i>H. annuus</i> (CMS HA 89) x <i>T. rotundifolia</i> (accesión 26) por medio de la técnica de rescate de embriones. ....	27
<b>Cuadro 3.4.</b> Cantidad de aminoácidos en mg L <sup>-1</sup> adicionados al medio de cultivo número uno. ....	28
<b>Cuadro 4.1.</b> Resultados de los análisis mitóticos en HA 89 del experimento 1, con un tiempo de exposición a la colchicina de 5 horas. ....	30
<b>Cuadro 4.2.</b> Resultados de los análisis mitóticos del experimento 2. ....	30
<b>Cuadro 4.3.</b> Resultados de los análisis mitóticos del experimento 3. ....	31
<b>Cuadro 4.4.</b> Resultados de los análisis mitóticos del experimento 4. ....	32
<b>Cuadro 4.5.</b> Resultados de los análisis mitóticos del experimento 5. ....	33
<b>Cuadro 4.6.</b> Resultados de los análisis mitóticos del experimento 6. ....	34
<b>Cuadro 4.7.</b> Porcentaje de células para los diferentes niveles de poliploidía en mitosis promediado para HA 89 y <i>T. rotundifolia</i> en los distintos tratamientos. ....	34

<b>Cuadro 4.8.</b> Fracción de células poliploides/células observadas en diacinesis, en los análisis meióticos para cada tratamiento.....	38
<b>Cuadro 4.9.</b> Mediciones fenotípicas promediadas para cada tratamiento con colchicina en HA 89 y <i>T. rotundifolia</i> no significativas al 5% de probabilidad. .....	40
<b>Cuadro 4.10.</b> Promedio de fertilidad del polen de las plantas sobrevivientes de HA 89 y <i>T. rotundifolia</i> en los distintos tratamientos.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Configuraciones meióticas en diacinesis de: a) girasol cultivado ( <i>Helianthus annuus</i> L. var. <i>macrocarpus</i> ) línea HA89, $2n=34$ , con 15 IIa y 2 IIc; y (b) <i>Tithonia rotundifolia</i> , $2n=34$ , con 10 IIa y 7 IIc. ....	7
<b>Figura 2.2.</b> Estructura química de la colchicina.....	11
<b>Figura 4.1</b> Experimento 2. Efecto de la concentración y el tiempo en el porcentaje de células poliploides en: a) <i>H. annuus</i> . y b) <i>T. rotundifolia</i> . ....	31
<b>Figura 4.2.</b> Experimento 5. Efecto de la concentración y el tiempo en el porcentaje de células poliploides en: a) <i>H. annuus</i> .y b) <i>T. rotundifolia</i> . ....	33
<b>Figura 4.3.</b> Porcentajes de células para los distintos niveles de ploidía para cada tratamiento, promediado para ambas especies. ....	35
<b>Figura 4.4.</b> Fracción de células tetraploides / poliploides observadas en los distintos experimentos, promediados para HA 89 y <i>T. rotundifolia</i> . ....	36
<b>Figura 4.5.</b> Célula tetraploide en diacinesis de <i>H. annuus</i> duplicada con $100 \text{ mg L}^{-1}$ de colchicina, durante 20 horas ( $2n = 68 = 24 \text{ II} + 5 \text{ IV}$ ). ....	38

## I. INTRODUCCIÓN

En el mundo existen muchos países que se dedican a la producción de flores. Los principales países exportadores son Holanda y Colombia, con una participación del 70% en el mercado. Por el lado de los países demandantes destaca el caso de Alemania, Inglaterra y Estados Unidos, los cuales en conjunto compran poco más del 50% de las flores que se comercializan en el mundo (ONU, 2006). En México existe un gran compromiso en este rubro, debido a la gran variedad de climas y la riqueza de sus suelos.

Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), para el 2009 México contaba con 15,756 hectáreas cultivadas de especies ornamentales. Del total de la producción nacional cerca del 80 % se destina al mercado interno y el resto es exportado principalmente a E.U., representando apenas un 2.6 % de la demanda (ASERCA, 2009).

En el ámbito mundial México ha aportado alrededor de 600 especies ornamentales, pero gran parte de ella no cumple con los estándares de calidad, así como no se ha profundizado en el desarrollo de nuevas variedades, presentaciones, aromas, etc. A estas especies se les ha realizado mejoramiento fuera de nuestro territorio, reingresando a nuestra

horticultura ornamental en forma de nuevas variedades, con gran valor comercial (Rzedowski, 1995).

Bajo este gran desafío, el Laboratorio de Análisis de Genomas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), tiene desde 1998 una línea de investigación para rescatar, caracterizar y mejorar el germoplasma silvestre de girasol en México. Como parte de este programa de investigación se han recolectado y caracterizado poblaciones silvestres mexicanas de *Thitonia rotundifolia*, así mismo se han hecho cruzamientos amplios entre esta especie y el girasol cultivado *Helianthus annuus*, sin embargo todos los híbridos desarrollados han resultado estériles debido a incompatibilidad en apareamiento cromosómico, revelada por análisis citológicos en diacinesis (Gómez *et al.*, 2010).

Cuando se obtienen híbridos amplios estériles debido a la incompatibilidad cromosómica, una estrategia que ha funcionado en varias especies es la manipulación del ciclo celular para inducir el fenómeno de c-mitosis y generar plantas con el genoma duplicado. Si estas plantas funcionan como anfidiploides, entonces es posible tener híbridos fértiles con características nuevas que pueden darle un valor agregado como planta ornamental.

## Objetivos

1. Determinar el mejor tratamiento con colchicina que maximice la posibilidad de obtener anfidiplóides en *H. annuus* y *T. rotundifolia*.
2. Evaluar los efectos citológicos y fenotípicos de la colchicina aplicada en meristemos de los miembros del cruzamiento *H. annuus* x *T. rotundifolia*.
3. Probar el mejor tratamiento con colchicina en el híbrido intergenérico.

## Hipótesis

Es posible obtener poliploides en híbridos *H. annuus* x *T. rotundifolia*, a través de la manipulación del ciclo celular con colchicina.

## Meta

Obtener un protocolo de duplicación cromosómica para obtener híbridos anfidiplóides fértiles, resultado del cruzamiento entre *H. annuus* y *T. rotundifolia*, para generar una nueva especie con potencial ornamental.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### **Origen y distribución de *Tithonia***

El género *Tithonia* es originario de México y actualmente esta distribuido en regiones húmedas del Centro y Sudamérica, Asia y África (George *et al.*, 2001).

En nuestro país se han localizado 19 especies a grandes altitudes de la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental. Una de las mas importantes es *T. rotundifolia*, localizada en los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, Puebla, Michoacán, Estado de México, Guerrero y Oaxaca (Gómez y González, 1994).

### **Importancia de *Tithonia. rotundifolia***

*Tithonia rotundifolia* es una planta anual, alógama y diploide ( $2x = 34$ ). Entre sus propiedades más interesantes se encuentra la resistencia a mildew, *Phomopsis* y *Sclerotinia* (Cristov y Panayotov, 1991), así como a altas temperaturas y sequías. Además exhibe características ornamentales muy importantes que la hacen diferente del girasol cultivado, como son: pubescencia suave, pedicelo largo, aroma agradable y colores naranja intensos. En el aspecto negativo, sus capítulos son más pequeños que los del girasol y no tiene la misma resistencia a heladas. Adicionalmente, las

poblaciones silvestres de *T. rotundifolia* son muy sensibles al fotoperíodo y tienen porte muy alto entre 70 y 75 cm (Pandey, 1993). Esta especie presenta pedúnculos fistulosos y engrosados debajo de las cabezuelas; es una planta herbácea robusta, con múltiples inflorescencias, paleas rígidas puntiagudas y hojas todas en su mayoría alternas (Rodríguez y Porras, 1996).

Aunque *T. rotundifolia* se distribuye en forma natural como especie silvestre en México, razón por la cual comúnmente se le llama girasol mexicano, no se ha explotado en este país como planta ornamental; esto marca una diferencia con otros países como Estados Unidos, donde se manejan algunas variedades comerciales de *T. rotundifolia*, entre las que destacan Goldfinger, Torch y Fiesta del Sol. La variedad Miller es utilizada al sur de México como planta melífera, ornamental y medicinal. (Chiltern Seeds, Company 2009).

### **Origen y distribución de *Helianthus annuus***

Los sitios arqueológicos con los restos más antiguos de girasol domesticado son: San Andrés, Tabasco, México (4130 ± 40 años de radiocarbono); Higgs, Texas, E.U. (2850 ± 85 años de radiocarbono); Hayes, Texas, E.U. (4265 ± 60 años de radiocarbono) y mármol Bluff, Arkansas, E.U. (2843 ± 44 años de radiocarbono) (Harter *et al.*, 2004).

Una fuerte evidencia de la domesticación independiente del girasol en México se encuentra en las diferencias morfológicas entre las variedades

precoces de México y sus contemporáneos homólogos del oriente de América del Norte.

En la actualidad el girasol domesticado es ampliamente cultivado en muchas partes de México, por ejemplo, Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (Lentz *et al.*, 2008).

### **Importancia de *Helianthus annuus***

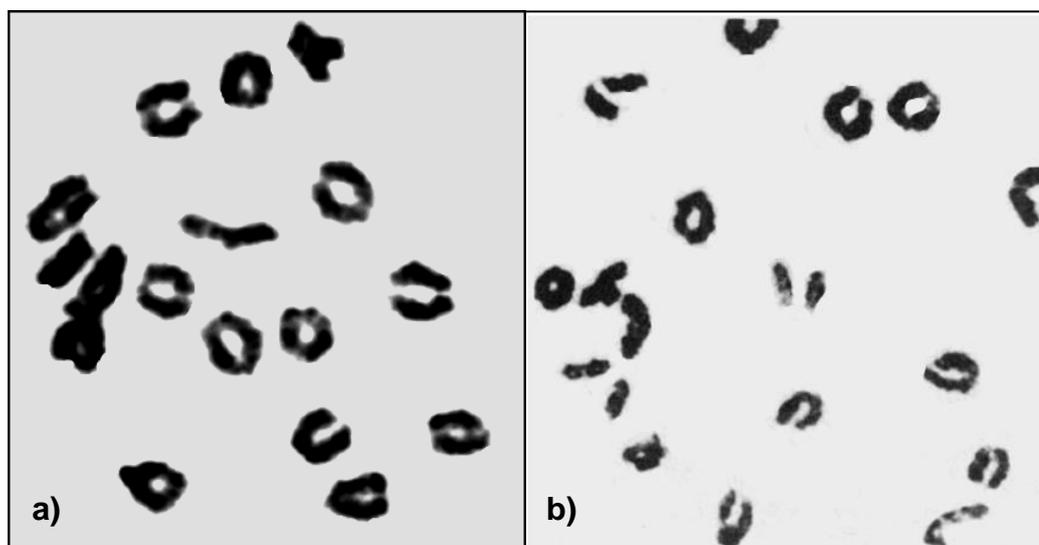
El género *Helianthus* se compone de 49 especies, con 12 anuales y 37 perennes, las cuales representan una considerable variabilidad que pueden utilizarse para el mejoramiento genético de características agronómicas e industriales de la especie cultivada, por ejemplo, la fuente de esterilidad citoplásmica masculina (CMS), se descubrió en la especie silvestre *Helianthus petiolaris* que también aporta genes de resistencia a varias de enfermedades (CONASIPRO, 2008). Una de las especies anuales más importantes dentro de este género es *H. annuus*.

El girasol es una de las especies oleaginosas más cultivada en el mundo. Recientemente, se han desarrollado cultivares de alto ácido oleico y cuyo aceite tiene mayor estabilidad a la oxidación y mejores propiedades dietéticas que los genotipos estándar. Además posee una amplia gama de aplicaciones como planta forrajera, melífera, productora de biocombustibles y como flor de corte con gran valor comercial.

En México la superficie sembrada de flor de girasol en el año 2009 fue de 268.7 hectáreas con una producción de 117,840 toneladas, la cual ha crecido durante los últimos años, siendo los estados de México y Morelos los únicos productores (SIAP, 2009). En la actualidad es una de las flores más populares por lo vistoso de su inflorescencia. Esta especie presenta lígulas amarillas, hojas esparcidas sobre el tallo y vilano caduco.

### Relación filogenética entre *H. annuus* y *T. rotundifolia*

*Helianthus annuus* y *Tithonia rotundifolia* pertenecen a la familia de las Asteráceas, con un número cromosómico básico  $x = 17$ ,  $2n = 34$  (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Configuraciones meióticas en diacinesis de: a) girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus*) línea HA89,  $2n=34$ , con 15 IIa y 2 IIc; y (b) *Tithonia rotundifolia*,  $2n=34$ , con 10 IIa y 7 IIc.

El parentesco entre ambas especies, el cual se visualiza en el Cuadro 2.1, posibilita su entrecruzamiento.

