

Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haploides

Beatriz Pintos López. Luisa Martín Calvarro. Aránzazu Gómez Garay.

Facultad de Ciencias Biológicas. Dpto. de Biología Vegetal I: Fisiología Vegetal.

C/ José Antonio Novais, 12. 28040 Madrid.

bpintos@bio.ucm.es

Resumen: la producción de embriones haploides a través del proceso de embriogénesis del polen (embriogénesis gamética) es el método más empleado hoy día para obtener plantas completamente homocigotas en una sola generación. Si la duplicación cromosómica ocurre en alguna etapa durante la embriogénesis de las microsporas, las plantas regeneradas a partir de estas microsporas son completamente homocigotas (doble-haploides), es decir, son individuos homocigotos fértiles. El conseguir la homocigosidad en una sola generación ayuda a reducir los números de ciclos de autopolinización o retrocruzamiento que serían necesarios en los sistemas convencionales de mejora para obtener líneas puras o isogénicas. El proceso de diploidización espontánea en los cultivos de anteras o de microsporas no es muy frecuente, sobre todo en especies forestales, por lo que para conseguir individuos doble-haploides es necesaria la aplicación de diferentes agentes diploidizantes o agentes antimitóticos, tales como la orizalina, la colchicina y el amiprofos-metil.

Palabras clave: embriogénesis gamética. Haploides. Doble-haploides. Diploidización. Colchicina. Orizalina. Amiprofos-metil.

DIPLOIDIZACIÓN CROMOSÓMICA

Las plantas haploides, es decir, aquéllas con un número gamético de cromosomas, obtenidas mediante [embriogénesis gamética](#), son generalmente estériles, por lo que se requerirá la duplicación de los cromosomas para restaurar el nivel de ploidía original para que estas plantas se conviertan en doble haploides y puedan ser usadas en los programas de mejora vegetal.

Aunque la producción de plantas haploides mediante las técnicas biotecnológicas, se ha convertido en una importante herramienta para los procesos de mejora vegetal, a menudo se presentan dificultades relacionadas con la duplicación de los cromosomas de estas plantas haploides.

El proceso de diploidización depende del ciclo celular. En algunas especies, las plantas regeneradas a partir de microsporas aisladas son diploides, lo cual es

claramente debido a la **diploidización espontánea** de las microsporas haploides. La duplicación espontánea de los cromosomas podría ser debida a fenómenos de endoreduplicación o endomitosis del núcleo de la microspora, o de la célula vegetativa del grano de polen, o de la fusión de los dos primeros núcleos, los cuales se forman a menudo después de la primera división tanto de la microspora como de la célula vegetativa del polen bicelular (RAO y SUPRASANA, 1996).

La **duplicación de los cromosomas** puede ocurrir **espontáneamente** o **artificialmente**, mediante la aplicación de distintos **agentes antimitóticos** tales como colchicina, orizalina, amiprofos metil, trifluralina, pronamida, etc., que pueden aplicarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro* en los embriones o en las plántulas haploides obtenidas previamente. El resultado en ambos casos es la obtención de plantas homocigotas diploides.

En la figura 1 se muestra una representación esquemática del proceso de embriogénesis del polen *in vitro* a través del cultivo de anteras y microsporas, así como la formación de plantas doble-haploides mediante el uso de diferentes agentes antimitóticos.

La producción rápida de líneas isogénicas, tras la duplicación cromosómica de haploides, ya sea por duplicación espontánea o utilizando agentes antimitóticos, ha sido explotada especialmente por los investigadores chinos, que han producido variedades de arroz, trigo y tabaco mediante el cultivo de anteras. La variedad de trigo más cultivada actualmente en China es un doble haploide.

La diploidización espontánea de los cromosomas en los cultivos de anteras es considerada como una gran ventaja en los programas de mejora, ya que de este modo no se necesita la duplicación cromosómica mediante tratamientos con agentes antimitóticos. No obstante, esta duplicación no es muy frecuente, sobre todo en especies forestales, por lo que la aplicación de agentes antimitóticos se hace necesaria en la mayoría de las ocasiones.