**Cuadro 2.1.** Clasificación taxonómica de *H. annuus* y *T. rotundifolia*.

	<i>H. annuus</i>	<i>T. rotundifolia</i>
<b>Reino</b>	Plantae	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Asteridae	Asteridae
<b>Orden</b>	Asterales	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae	Asteraceae
<b>Subfamilia</b>	Asteroideae	Asteroideae
<b>Tribu</b>	Helianthae	Helianthae
<b>Género</b>	<i>Helianthus</i>	<i>Tithonia</i>
<b>Especie</b>	<i>annuus</i> L.	<i>rotundifolia</i> (Mill.) S.F. Blake

### **Cruzamientos intergenéricos entre *H. annuus* y *T. rotundifolia***

Las características antes mencionadas de *H. annuus* y *T. rotundifolia* hacen muy atractivo el cruzamiento entre estas dos especies para el desarrollo de un híbrido que combine ciertas cualidades ornamentales, sin embargo solo se han reportado dos cruzamientos amplios de este tipo.

En 1991 Cristov y Panayotov cruzaron la variedad de polinización libre Peredovik con *T. rotundifolia* y la línea 3004 (CMS de *H. petiolaris*) con *T. rotundifolia*, en ambos casos se obtuvieron plantas con una sola inflorescencia, además cruzaron HA 89 (CMS de *H. argophyllus*) con *T. rotundifolia* y obtuvieron plantas muy ramificadas. Solamente una semilla se obtuvo del cruzamiento con la línea 3004, mientras que con HA 89 y Peredovik se obtuvieron porcentajes de semilla desarrollada de 1.31% y 2.2%, respectivamente. Reportaron fertilidad en los híbridos; sin embargo en

dicho estudio no se incluyeron análisis moleculares para demostrar la naturaleza híbrida de los materiales que obtuvieron.

Reyes *et al.* (2005) obtuvieron un híbrido por polinización manual de un girasol cultivado androestéril HA 89 (CMS *H. petiolaris*) cruzado con *T. rotundifolia* recolectada en el estado de Guerrero. Se generaron muy pocas semillas y una parte de ellas se utilizaron para evaluar el híbrido F<sub>1</sub>, mientras que el remanente se llevó a congelación. La morfología de este híbrido resultó ser una combinación de caracteres de ambos padres; presentó una sola inflorescencia con flores liguladas anaranjado-amarillas de 26 a 48 mm de longitud y exhibió androesterilidad. La forma de las hojas fue semejante al tipo *H. annuus* ya que no presentó lobulación, aunque tuvieron una pilosidad intermedia.

El híbrido resultó infértil a la polinización con HA 89, por lo que solamente produjo aquenios vacíos parecidos a los de *T. rotundifolia*. Tampoco produjo polen probablemente por la presencia del citoplasma PET1 y la ausencia de genes restauradores de la fertilidad en la planta de *T. rotundifolia*, o algún tipo de incompatibilidad entre *H. annuus* y *T. rotundifolia* que impidió el desarrollo de polen. La huella de ADN confirmó la naturaleza híbrida de la planta experimental y el análisis de distancias genéticas descartó el fenómeno de hibridación parcial.

Estudios anteriores han demostrado que en el caso de cruzamientos intergenéricos es necesario realizar un análisis meiótico en profase y

metafase I, con el fin de evaluar la afinidad genómica, ya que en esta etapa del proceso celular existe un alto grado de irregularidades cromosómicas, debido a la falta de homología o compatibilidad reducida (Atlagic y Skoric, 1999). Para esto, se colectaron embriones inmaduros del híbrido HA 89 (CMS *H. petiolaris*) x *T. rotundifolia* de 13 y 22 días después de la polinización con HA 89 y se observaron anomalías en el apareamiento cromosómico en meiosis, como la presencia de multivalentes y univalentes en metafase I, así como puentes y cromosomas rezagados en anafase I (Gómez, 2009).

El presente trabajo se basó en el desarrollo de un protocolo de duplicación cromosómica mediante el uso de colchicina que permita la fertilidad del híbrido. Al contar con una copia idéntica de cada cromosoma, el apareamiento puede llegar a ser normal.

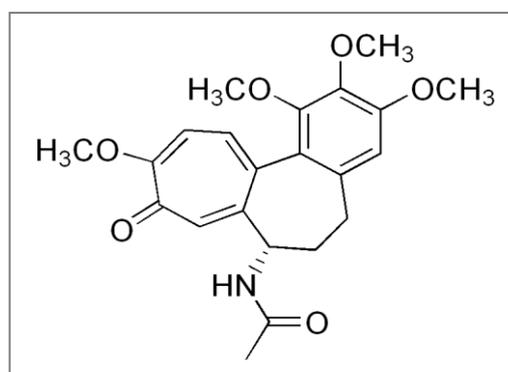
### **Origen de la colchicina**

La colchicina es un metabolito secundario extraído de las semillas y bulbos de *Colchicum autumnale* L. perteneciente a la familia *Liliaceae*. Produce flores púrpuras, rosas o blancas que aparecen entre septiembre u octubre en latitudes nativas como Asia oriental y parte de la costa mediterránea. Forma una roseta de hojas color verde oscuro después de la floración. Sus hojas, semillas y cormos son venenosos, debido a que contienen el alcaloide colchicina que en pequeñas dosis es empleado para el tratamiento de enfermedades como la gota. Es probablemente el producto químico más ampliamente utilizado para la inducción de poliploidía y

actualmente es sintetizado artificialmente. Otros agentes utilizados con el mismo fin son: la dinitroanilina, la orizalina y la trifluralina (Grzebelus y Adamus, 2004)

### Características de la colchicina

La colchicina sintética tiene aspecto de agujas o polvo amarillo claro inodoras, que oscurecen en contacto con la luz. Es una sustancia muy tóxica y cancerígena; la dosis letal probable en humanos es menor a 5 mg kg<sup>-1</sup>. La fórmula molecular de la colchicina es C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N (Figura 2.2) con peso molecular de 399.44 g mol<sup>-1</sup>. Se solubiliza en agua caliente y se almacena en recipiente ámbar debido a fotosensibilidad; la exposición prolongada a la acción de la luz puede alterar su estructura química, con la consecuente pérdida de sus propiedades (Lewis, 2009).



**Figura 2.2.** Estructura química de la colchicina.

### Acción de la colchicina

Blakeslee y Avery (1937) descubrieron que la colchicina inhibe la formación de las fibras del huso debido a su unión a los microtúbulos de

manera inestable, por ese motivo, el cambio de medio puede revertir el proceso, permitiendo la continuación del cultivo. En esta fase (anafase) los cromosomas se han multiplicado, pero la división celular aún no ha tenido lugar. La restricción de la formación de la pared celular en esta etapa da como resultado células poliploides. Estas células poliploides son más grandes que sus contrapartes diploides.

Este incremento en el volumen de la célula, con mayor frecuencia desarrolla tejidos más gruesos, lo que resulta en grandes órganos de la planta. Un modelo común para explicar los cambios originados de la inducción tetraploide, se basa en el supuesto de que existe una proporción más baja de la membrana nuclear en relación a la cromatina (el volumen de las células tetraploides suele ser aproximadamente el doble, y su superficie es solamente 1,5 veces mas grande), lo que provoca que más cromatina entre en contacto con la membrana nuclear, reforzando así la actividad de los genes, la mejora en las relaciones de agua, el estado hormonal y la tasa de fotosíntesis (Levin, 2002 y Lavania, 2005).

### **Objetivos de la duplicación cromosómica**

El doblaje cromosómico de manera natural, ha mejorado la fertilidad de la semilla híbrida en diversas especies a través de muchos años (Hegarty y Hiscock, 2008; Leitch y Leitch, 2008). Una forma de inducir poliploidía en corto tiempo es mediante el uso de colchicina, cuya efectividad se ha comprobado en diferentes géneros como *Eucaliptus* (Liu *et al.*, 2009),

*Lavandula* (Urwin *et al.*, 2007), *Nicotiana* (Burun y Emiroglu, 2008) y *Ocimum* (Omidbaigi *et al.*, 2010) entre muchos otros (Anexo A1).

La poliploidía a menudo genera variantes que pueden poseer características útiles y la duplicación de los productos génicos proporciona una amplia base de germoplasma para estudios de mejoramiento. Dentro de los principales objetivos de la poliploidía se encuentran:

- Generación de híbridos tetraploides para la restauración de la fertilidad de algún híbrido estéril debido a incompatibilidad en el apareamiento meiótico, lo que se resuelve al contar con una copia idéntica de cada cromosoma (Shunji *et al.*, 2009).
- La generación de dobles haploides para obtener plantas 100% homocigóticas en corto tiempo, como en el caso de maíz (Röber *et al.*, 2005).
- Obtención de plantas tetraploides para incrementar características de importancia económica (Shahriari *et al.*, 2008).
- La producción de materiales tetraploides que se pueden combinar con especies diploides para generar triploides sin semilla, como es el caso de la uva, sandía o cultivos donde no interese la semilla (Bhojwani, 2004).

## Efectos de la colchicina en las plantas

- Bajo porcentaje de sobrevivencia de plántulas tratadas (Yang 2006).
- Desarrollo de cotiledones anchos y gruesos, e hipocotíleos cortos e hinchados con crecimiento lento (Burun y Emiroglu, 2008).
- Hojas mas gruesas y verdes; mayor área foliar (Liu *et al.*, 2009).
- Disminución en la frecuencia de estomas y número de anteras, así como un poderoso efecto en el cambio de frecuencias de los alelos (Rauf *et al.*, 2006).
- Disminución en la fertilidad y producción de polen en progenitores (Srivastava y Srivastava, 2002).
- Aumento en la fertilidad y producción de polen en híbridos (Prabakaran y Sujatha, 2004).
- Disminución en la altura de planta (Liu *et al.*, 2007).
- Incremento en el tamaño de la flor y tamaño de semilla (Urwin *et al.*, 2007).
- Mayor producción de biomasa e incremento en la concentración o calidad de ciertas sustancias, (Shahriari, 2008).
- Incremento en el número de cloroplastos aumento en el tamaño de estomas y diámetro del polen (Omidbaigi 2010).
- Produce efectos secundarios como la esterilidad y crecimiento anormal (Wan *et al.*, 1989).
- Generación de quimeras, que consisten en una mezcla de tejido diploide y tetraploide. Una alta frecuencia de mosaicos y menor eficiencia de la colchicina se asocia a menudo con el método de

duplicación *in vivo* en comparación con las técnicas *in vitro* (Yang, 2006).

- Polimorfismo debido a que la colchicina además de inducir duplicación de cromosomas, también provoca la pérdida de cromosomas (Traut y Sommer, 1976).
- Interacción mutagénica independientemente de los cambios en los niveles de ploidía (Tuyl, 1992).
- Las plantas tratadas que suelen escapar al efecto de duplicación de la colchicina han demostrado una diferencia significativa en algunas características, tales como el área foliar, la fecha de floración y el número de flores (Hague, 1987).

### **Ejemplos de duplicación cromosómica con colchicina en *H. annuus***

Downes y Marshall (1983) reportaron el tratamiento de plántulas híbridas F<sub>1</sub> estériles, derivadas de líneas endogámicas de girasol AHA 232 y RHA 274, con 0.5 % de colchicina. El 50% de las plantas produjo al menos una semilla y en algunos casos se observó esterilidad y mosaicismos.

En el mismo año Jackson y Murray reportaron el tratamiento premeiótico con  $0.5 \times 10^{-4}$  M durante 68 horas en microsporocitos de *H. annuus* y *H. laciniatus* ( $x = 17$ ), en donde observaron apareamientos cuadrivalentes, los cuales no son comunes en especies diploides.

En 1989 Jan y Chandler reportaron el tratamiento con  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de colchicina y  $20 \text{ mL L}^{-1}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 5 h, para

restaurar la fertilidad de un híbrido producto de la cruce interespecífica entre el girasol cultivado (*H. annuus* L.) y *H. bolanderi*. El 32 % resultó tetraploide, con flores y granos de polen más grandes y con una producción de semillas por autopolinización de 61.8 % por capítulo.

Srivastava y Srivastava en el 2002 reportaron la obtención de plantas autopoliploides de *H. annuus* var. morden a través del tratamiento de plántulas con 0.4 %, 0.5 % y 0.6 % de colchicina durante 12 h. Los autopoliploides (4 x, 8 x y 16 x) mostraron una reducción en la fertilidad del polen y semillas, en la altura, tamaño de hojas y flores de las plantas, pero aumentó en el tamaño de estomas, granos de polen y meiocitos. Las observaciones meióticas en la generación F<sub>1</sub> de tetraploides, revelaron asociaciones cromosómicas irregulares, pero estas disminuyeron en la siguiente generación y esto originó una mejora en la fertilidad del polen.

Prabakaran y Sujatha en el 2004 reportaron el primer éxito en la hibridación interespecífica entre *H. annuus* y una especie perene diploide, *H. simulans*. La meiosis fue irregular en los híbridos F<sub>1</sub> y se observaron univalentes y multivalentes. La fertilidad se mejoró sometiendo *in vitro* la proliferación de brotes con colchicina al 0.001 % incorporada en el medio de multiplicación de brotes.

### **Ejemplos de duplicación cromosómica con colchicina en *T. rotundifolia***

En 1993 Pandey reportó el tratamiento de plántulas con 0.2, 0.3 y 0.5 %, nueve veces durante 3 días. El tratamiento más eficaz fue de 0.3 % con

aumento en el tamaño y número de flores, días a floración, tamaño de polen y lígulas, así como una disminución en la altura de planta, tamaño de hoja y producción de semilla debido a la presencia de configuraciones cuadrivalentes. El restablecimiento en el porcentaje de producción de semilla mejoró en la siguiente generación debido a la disminución de cuadrivalentes.

### **Determinación del tratamiento óptimo de colchicina**

En base a los estudios previos tanto en *Helianthus annuus* como en *Tithonia rotundifolia*, se puede deducir que la concentración óptima de colchicina y la duración del tratamiento deben ser determinadas empíricamente, ya que las especies de plantas en general, varían de acuerdo con su sensibilidad a la colchicina, pues la variación en el tiempo de exposición a esta sustancia interfiere en gran medida en la mayor o menor concentración de cromosomas, que es más alta en el tiempo más prolongado, así como en el porcentaje de sobrevivencia. Otro factor que debe ser considerado es que un tiempo más prolongado aumenta el número de metafases obtenidas, aunque haya menor distensión de los cromosomas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado en dos años (2009-2010) en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el Laboratorio de Análisis de Genomas y de Citogenética, así como en invernadero y vivero.

#### a) Tratamientos en los progenitores

Las pruebas preliminares se hicieron con semillas de *H. annuus* de la línea pública de girasol cultivado HA 89 y *T. rotundifolia* (Accesión 26 de Iguala, Guerrero) hasta establecer el protocolo más prometedor y no desperdiciar semilla híbrida.

En un total de seis experimentos llevados a cabo en diferentes fechas, se probaron distintas concentraciones de colchicina (10, 20, 100, 150, 200 y 250 mg L<sup>-1</sup>) y distintos tiempos de aplicación (2, 5, 12, 20, 24, 30, 40 y 72 h), bajo resguardo de la luz. Cada tratamiento se realizó por duplicado para HA 89 y *T. rotundifolia* (Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Experimentos de duplicación cromosómica realizados en HA 89 y *T. rotundifolia*.

Experimento	Fecha de siembra	Concentración de colchicina-Tiempo de aplicación (mg L <sup>-1</sup> - h)
1*	28-Oct-08	100-5, 150-5 y 200-5
2	09-Mar-09	100-24, 150-12, 200-5 y 250-2
3	25-Mar-09	100-24 y 200-5
4	09-Abr-09	100-20
5	11-May-09	100-20, 100-30, 100-40, 200-20, 200-30 y 200-40
6	21-Jul-09	10-72 y 20-72

\*Solo se realizó en HA 89

### Preparación de diluciones de colchicina

Se preparó una solución madre con 0.2 g de colchicina en 200 mL de agua destilada, para obtener una concentración inicial de 1g L<sup>-1</sup> y con ella preparar las distintas concentraciones, por ejemplo para una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> se diluyeron 10 mL de la solución madre en 90 mL de agua destilada. Cada dilución se vació en frascos de color ámbar y se conservaron en refrigeración debidamente etiquetadas.

### Procedimiento

Se desinfectaron 20 semillas de cada progenitor (HA 89 y *T. rotundifolia*) con una solución al 1 % de hipoclorito de sodio durante un minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada para después sembrarlas sobre papel filtro en cajas de Petri etiquetadas con el nombre del material genético, la concentración de colchicina, la repetición y la fecha. El papel filtro se humectó con agua y se incubaron a 28 °C.

Después del desarrollo de la radícula en el 95 % de las plántulas, se sumergieron en colchicina con la concentración indicada en la etiqueta, durante el tiempo indicado y bajo el resguardo de la luz. Estos tratamientos se aplicaron en vitrinas de gases y con el uso de guantes debido a la peligrosidad de la colchicina. Una vez cumplido el tiempo de exposición a la colchicina las semillas se enjuagaron y se trasladaron a nuevas cajas de Petri para regar con agua e incubar a 28 °C.

El 50 % de las plántulas se utilizaron para el recuento de cromosomas en metafase mitótica. La otra parte se transplantó en macetas y se conservó en vivero hasta su total desarrollo para posterior evaluación fenotípica, viabilidad del polen y estudios meióticos.

### **Análisis mitóticos**

#### **Determinación del horario de división**

Para poder observar los cromosomas en el proceso de mitosis se requieren células de cualquier tejido siempre y que se encuentre en división activa como los meristemos de ápices de raíz, sin embargo los horarios de división celular son distintos en cada especie. Para determinarlo en *H. annuus* y *T. rotundifolia* se observaron células en distintos horarios para encontrar el de mayor división citológica. Con este fin se sembraron 40 semillas de cada especie sobre papel filtro con agua y se almacenaron en cámara de geminación a 28 °C durante 24 horas. Se cortaron los meristemos radicales (3 mm de longitud) a intervalos de 15 minutos de 9:00

a 11:30 am y se analizaron mediante el método de aplastado descrito a continuación.

### **Método de aplastado para la determinación del número cromosómico en mitosis**

Este método fue descrito por Hernández desde 1984:

1. Obtención de meristemas. Se cortaron diez ápices radiculares de las plántulas tratadas con colchicina a las 10:30 am, por cada caja de Petri.
2. Fijación. Posteriormente se colocaron los ápices en tubos Eppendorf con fijador (3 etanol: 1 ácido acético) con el propósito de preservar la organización del tejido. Después de 24 horas como mínimo, se lavaron tres veces con agua destilada a intervalos de 30 minutos; al término de este tiempo se enjuagaron nuevamente.
3. Hidrólisis. Para hidrolizar los ápices se imbibieron 10 minutos en ácido clorhídrico al 0.1 N incubado previamente en baño María a 60 °C durante 15 minutos. Luego se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar el ácido y se dejaron nuevamente durante 30 minutos en agua destilada.
5. Tinción. Para teñir los meristemas se retiró el agua y se añadió colorante Feulgen por una hora y se conservó en carmín propiónico durante dos días para teñir el citoplasma y los cromosomas.
6. Procesamiento de meristemas. Se maceró finamente el meristemo sobre un portaobjetos con ayuda de un escalpelo y se colocó una pequeña gota de

acetocarmín. Se colocó un cubreobjetos sobre la preparación y se calentó cuidadosamente sobre la flama de un mechero de alcohol. Después se procedió a presionar el cubreobjetos, fuertemente con la yema del dedo pulgar sin movimientos laterales, sobre un papel filtro. Se colocó ácido acético al 45 % por los bordes del cubreobjetos y se le dio de nuevo calor para diferenciar el citoplasma de los cromosomas. En caso de burbujas de aire se agregó colorante por las orillas.

7. Observación microscópica. Cada laminilla se analizó con ayuda de un microscopio compuesto Carl Ziess, con iluminación Kolher para evaluar cambios en el número cromosómico en cinco células en metafase por cada meristemo como mínimo. Las células se clasificaron de acuerdo a su número cromosómico en: diploides, tetraploides y poliploides mayores (2x, 4x y mayores a 4x, respectivamente).

Se consideraron deseables aquellos casos donde se observaron un número de 68 cromosomas.

### **Microfotografía**

Las microfotografías son una herramienta de gran utilidad para imprimir en papel lo que estamos observando en el microscopio y facilitar su análisis. Después de la elaboración de las preparaciones, se tomaron las fotografías a color con cámara digital Pixera Viewfinder acoplada a un microscopio Vista Vision con intensidad de luz y contraste adecuado, con el

objetivo de 100 X. Las imágenes se almacenaron en la computadora y se confeccionaron mediante un software.

### **Análisis meióticos**

Para llevar a cabo este análisis se siguió la técnica descrita a continuación (Hernández, 1984).

1.- Obtención del material. Se colectaron los botones florales de ambos progenitores con ayuda de una navaja entre 10 y 11 am, el cual es un horario en el que generalmente se encuentra división celular.

2. Fijación. Al colectarse las inflorescencias, se colocaron en pequeños frascos con fijador Farmer (3 etanol: 1 ácido acético) con la finalidad de matar instantáneamente el tejido y fijar las fases de la división celular sin que se deteriore el botón. Las inflorescencias permanecieron en fijador durante un día.

3. Procesamiento de anteras. Se enjuagó el botón con agua destilada y se diseccionó en una caja de Petri para extraer las flores. Se colocaron 2 o 3 florecillas sobre un portaobjetos y con ayuda de un estereoscopio se aislaron las anteras, en seguida se colocó una gota de acetocarmín y se maceraron las anteras para expulsar los microsporocitos. Se retiró la envoltura de la antera y se colocó un cubreobjetos. Se calentó a 40 °C sobre una parrilla durante un minuto para la coloración. Después se aplastó fuertemente con el

dedo pulgar y se adicionó una gota de ácido acético al 45 % por las orillas del cubreobjetos.

4. Observación microscópica. Se observaron los cromosomas mediante la ayuda de un microscopio óptico con el objetivo de 100 x y se determinó el número cromosómico en cinco células en diacinesis, por cada tratamiento. Por último se tomaron microfotografías para analizar los apareamientos cromosómicos.

### **Mediciones fenotípicas**

Una vez que las plantas conservadas en vivero se desarrollaron por completo se tomaron medidas de las siguientes variables morfológicas: altura de planta (AP), ancho de hoja (AH), longitud de hoja (LH), longitud de pedúnculo (LPED), diámetro de disco (DISCO) y diámetro de capítulo (DCAP). Se compararon los datos con un testigo y se analizaron por medio de la prueba de *t* student para encontrar diferencias estadísticas significativas, con un intervalo de confianza del 95 %, calculada para cada tratamiento y para cada variable a través del software R versión 2.7.0. (R Development Core Team, 2008).

### **Análisis de viabilidad del polen**

Se cubrieron los capítulos al iniciar la floración para evitar contaminación. Se colectó el polen de flores en anthesis en cajas de Petri alrededor de las 12 am. La estimación de polen viable se hizo con la técnica

descrita por Jackson (1988), basada en el uso del colorante citoplásmico Buffalo Black NBR, el cual es una solución con 0.01% de colorante y 45% de ácido acético, en agua destilada.

Se colocó una gota del líquido indicador y una pequeña cantidad de polen, se dispersó y se dejó reposar 20 segundos. Se realizaron dos conteos al microscopio de 100 granos de polen para estimar el porcentaje de viabilidad en cada tratamiento. Se tomó como viable (no abortivo) el grano teñido uniformemente de color azul intenso.

#### **b) Tratamientos en el híbrido**

Una vez que se obtuvo la concentración mas adecuada para la duplicación cromosómica en los progenitores, se procedió a tratar la semilla del híbrido obtenida en el 2005, en el campo experimental Buenavista.

#### **Cultivo *in vitro***

La semilla híbrida fue sembrada *in vitro* para evitar mosaicismos y obtener mayor cantidad de plántulas.

Se prepararon para esto las soluciones madre para la composición del medio basal Murashige Skoog (Cuadro 3.2) el cual requiere: macronutrientes (30 ml L<sup>-1</sup>), micronutrientes (10 ml L<sup>-1</sup>), fierro (10 ml L<sup>-1</sup>) y vitaminas (10 ml L<sup>-1</sup>).

**Cuadro 3.2.** Composición basal de las soluciones madre para la preparación del medio de cultivo Murashige Skoog (1962).

COMPUESTO	POR LITRO	COMPUESTO	POR LITRO
<b>Macronutrientes</b>		<b>Solución de hierro</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00 mg	Na <sub>2</sub> EDTA	37.30 mg
KNO <sub>3</sub>	1,900.00 mg	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27.80 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440.00 mg		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00 mg		
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370.00 mg		
<b>Micronutrientes</b>		<b>Vitaminas</b>	
KI	830.00 ug	Inositol	100.00 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20 mg	Ácido nicotínico	0.50 mg
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	17.00 mg	Piridoxina – HCl	0.50 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6 mg	Tiamina – HCl	0.10 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	250.00 ug	Glicina	2.00 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	25.00 ug		
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	25.00 ug		

Se prepararon tres medios de cultivo (Cuadro 3.3) para el desarrollo de las semillas hasta plantas completas:

- 1) Medio 1 enriquecido con bencilaminopurina (BAP) y aminoácidos para la emergencia del embrión,
- 2) Medio 2 para lograr la propagación de la planta. En esta etapa se aplicó el tratamiento de colchicina,
- 3) Medio 3 enriquecido con ácido naftalenacético (ANA) para inducir el enraizamiento.
- 4) Se prepararon para esto las soluciones madre para la composición del medio basal Murashige Skoog (Cuadro 3.2) el cual requiere: macronutrientes (30 ml L<sup>-1</sup>), micronutrientes (10 ml L<sup>-1</sup>), hierro (10 ml L<sup>-1</sup>) y vitaminas (10 ml L<sup>-1</sup>).

**Cuadro 3.3.** Medios nutritivos usados para obtener plantas completas de híbridos F<sub>1</sub> de *H. annuus* (CMS HA 89) x *T. rotundifolia* (accesión 26) por medio de la técnica de rescate de embriones.