AGENTES ANTIMITÓTICOS

Un paso clave en la producción de líneas isogénicas es la diploidización del material haploide (duplicación cromosómica) *in vitro* inducida por diferentes **agentes antimitóticos**. Un agente diploidizante ideal debería ser simple y rápido de aplicar, eficiente, seguro e indicado para un amplio número de especies vegetales. Debería también, no producir problemas fisiológicos y alteraciones genéticas, tales como selección intrasomática, mutaciones genómicas y aneuploidía.

El proceso de diploidización del material haploide *in vitro* incluye varios pasos, incluyendo una fase de inducción de la diploidización y un protocolo de confirmación para medir la tasa de éxito.

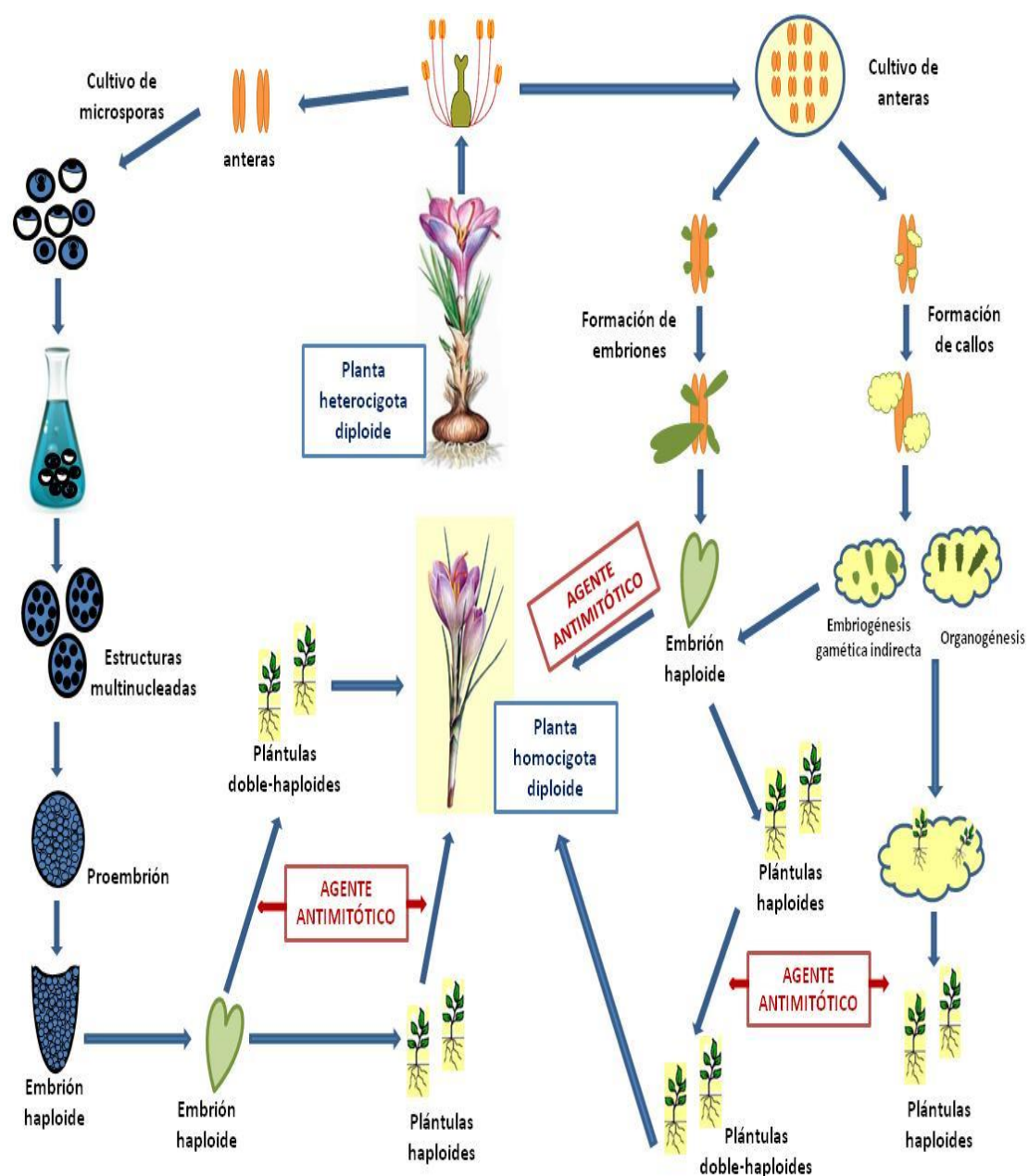


Figura 1. Representación esquemática de la embriogénesis del polen *in vitro* a través del cultivo de anteras y microsporas y formación de plantas doble-haploides mediante el uso de agentes antimitóticos

La fase de inducción depende de un gran número de variables como son: el medio de cultivo, el explanto (plántulas, brotes, callos, embriones somáticos, embriones cigóticos, segmentos nodales), el agente antimitótico, el tiempo de exposición del explanto con el agente antimitótico, la concentración de este agente y el disolvente en el que se disuelve el agente antimitótico (normalmente se disuelven en DMSO: dimetil sulfóxido, ya que aumenta la permeabilidad celular y permite un aumento en la absorción de los productos químicos).

El método más utilizado para la [evaluación de la diploidización](#) inducida es la [citometría de flujo](#), sin embargo, también existen otros métodos alternativos, menos utilizados, como son el recuento de cromosomas y observaciones morfológicas.

La citometría de flujo implica la liberación de los núcleos celulares del material vegetal, seguida de la tinción del ADN de estos núcleos y análisis a través de un citómetro de flujo, que utiliza una fuente de luz para iluminar los núcleos teñidos, y detectar así la fluorescencia emitida. La cantidad de fluorescencia emitida se correlaciona con su contenido de ADN.