COMPONENTES	MEDIOS		
	I	II	III
Sales g L <sup>-1</sup>	MS*	MS	MS
Vitaminas g L <sup>-1</sup>	MS	MS	-
Aminoácidos g L <sup>-1</sup>	+	-	-
Sacarosa g L <sup>-1</sup>	90	30	20
6-BAP g L <sup>-1</sup>	0.0005-0.001	0.0001-0.0005	-
ANA g L <sup>-1</sup>	-	-	0.0001
Agar g L <sup>-1</sup>	6	9	9
pH	5	5	5

MS\* Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Se desinfectaron seis semillas del híbrido en la campana de flujo laminar, con alcohol etílico al 70% por un minuto, el cual es un agente esterilizador común de la superficie que elimina bacterias y hongos.

Se transvasaron después a una solución de hipoclorito de sodio al 1% (20 mL de cloro en 100 mL de agua estéril) durante 15 minutos para que se fije a la superficie de las semillas.

Se lavaron cuidadosamente las semillas con tres cambios de agua destilada para eliminar completamente el desinfectante y se sembraron en seguida en el Medio 1 (MSI) enriquecido con aminoácidos (Cuadro 3.4).

**Cuadro 3.4.** Cantidad de aminoácidos en  $\text{mg L}^{-1}$  adicionados al medio de cultivo número uno.

<b>Aminoácidos</b>	<b>(<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>
Inositol	3.90
Alanina	1.00
Glutamina	0.80
Triptófano	0.05
Cisteína	0.01
Serina	0.16

Por último se cubrió cada frasco con aluminio para la germinación de la planta y se llevó al cuarto de incubación a  $25^{\circ}\text{C}$  para después transvasar los explantes a los distintos medios de cultivo de acuerdo a su etapa de desarrollo.

#### **Tratamiento en semilla**

Se desinfectaron 5 semillas del híbrido con cloro al 1%. Al segundo día las semillas empezaron a germinar y se les aplicó  $200 \text{ mg L}^{-1}$  colchicina durante 5 horas.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a) Tratamientos en los progenitores

#### Análisis mitóticos

El tratamiento de colchicina fue más efectivo cuando la longitud de hipocótilos creció 5 milímetros aproximadamente. Después de afinar la técnica del aplastado y de muchas pruebas para determinar la hora de mayor actividad mitótica, se encontró que el mejor horario para los cortes de meristemas fue de 10:30 a 11:00 am.

En el primer experimento realizado el 28 de octubre de 2008 se evaluó la tasa de germinación de los progenitores sin ningún tratamiento, que fue de 85% en promedio para *H. annuus* (HA) y de 25% para *T. rotundifolia* (TR).

Se trataron después 20 semillas por cada tratamiento, en este caso solamente de *H. annuus* y no se tomaron datos fenotípicos por que las plantas crecieron poco debido a la temporada de invierno. Las semillas desarrollaron cotiledones gruesos e hipocótilos cortos e hinchados como respuesta al estrés abiótico.

Los resultados de los análisis mitóticos se muestran en el Cuadro 4.1, donde podemos observar que no hay un patrón en el porcentaje de poliploidía al aumentar las concentraciones. En el caso de la variable Supervivencia, se refiere al porcentaje de plantas que sobrevivieron en vivero y la variable Poliploidía representa el porcentaje de células con duplicación cromosómica observadas.

**Cuadro 4.1.** Resultados de los análisis mitóticos en HA 89 del experimento 1, con un tiempo de exposición a la colchicina de 5 horas.

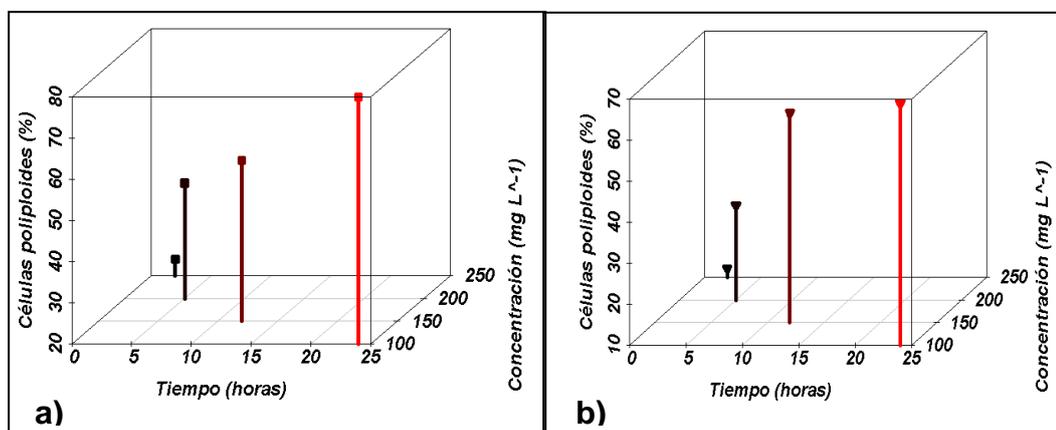
Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Supervivencia (%)	Poliploidía (%)
100	60	50
150	100	0
200	33	55

En el segundo experimento realizado el 09 de marzo de 2009, se modificaron los tiempos y se correlacionaron negativamente con la concentración para no afectar la supervivencia (Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2.** Resultados de los análisis mitóticos del experimento 2.

Tiempo (h)	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Supervivencia (%)	Poliploidía (%)	Supervivencia (%)	Poliploidía (%)
		HA		TR	
24	100	15	80	0	69
12	150	0	59	0	61
5	200	15	48	10	33
2	250	10	24	0	12

En la Figura 4.1 se puede observar que el incremento en la poliploidía se debe principalmente al incremento en el tiempo de exposición a la colchicina en las dos especies.



**Figura 4.1.** Experimento 2. Efecto de la concentración y el tiempo en el porcentaje de células poliploides en: a) *H. annuus*. y b) *T. rotundifolia*.

En el tercer experimento (25 de marzo de 2009) se eliminaron las concentraciones que mostraron bajo porcentaje de sobrevivencia en el experimento 2.

A partir de los resultados mitóticos podemos observar que para la variable poliploidía, el tiempo juega un papel importante al incrementar el porcentaje de células poliploides, pero al mismo tiempo disminuye el porcentaje de plantas sobrevivientes (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3.** Resultados de los análisis mitóticos del experimento 3.

Tiempo (h)	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)
		HA		TR	
24	100	10	79	0	60
5	200	25	44	20	33

En el cuarto experimento (09 de abril de 2009) se usó únicamente la concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  por que presentó buenos porcentajes de poliploidía y se disminuyeron un poco las horas para aumentar la sobrevivencia; al mismo tiempo se sembraron mas semillas (50 por cada tratamiento) para aumentar la probabilidad de éxito.

En esta ocasión se obtuvieron plántulas sobrevivientes de *T. rotundifolia* debido al aumento en el número de semillas plantadas (Cuadro 4.4), sin embargo en la mayoría de los experimentos se observa que *T. rotundifolia* presenta porcentajes de sobrevivencia y poliploidía menores que HA 89.

**Cuadro 4.4.** Resultados de los análisis mitóticos del experimento 4.

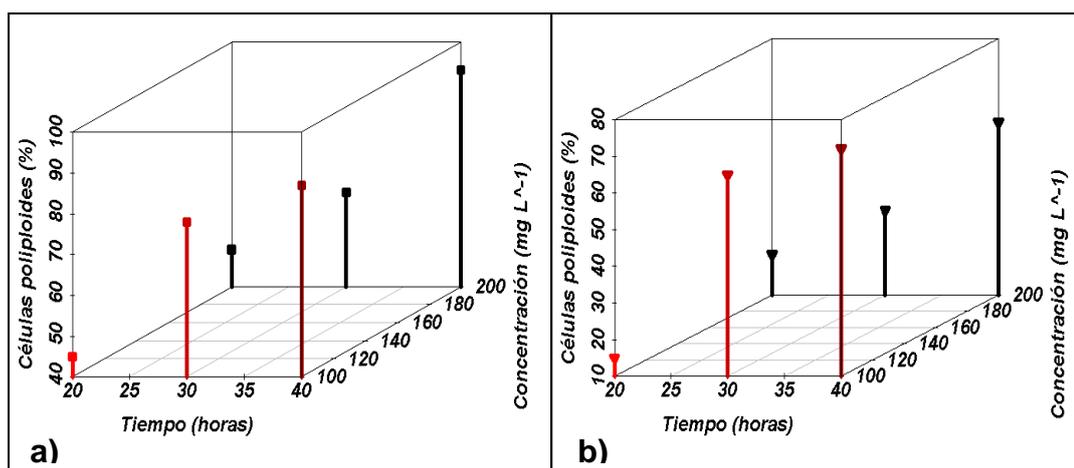
Tiempo (h)	Concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)
		HA		TR	
20	100	31	73	3	58

En el quinto experimento (11 de mayo de 2009) se aumentaron las horas de exposición a la colchicina para aumentar el porcentaje de poliploidía, debido a que los análisis meióticos de los experimentos anteriores revelaron que ninguna planta completa conservaba la poliploidía (Cuadro 4.5).

**Cuadro 4.5.** Resultados de los análisis mitóticos del experimento 5.

Tiempo (h)	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	HA		TR	
		Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)
20	100	20	45	10	15
30	100	0	78	0	65
40	100	0	87	0	72
20	200	15	49	10	21
30	200	0	63	0	33
40	200	0	93	0	57

En este experimento nuevamente se observó un aumento en la poliploidía al aumentar el tiempo de exposición (Figura 4.2). Sin embargo arriba de 30 horas ninguna planta sobrevivió.

**Figura 4.2.** Experimento 5. Efecto de la concentración y el tiempo en el porcentaje de células poliploides en: a) *H. annuus*.y b) *T. rotundifolia*.

En el sexto experimento llevado a cabo el 21 de julio, se aumentaron las horas de exposición y se disminuyó la concentración considerablemente. Esto originó gran cantidad de cromosomas muy delgados (Cuadro 4.6).

**Cuadro 4.6.** Resultados de los análisis mitóticos del experimento 6.

Tiempo (h)	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	HA		TR	
		Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)
72	10	36	53	0	48
72	20	24	62	0	55

Los resultados de los seis experimentos se promediaron para ambas especies (Cuadro 4.7). Para seleccionar el mejor tratamiento se tomó en cuenta principalmente el porcentaje de células tetraploides (Fotografías en Anexo A2) y el porcentaje de sobrevivencia.

**Cuadro 4.7.** Porcentaje de células para los diferentes niveles de poliploidía en mitosis promediado para HA 89 y *T. rotundifolia* en los distintos tratamientos.

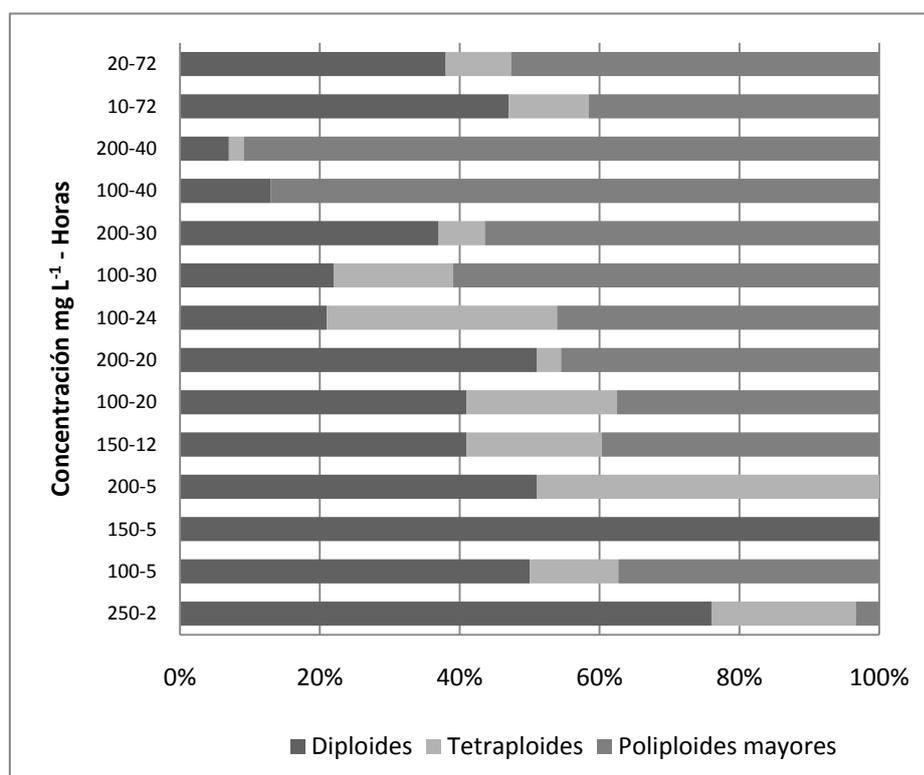
Concentración-Tiempo (mg L <sup>-1</sup> – h)	Sobrevivencia (%)	Poliploidía (%)	Poliploides Mayores (%)	Tetraploides (%)	T/%P	Diploides
250-2	7	20	11	9	0.45	80
200-5	20	43	6	36	0.85	58
150-12	0	60	26	34	0.57	40
100-24	8	73	40	33	0.45	27
100-20	17	48	23	25	0.52	52
100-30	0	74	50	23	0.32	26
100-40	0	84	63	21	0.25	16
200-20	13	40	31	9	0.23	60
200-30	0	53	41	12	0.22	47
200-40	0	81	75	6	0.08	19
10-72	18	51	35	16	0.32	49
20-72	12	59	45	14	0.23	41

Es importante resaltar que el porcentaje de germinación de las plantas tratadas con colchicina fue muy baja (máxima 20 %) en comparación con los testigos (55 % en promedio).

El tratamiento con el mayor porcentaje de células tetraploides se presentó a 200 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante 5 horas con un 36 % y con el

mayor porcentaje de sobrevivencia de 20 %. Este tratamiento es muy parecido al empleado por Jan y Chandler (1983) excepto por el uso de DMSO, quienes obtuvieron éxito en la inducción de plantas tetraploides, sin embargo la aparición de mosaicos en el presente estudio concuerda con Downes y Marshall (1983).

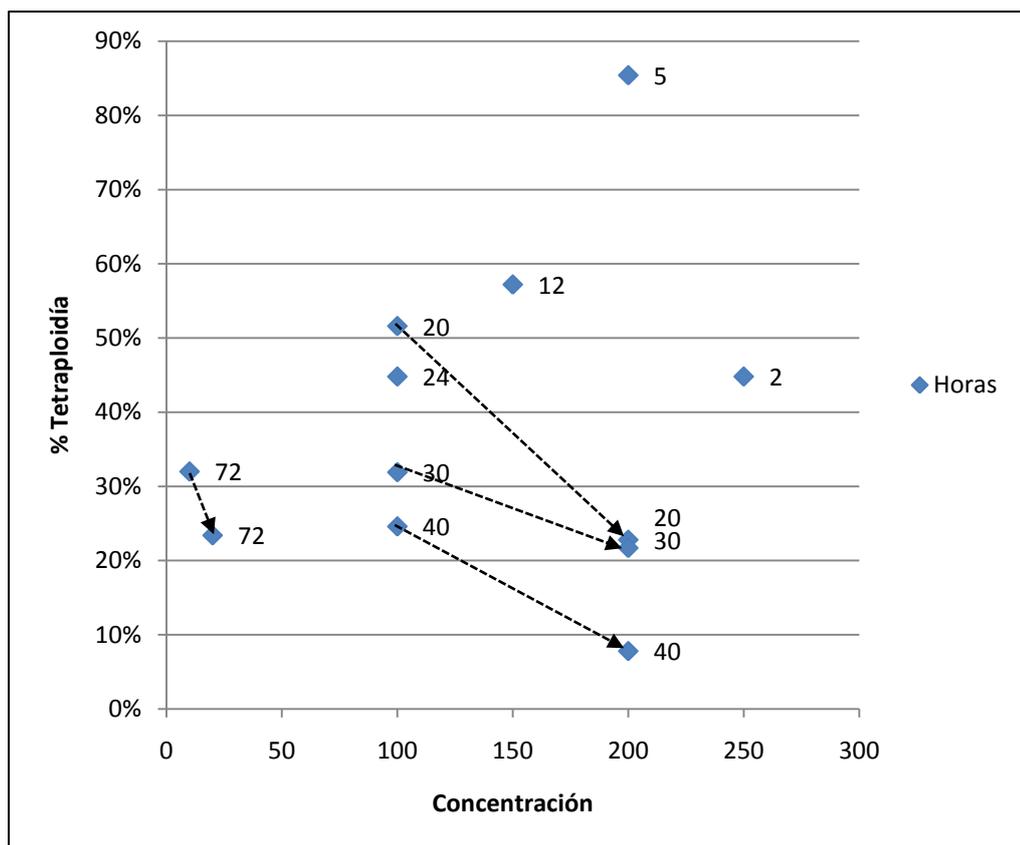
En todos los tratamientos se detectaron mosaicismos, con dos o más niveles de ploidía, además se observó una ligera tendencia en el incremento del porcentaje de células poliploides en mitosis al aumentar las horas de exposición a la colchicina, con un coeficiente de determinación de Pearson igual a 0.46 (Figura 4.3) y con una significancia de  $p= 0.09$ .



**Figura 4.3.** Porcentajes de células para los distintos niveles de ploidía para cada tratamiento, promediado para ambas especies.

El gran inconveniente de los tiempos prolongados de exposición a la colchicina fue la inducción de células con niveles de ploidía elevados y en algunos casos la no sobrevivencia de plantas.

En la Figura 4.4 se observa que cuando se aumentaron las horas de exposición en una dosis el porcentaje de células tetraploides disminuyó; además al comparar las dosis de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> con horarios iguales se dedujo que también al aumentar la concentración se disminuyó el porcentaje de tetraploides.



**Figura 4.4.** Fracción de células tetraploides / poliploides observadas en los distintos experimentos, promediados para HA 89 y *T. rotundifolia*.

El coeficiente de correlación entre la concentración de colchicina y la poliploidía fue de -0.24 con una significancia de  $p = 0.41$ , lo cual se puede deber al diseño del experimento, ya que a concentraciones altas los tiempos de exposición fueron cortos con el fin de no dañar el desarrollo de la plántula.

La variable del tiempo reflejó un mayor impacto en la inducción de poliploidía, sin embargo existe un gran reto: aumentar el porcentaje de tetraploides y disminuir al máximo la frecuencia de poliploides mayores. Lo anterior quizá se puede lograr al aumentar un poco el tiempo (mayor que 5 horas) en el tratamiento de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

Otra estrategia para aumentar el porcentaje de poliploidía y sobrevivencia en las plantas tratadas es la adición de dimetilsulfóxido al 2 %, el cual funciona como acarreador de drogas como la colchicina, para facilitar que penetre rápidamente a la célula y así evitar la sobreexposición de la plántula a este químico.

### **Análisis meióticos**

En el Cuadro 4.8 se muestran los tratamientos que se evaluaron en meiosis. Este análisis reveló que ninguna de las plantas maduras tratadas presentaron duplicación cromosómica en diacinesis, solo se observaron microsporocitos diploides con configuraciones bivalentes (Fotografías en Anexo A3).

El restablecimiento del nivel de ploidía se debió probablemente a la presencia de mosaicismos en mitosis en conjunto con el crecimiento de las

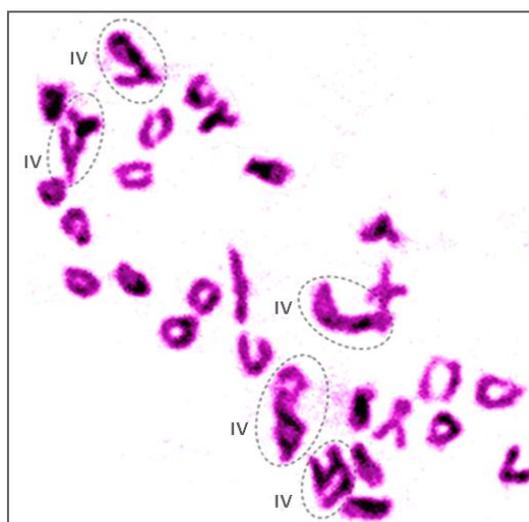
raíces posteriores que implican ciclos sucesivos de división celular. Lo anterior es muy común cuando los tratamientos se aplican en plántula en donde no existe una gran cantidad de células en división.

**Cuadro 4.8.** Fracción de células poliploides/células observadas en diacinesis, en los análisis meióticos para cada tratamiento.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo (h)	Fracción de Poliploides HA 89	Fracción de Poliploides <i>T. rotundifolia</i>
10	72	0/18	NS*
20	72	0/12	NS
100	20	0/15	0/8
100	24	1/11	NS
200	5	0/7	0/5
250	2	0/3	NS

\*NS= No Sobrevivieron en vivero

Solamente en el tratamiento de *H. annuus* con 100 mg L<sup>-1</sup> durante 20 horas se logró observar una célula duplicada (Figura 4.5), con 24 cromosomas bivalentes y 5 cromosomas cuadrivalentes (24 II + 5 IV).



**Figura 4.5.** Célula tetraploide en diacinesis de *H. annuus* duplicada con 100 mg L<sup>-1</sup> de colchicina, durante 20 horas (2n = 68 = 24 II + 5 IV).

El tipo de apareamiento cuadrivalente es normal en especies tetraploides debido a la homología múltiple de los cromosomas; sin embargo en el mismo botón también se detectaron grandes cantidades de células diploides, por lo tanto la planta tampoco se consideró poliploide. Este hallazgo reveló que el efecto de la colchicina puede prevalecer hasta la fase de diacinesis lo que abre la posibilidad de seguir explorando con nuevos tratamientos de colchicina hasta obtener el 100% de duplicación en meiosis, por lo que se sugiere emplear un número de muestra más grande, pues el éxito en la duplicación cromosómica ocurre en muy bajo porcentaje.

Es importante señalar que no todos los tratamientos fueron evaluados hasta esta etapa debido a la no sobrevivencia de plantas y por la misma razón el número de microsporocitos analizados fue muy pequeño, además de presentar poca división celular en diacinesis.

### **Mediciones fenotípicas**

Se determinaron los promedios de las variables fenotípicas para cada tratamiento y se compararon con un testigo de acuerdo a la temporada de siembra: primavera o verano (Cuadro 4.9).

A través de la prueba de *t* student con un nivel de confianza de 95% se detectó que en ningún tratamiento ni en ninguna variable se presentaron diferencias estadísticas importantes.

**Cuadro 4.9.** Mediciones fenotípicas promediadas para cada tratamiento con colchicina en HA 89 y *T. rotundifolia* no significativas al 5% de probabilidad.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo (h)	AP (cm)	AH (cm)	LH (cm)	LPED (cm)	DISCO (cm)	DCAP (cm)
<b><i>H. annuus</i> (Primavera)</b>							
100-24	24	55.25	4.45	6.78	1.63	3.43	9.00
100-20	29	53.23	4.74	7.60	1.84	3.07	7.94
200-5	5	53.86	4.97	7.76	2.07	3.34	9.49
250-2	2	53.54	4.85	7.68	1.96	3.21	8.71
Testigo	0	54.00	5.05	7.40	1.80	3.10	8.20
<b><i>H. annuus</i> (Verano)</b>							
10-72	72	32.50	2.75	4.10	1.25	1.75	6.00
20-72	72	46.68	4.22	6.39	1.67	2.69	7.64
Testigo	0	31.00	2.60	3.60	1.30	1.80	6.00
<b><i>T. rotundifolia</i> (Primavera)</b>							
100-20	20	147.00	6.40	7.07	6.67	1.87	6.33
200-5	5	89.00	4.50	5.33	3.98	1.83	6.17
Testigo	0	148.00	6.80	7.50	7.40	2.10	6.80

AP = altura de planta; AH = ancho de hoja, LH = longitud de hoja, LPED = longitud de pedúnculo, DISCO = diámetro de disco; DCAP = diámetro de capítulo.

En plantas autoploiploides de *H. annuus* var. morden se ha reportado una reducción en la altura de planta, tamaño de la hoja y tamaño de la flor (Srivastava y Srivastava, 2002), por lo tanto para los tratamientos probados en este estudio se descartó la presencia de plantas tetraploides,

### Análisis de viabilidad del polen

Las comparaciones de fertilidad de polen entre las distintas concentraciones se realizaron en base a un promedio ponderado (Cuadro 4.10).

En el caso de *T. rotundifolia* no se obtuvieron suficientes datos para someterse a un análisis debido a la poca sobrevivencia de las plantas.

**Cuadro 4.10.** Promedio de fertilidad del polen de las plantas sobrevivientes de HA 89 y *T. rotundifolia* en los distintos tratamientos.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo (h)	Plantas de HA 89	Fertilidad HA 89 (%)	Plantas de <i>T. rotundifolia</i>	Fertilidad <i>T. rotundifolia</i> (%)
10	72	2	100	0	NS*
20	72	2	50	0	NS
100	20	31	70	3	96
100	24	4	49	0	NS
200	5	7	24	3	97
250	2	2	4	0	NS

\*NS= No Sobrevivieron en vivero.

Para evaluar la fertilidad del polen en *H. annuus* se efectuó un análisis de correlación de Pearson entre la concentración de colchicina y el porcentaje de granos de polen fértiles y se determinó un coeficiente de -0.86 con un alto nivel de significancia ( $p= 0.02$ ), lo que indica que a medida que se aumentó la concentración del alcaloide la fertilidad disminuyó. Esta disminución se atribuyó a un estrés fisiológico generado por las altas concentraciones de colchicina y al proceso de restablecimiento del nivel diploide lo cual generó algunas plantas con androesterilidad y baja producción de polen, no obstante este efecto secundario no se ha podido explicar científicamente en plantas diploides.

Otra posibilidad que aun no puede ser descartada debido al tamaño de muestra reducido, es la presencia de células tetraploides con configuraciones cuadrivalentes, las cuales disminuyen la viabilidad del polen (Srivastava y Srivastava, 2002).

## **b) Tratamientos en el híbrido**

### **Cultivo *in vitro***

Seis semillas desarrollaron callo al segundo día de haber sembrado los híbridos en el Medio 1; al quinto día se observó el desarrollo de los cotiledones y a los 15 días dos plántulas presentaron una infección caracterizada por la presencia de un exudado lechoso, por lo que se trataron con cloro al 1% y sin embargo no sobrevivieron. Las cuatro plántulas restantes a los 22 días estaban listas para transvasarse al Medio 2 para micropropagación.

Se realizó una serie de transvases a partir de las 4 plántulas hasta obtener 30 explantes, sin embargo estos propágulos también presentaron una infección persistente y fueron transvasados y desinfectados durante 75 días cada vez que reincidía la enfermedad, quedando solamente 7 frascos. Se transvasaron los explantes a Medio 2 enriquecido con glicina, con la finalidad de fortalecer a la planta y cambiar las condiciones del medio de cultivo y así evitar la propagación de la infección. De este transvase se originaron 20 explantes y para los 8 días la enfermedad volvió a aparecer.

Se transvasaron nuevamente los explantes pero esta vez se adicionó al medio de cultivo ciprofloxacina, antibiótico de amplio espectro en tres distintas concentraciones: 1, 2 y 10 mg L<sup>-1</sup>.

Este tratamiento se empleó hasta esta fase debido a que en cultivo de tejidos vegetales, los antibióticos solo son empleados cuando los microorganismos no pueden ser eliminados por otros métodos. Estos compuestos son caros y no existe ninguno que sea efectivo para controlar todos los organismos contaminantes (Reed y Tanprasert, 1995).

La concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de ciprofloxacina mostró mayor efectividad al retardar la aparición de la enfermedad sin embargo las plantas presentaron hiperhidracidad y murieron.

Después de 8 días la enfermedad reincidió en los demás tratamientos, quedando solamente 5 explantes, los cuales fueron transvasados al Medio 3, sin embargo ninguno de ellas prosperó debido a la aparición de nuevos patógenos.

Debido al éxito no obtenido en cultivo *in vitro*, se sugiere la aplicación de nuevos antibióticos u otros tratamientos, así como la modificación de la técnica de asepsia y composición de los medios de cultivo, que posibiliten la generación de explantes sanos que puedan ser tratados con colchicina. Esta técnica es la más efectiva en la generación de tetraploides sin la presencia de quimeras, además de incrementar el material vegetal, lo cual es muy conveniente en este caso debido a que se cuenta con muy poca semilla híbrida. Una ventaja más es la posibilidad de contar con un gran número de tratamientos, lo que aumentaría enormemente la posibilidad de éxito.

### **Tratamiento en semilla**

La semilla híbrida presentó bajo porcentaje de germinación (40%) combinado con la presencia de enfermedades aun después de desinfectar la semilla con una solución al 1 % de hipoclorito de sodio.

Después de siete días de haber sembrado cinco semillas en cajas de Petri, solamente dos germinaron y se trataron con 200 mg L<sup>-1</sup> colchicina durante 5 horas, sin embargo a los dos días ambas se necrosaron y murieron.

Nuevamente se sembraron cinco semillas híbridas en cajas de Petri, previamente tratadas con lombricomposta estéril al 10 % durante 10 minutos, para fortalecer a la semilla y lograr su germinación. A la par se sembraron cinco semillas en tierra estéril para comprobar la germinación de la semilla sin tratamiento.

A los 8 días emergieron 2 plántulas sanas sembradas en tierra. De las plántulas tratadas con lombricomposta germinaron tres y estas fueron tratadas nuevamente con 200 mg L<sup>-1</sup> colchicina durante 5 horas, dos de ellas se necrosaron y la tercera murió al transplantarse a vaso.

En base a estos resultados es necesario realizar nuevas técnicas de asepsia de la semilla para aumentar la sobrevivencia de la plántula, además,

en lugar de sembrar la plántula tratada en suelo, pudiera rescatarse por medio de cultivo *in vitro*.

## V. CONCLUSIONES

Los tratamientos con colchicina evaluados en *T. rotundifolia* y *H. annuus*, mostraron toxicidad para las células y esto provocó una fuerte reducción en la supervivencia de las plántulas.

Entre los tratamientos probados, el más efectivo para la inducción de células tetraploides resultó ser el de 200 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante 5 horas con el 34 % de células tetraploides. Los tiempos prolongados de exposición a la colchicina tuvieron mayor impacto en la inducción de niveles de ploidía elevados.

La viabilidad del polen disminuyó a altas concentraciones de colchicina lo que puede deberse a cambios en la fisiología de la planta debidos al mosaicismo producido por la colchicina.

La obtención de plantas tetraploides en los progenitores no fue posible al 100 %, por lo tanto los tratamientos probados en el presente trabajo solamente generaron mosaicos cromosómicos en mitosis y esto hizo que la planta recobrara su nivel diploide en meiosis.

## VI. RESUMEN

El cruzamiento intergenérico entre *Helianthus annuus* y *Tithonia rotundifolia* produce híbridos estériles debido a incompatibilidad cromosómica. El objetivo del presente trabajo fue restaurar la fertilidad del híbrido a través del uso de colchicina para generar tetraploides. Para lograr esto se realizaron tratamientos preliminares con los progenitores mediante la exposición de meristemas a la colchicina a distintos tiempos (2, 5, 12, 20, 24, 30, 40 y 72 h) y a distintas concentraciones (10, 20, 100, 150, 200 y 250 mg L<sup>-1</sup>).

A partir de las observaciones mitóticas de ambos progenitores mediante el método de aplastado, se determinó que el mejor tratamiento fue de 200 mg L<sup>-1</sup> durante 5 h con un 36 % de células tetraploides, sin embargo todos los tratamientos mostraron mosaicos, situación que probablemente originó el restablecimiento del nivel diploide en los progenitores, comprobado mediante análisis meiótico en diacinesis.

En conclusión la obtención de plantas tetraploides en los progenitores no fue posible bajo los tratamientos probados en este estudio, debido a un efecto parcial de la colchicina aplicada en ápices radiculares, que produjo mosaicismo en los tejidos.

## VII. LITERATURA CITADA

ASERCA. 2009. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, México. <http://www.aserca.gob.mx>

Atlagic, J. and D. Skoric. 1999. Cytogenetic study of *Helianthus laevigatus* and its F<sub>1</sub> and BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> hybrids with cultivated sunflower, *Helianthus annuus*. Plant Breeding 118: 555-559.

Bhojwani, S.S. 2004. *In vitro* production of triploid plants. In: Goodman RM Encyclopedia of plant and crop science. Marcel Dekker, New York, p. 590–593.

Blakslee, A.F. and A.G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosome in plants by treatment with colchicine. Journal of Heredity 28: 393-411.

Burun Betül and U. Emiroglu. 2008. A comparative study on colchicine application methods in obtaining doubled haploids of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Turk J Biol. 32:105-111.

Chiltern Seed Company, Catálogo 2009 <http://www.chilternseeds.co.uk>

Comité Nacional Sistema Producto Oleaginosas (CONASIPRO), 2008.

Cristov, M. and L. Panayotov. 1991. Hybrids between the genera *Helianthus* and *Tithonia* and their study. Helia 14: 27-34.

Downes, R.W. and D.R. Marshall. 1983. Colchicine induced variants in sunflower. Euphytica 32: 757-766.

- George T.S., P.J. Gregory, J.S. Robinson, R.J. Buresh and B.A. Jama. 2001. *Tithonia diversifolia*: variants in leaf nutrient concentration and implications for biomass transfer. *Agroforestry Systems* 52:199-205.
- Gómez Martínez, M. 2009. Análisis meiótico y rescate de embriones de híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia*. Tesis. Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 42 p.
- Gómez Sánchez, D. and S. González Elizondo 1994. Localization of *Helianthus*, *Siguiera* and *Tithonia* genera in Mexico. In: Seiler, G.J. FAO working group: evaluation of wild *Helianthus* species. pp 134-150.
- Grzebelus E. and A. Adamus 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. *Plant Science* 167 (3): 569-574.
- Hague, L.M. and R.N. Jones. 1987. Cytogenetics of *Lolium perenne*. Colchicine induced variation in diploids. *Theor. Appl. Genet.* 74: 233-241.
- Harter, A. V., K. A. Gardner, , D. Falus, D. L. Lentz, R. A. Bye and L. H. Rieseberg. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America *Nature* 430: 201-205.
- Heiser, C.B. and D.M.Smith. 1955. New chromosome numbers in *Helianthus* and related genera. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 64: 250-253.
- Hernández Segura, M. 1984. Manual de laboratorio. Citología y Citogenética. UAAAN. Coahuila, México.
- Jackson, R.C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). *Amer. J. Bot.* 75: 219-222.
- Jackson, R. C. and B. G. Murray. Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.* 64 (3): 219-222.
- Jan, C.C. and J.M. Chandler. 1989. Sunflower interspecific hybrids and amphiploids of *Helianthus annuus* x *H. bolanderi*. *Crop Sci* 29: 643-626.

- Lavana, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. *Plant Genetic Resources* 3: 170-177.
- Lentz, D.L., M. DeLand, J. Alvarado, T. Somayeh and R. Bye. 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *PNAS* 105: 6232-6237.
- Levin, D.A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press.
- Lewis, R.J. 2009. *Hawey Diccionario de Química y Productos Químicos*. Ediciones Omega, 1512 págs.
- Liu Guofeng, Li Zhineg and Bao Manzhu. 2007. Colchicine-induced chromosome in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157:145-154.
- Liu, X.Z., H. Lin, X. Y. Mo, T. Long and H. Y. Zhang. 2009. Genetic variation in colchicine-treated regenerated plants of *Eucalyptus globulus* Labill. *Journal of Genetics* 8 (3): 345-349.
- Muntzing, A. 1974. Historical review of the development of triticales. In: *Triticale proceedings of an international symposium, El Batán, México, 1-3 October 1973*. Tnt. Develop. Res. Centre Monogr. p. 13-30.
- Murashige T. and F. Skoog .1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- ONU. 2006. Organización de las Naciones Unidas. <http://unstats.un.org>
- Omidbaigi R., M. Mirzaee, M.E. Hassani and M.S. Moghadam. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production* 4(2): 87-98.
- Pandey, R. M. 1993. Reduced quadrivalent frequency in C<sub>1</sub> colchipooids of *Tithonia*. *Indian J Genet Plant Breed* 53: 351-355.

- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Viena Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-Project.org>.
- Rauf Saeed, I. Ahmad Khan and F. Ahmad Khan. 2006. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossipyum arboreum* L. Turk J Biol 30: 93-100.
- Reed, B.M. and P. Tamprasert. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1: 137-142.
- Reyes Valdés, M.H., M. Gómez Martínez, O. Martínez and F. Hernández Godínez. 2005. Intergeneric hybrid between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Tithonia rotundifolia* (Mill.) Blake. Helia 28: 61-85.
- Röber, F.K., G.A. Gordillo and H.H. Geiger. 2005. In vivo haploid induction in maize performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. Maydica 50:275-283.
- Rodríguez B. and M. Porras. 1996. Botánica sistemática. Compilación. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Rzedowski, J. 1995. Aspectos de las plantas ornamentales de México. Rev. Chapingo. Serie Horticultura. Vol. I: 5 – 7.
- SIAP, 2009. Servicio de Información Agrícola y Pecuario, México. <http://siap.sagarpa.gob.mx>.
- Shahriari-Ahnmadi F., E. Dehghan, M. Farsi and M. Azizi. 2008. Tetraploid Induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal Biological Sciences 11: 2653-2659.
- Shunji Ch, I. Miyashita and M. Mii. 2009. *In vitro* induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium ashei*) with colchicine treatment. Scientia Horticulturae 122 (3): 375-379.

- Srivastava R. and G.K Srivastava. 2002. Autopolyploids of *Helianthus annuus* L. var. morden. *Cytologia*, Japan 67: 213-220.
- Traut H. and U. Sommer. 1976. The induction of chromosome loss and gain by colchicine. *Muench. Med. Wochenschr.* 118: 1113–1116.
- Tuyl, J.M., B. Meijer and P.D Maria.1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in-vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine* ISHS. *Acta Horticulturae*, VI International Symposium on Flower Bulbs 325: 112-114.
- Urwin, A.R., Jennie Horsnell and Therese Moon. 2007. Generation and characterization of colchicines-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica* 156:257-266.
- Wan, Y., J.F. Petolino and J.M. Widholm. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 77: 889–892.
- Yang, X. M., Z. Cao, L. Z. An, Y. M. Wang and X.W. Fang. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152:217-224.

## **VIII. ANEXOS**

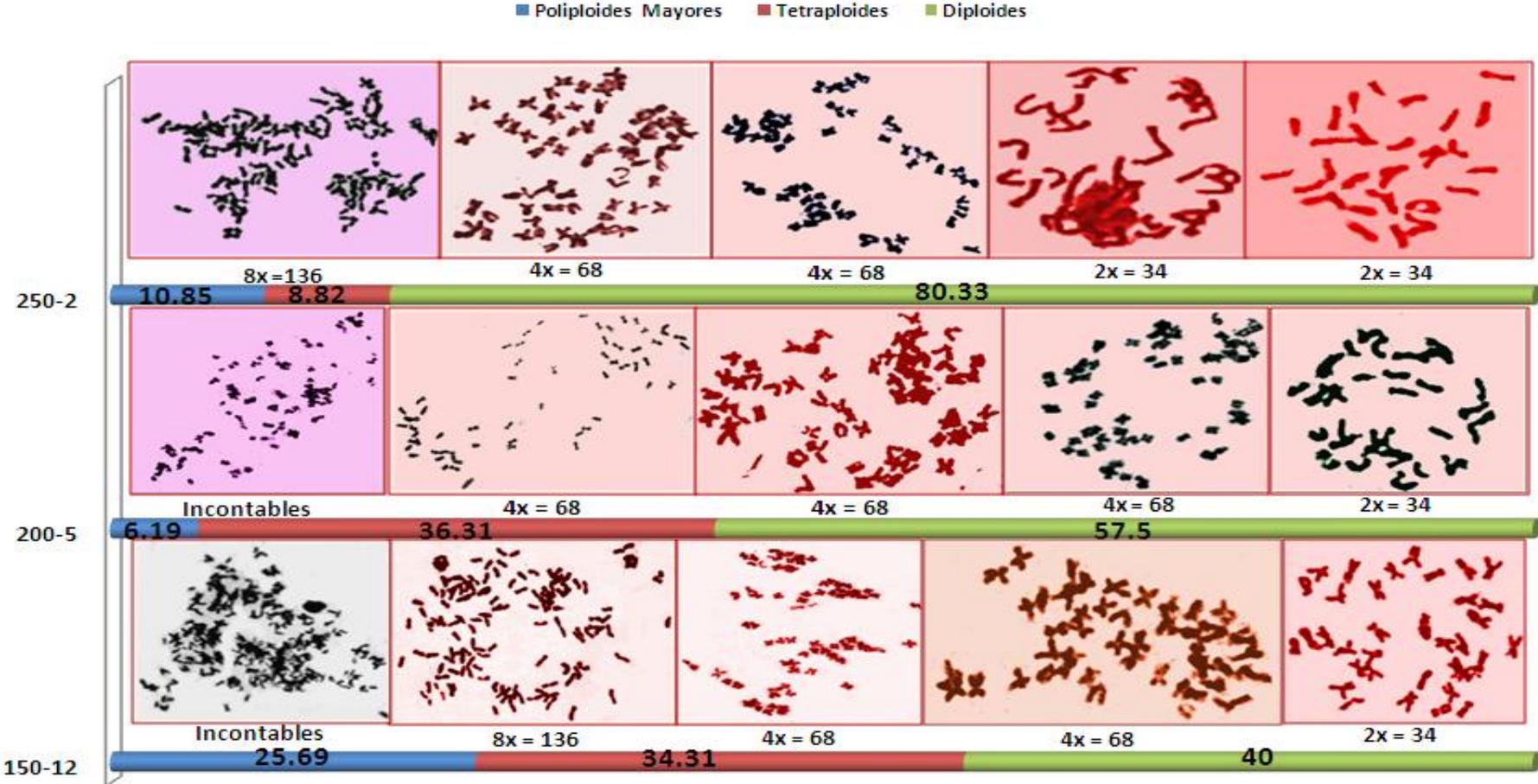
## Anexo A1 (1/1). Técnicas de duplicación cromosómica con colchicina en distintas especies.

Año	Autor principal	Especie	Etapa fenológica	Colchicina	Horas	Observaciones
2009	X.Z. Liu	<i>Eucalyptus globulus</i>	Raíz de plántula <i>in vitro</i>	750 mg L <sup>-1</sup> 2 % DMSO	5	Tetraploidía en el 60% de las plántulas. Pérdida de 2 o 4 cromosomas en algunas muestras.  Variación somaclonal <i>in vitro</i> , 12.2% de polimorfismo Hojas mas gruesas, verdes y largas
2006	Rauf	<i>Gossypium hirsutum</i>	Semilla	1 %	24	Tratamiento mas efectivo en cotiledones con 8% de tetraploidía
			Cotiledones	1 %	72	Aumento en el área foliar, diámetro de estomas y pétalos
			Plántula	1 %	0.5	Disminución en la frecuencia de estomas, número de anteras y altura de planta
2007	G. Liu	<i>Platanus acerifolia</i>	Semilla	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 %	24	Cambios en las frecuencias alélicas En semilla: Tetraploidía en el 40% de las plantas al 0.4%, pero ninguna sobrevivió
			Meristemo apical			En meristemas: 13% plantas tetraploides al 0.4 % con 40% de sobrevivencia Estomas mas grandes, hábito de crecimiento mas compacto, hojas mas gruesas y anchas, menor altura de planta
2008	Shahriari	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Meristemo	0.20 %	24	Incremento en un 17 % de biomasa para la producción de alcaloides con propiedades farmacéuticas  Aumento en el tamaño de la flor, tamaño de estomas, número de cloroplastos, peso seco y húmedo  Disminución en la altura de planta
2007	Urwin	<i>Lavandula angustifolia</i>	Semilla	0-1000 mg L <sup>-1</sup>	7 días	El mejor tratamiento fue de 125 mg L <sup>-1</sup> con 1 % de tetraploidía  Aumento en tamaño de la flor, semilla y contenido de aceite

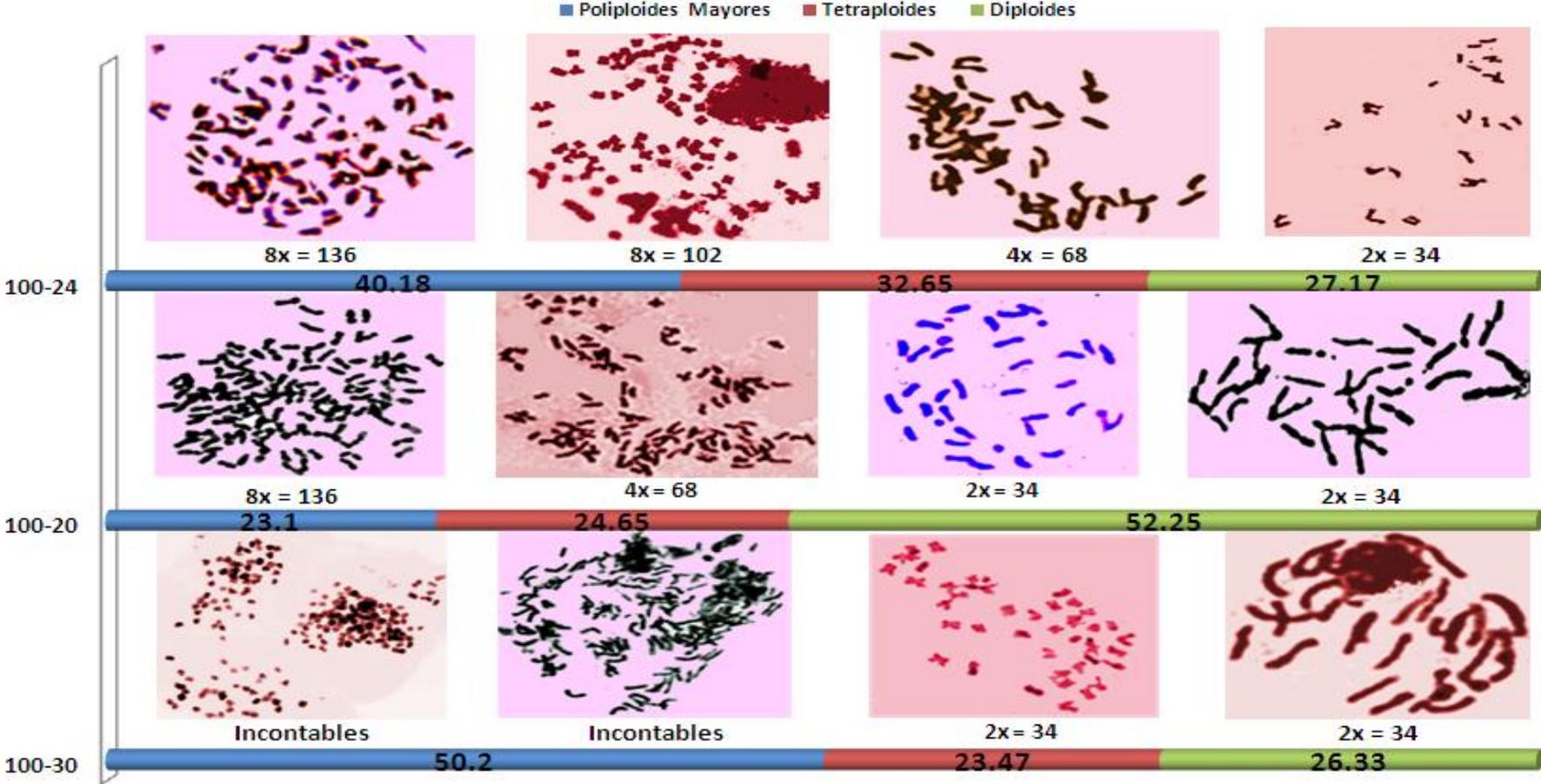
## Anexo A1 (2/2). Técnicas de duplicación cromosómica con colchicina en distintas especies.

Año	Autor principal	Especie	Etapa fenológica	Colchicina	Horas	Observaciones
2008	Burun	<i>Nicotiana tabacum</i>	Anteras (antes de cultivar <i>in vitro</i> )	0.40 %	0,2,4,6,8,10,12	El mejor tratamiento fue en plántula, durante 7 h con un 40 % de diploidía y 52 % de viabilidad.
			Anteras durante el cultivo <i>in vitro</i>	0.20 %	72	Aumento en el tamaño del polen, comparado con los haploides.
			Plántula con 4 hojas	0.20 %	0,7,24,48	Poliploides con crecimiento lento
2006	Yang	<i>Vitis vinifera</i>	Embriones somáticos <i>in vitro</i>	0,10,20 mg L <sup>-1</sup>	24,48,72	El mejor tratamiento fue a una concentración de 20 mgL <sup>-1</sup> durante 24 horas No se observaron quimeras Aumento en el diámetro de los estomas de los tetraploides comparados con los diploides Al aumentar el tiempo y la concentración a la colchicina se observó una disminución en el porcentaje de sobrevivencia Segregación aberrante en F <sub>2</sub> y quimeras con CMS y ramificado (caracteres recesivos)
2010	Omidbaigi	<i>Ocimum basilicum</i>	Semilla	0,0.5,0.10,0.20,0.50 y 0.75 %	6,12,24,36	El mejor tratamiento fue de 0.5 % de colchicina en meristemos, con 8 % de plantas tetraploides
			Meristemo	2 % DMSO		Aumento en el tamaño de estomas y polen
			Hoja			Aumento en el número de cloroplastos
			Raíz			Presencia de tetraploides y quimeras

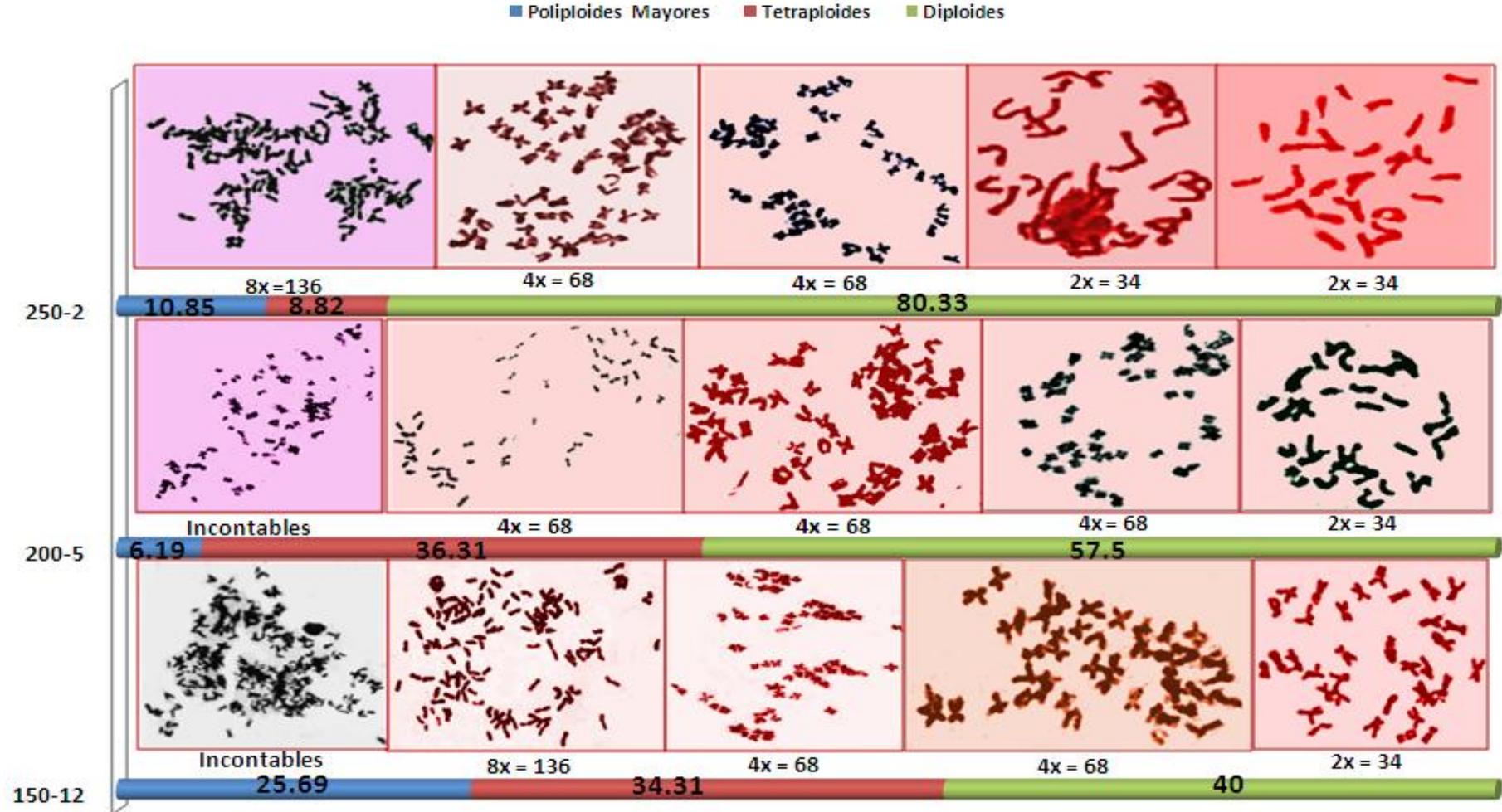
**Anexo A2 (1/4).** Porcentaje de células para los distintos niveles de ploidía en mitosis para cada tratamiento, promediado para ambas especies.



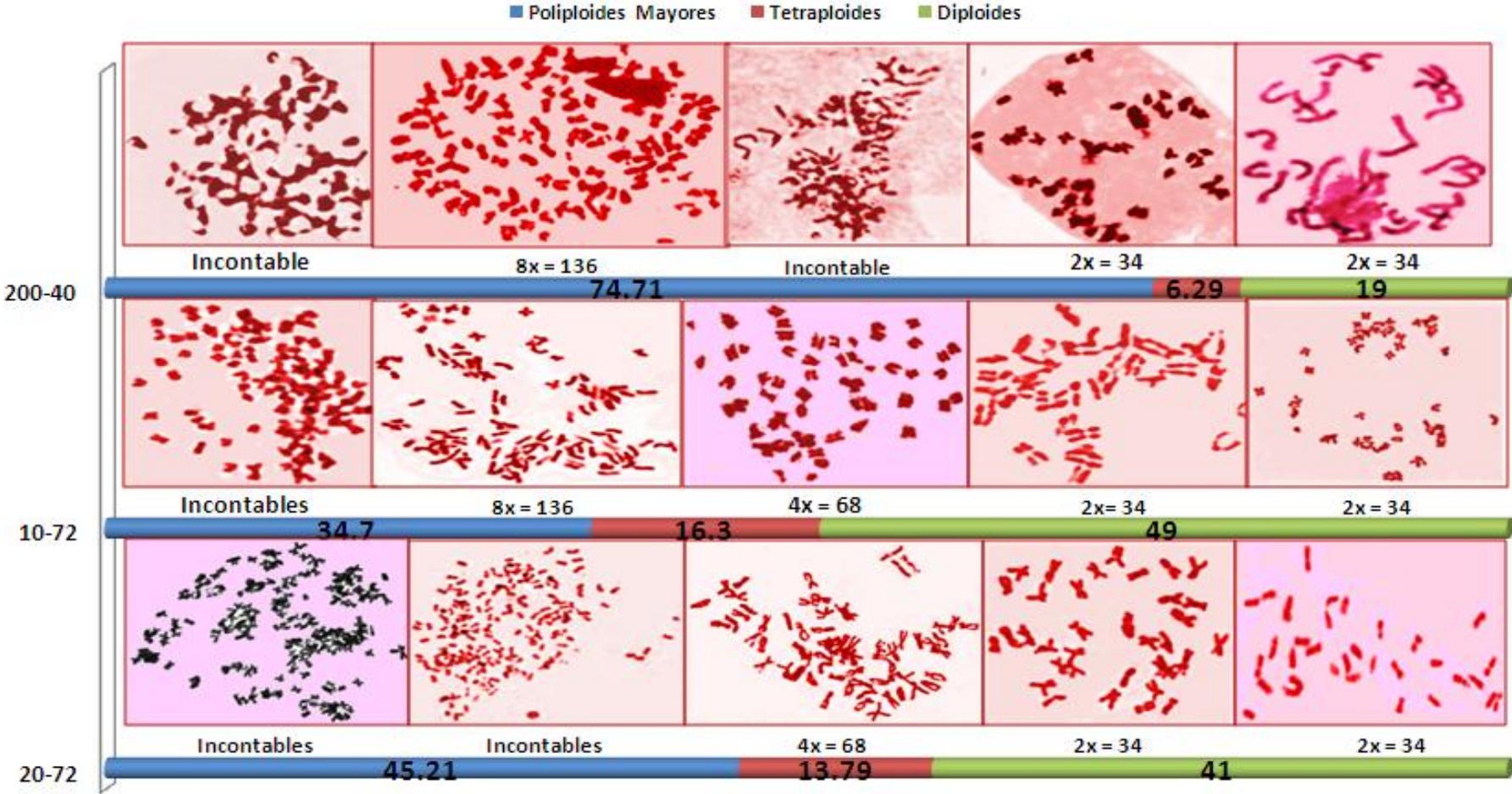
**Anexo A2 (2/4).** Porcentaje de células para los distintos niveles de ploidía en mitosis para cada tratamiento, promediado para ambas especies.



Anexo A2 (3/4). Porcentaje de los distintos niveles de ploidía en mitosis para cada tratamiento, promediado para ambas especies.

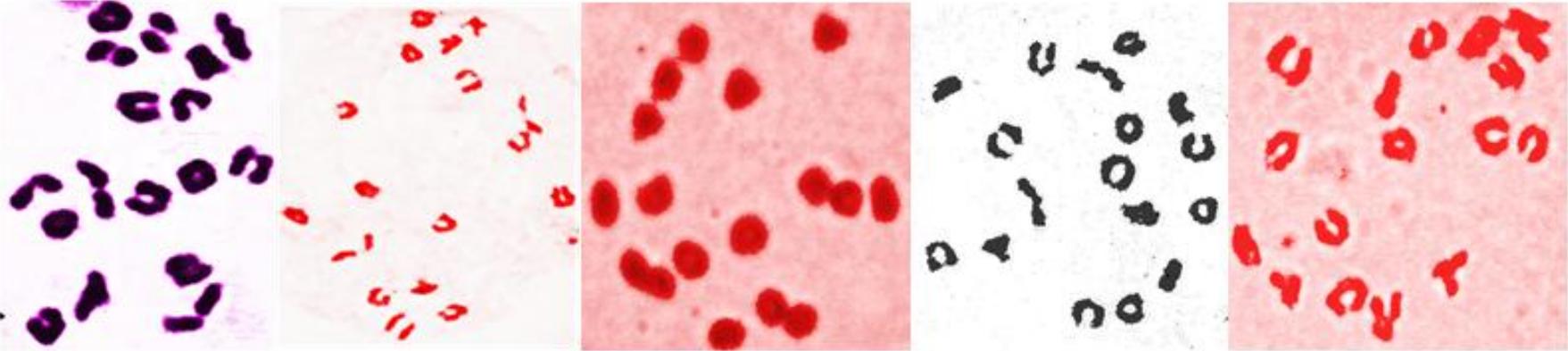


**Anexo A2 (4/4).** Porcentaje de células para los distintos niveles de ploidía en mitosis para cada tratamiento, promediado para ambas especies.

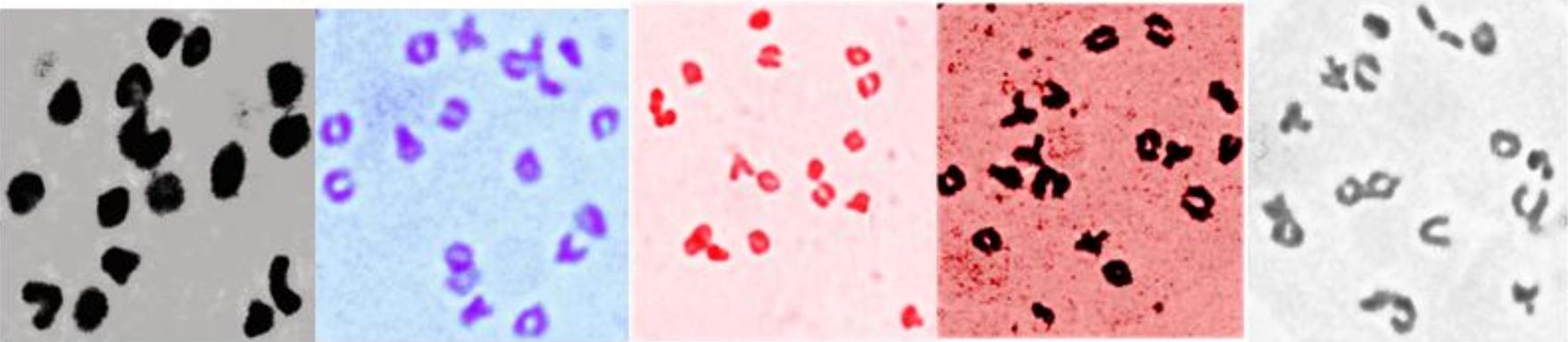


Anexo A3 (1/3). Microsporocitos en diacinesis observados en los distintos tratamientos con colchicina en ambas especies.

Tratamiento: 10 mg L<sup>-1</sup> durante 72 horas



Tratamiento: 20 mg L<sup>-1</sup> durante 72 horas

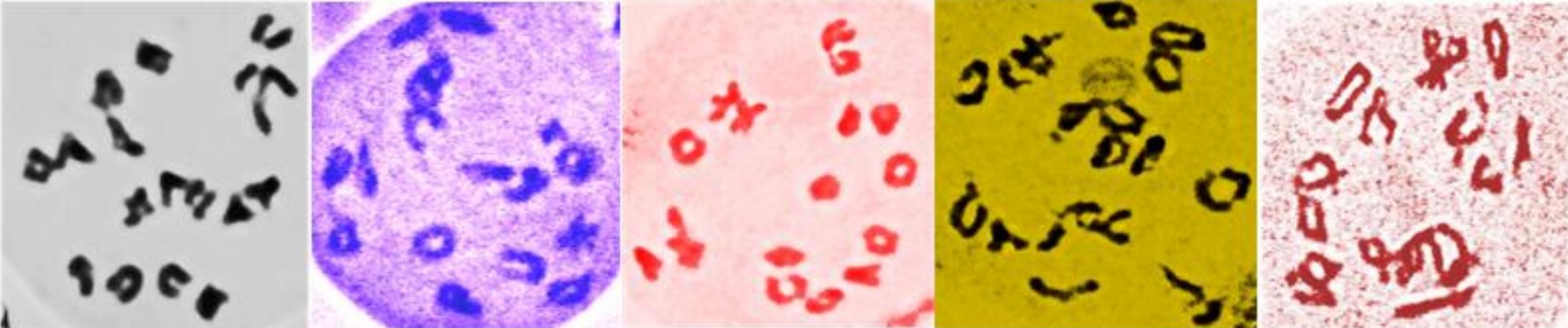


Anexo A3 (2/3). Microsporocitos en diacinesis observados en los distintos tratamientos con colchicina en ambas especies.

Tratamiento: 100 mg L<sup>-1</sup> durante 20 horas

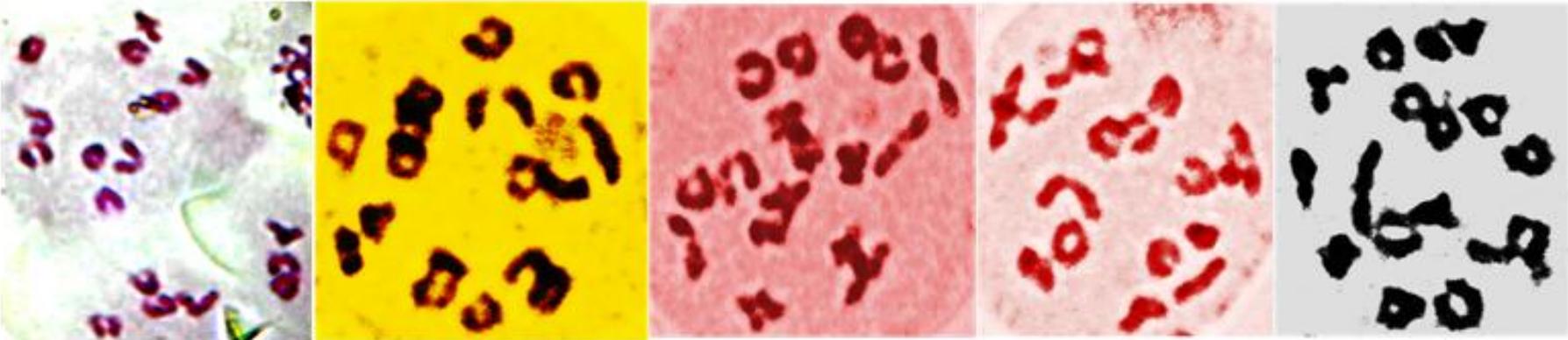


Tratamiento: 100 mg L<sup>-1</sup> durante 24 horas



Anexo A3 (3/3). Microsporocitos en diacinesis observados en los distintos tratamientos con colchicina en ambas especies.

Tratamiento: 200 mg L<sup>-1</sup> durante 5 horas



Tratamiento: 250 mg L<sup>-1</sup> durante 2 horas