Los agentes antimitóticos más utilizados para la diploidización de material haploide para obtener plantas doble-haploides son: la [orizalina](#), la [colchicina](#), el [amiprofos-metil \(APM\)](#), la [pronamida](#) y la [trifluralina](#). Estos agentes no se aplican con el mismo rango de concentración debido a sus diferentes afinidades. La colchicina se suele aplicar generalmente en un rango de concentración de 1.25 a 2.5 mM, mientras que otros agentes antimitóticos como la orizalina, la trifluralina o el APM se suelen aplicar a una concentración final de 1-50 µM.

Colchicina

La [colchicina](#) (Fig. 2) es un alcaloide que se extrae de las plantas *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba*. Hay antecedentes de su empleo clínico desde el siglo VI a. de C. Tiene un amplio uso terapéutico, fundamentalmente en la crisis de artritis gotosa, estando sistematizada esta indicación ya en el siglo XVIII. También puede estar indicada en el tratamiento del síndrome de Behcet, en la cirrosis biliar primaria, en la pericarditis aguda y en la fiebre pulmonar.

Por otro lado, la colchicina ha sido utilizada desde 1937 para la producción de plantas poliploides (BLAKESLEE, 1937), y es muy común su uso para detener metafases, ya que este alcaloide interfiere con la estructura de las fibras del huso mitótico, uniéndose a la tubulina de los microtúbulos e inhibiendo su formación y, por lo tanto, provocando que no se desplacen los cromosomas hacia los polos. Como consecuencia, se origina una célula con un doble número de cromosomas (HADLACZKY *et al.*, 1983). En algunas especies, la colchicina puede causar efectos secundarios tales como esterilidad o crecimiento anormal, o puede inducir la formación de quimeras debido a las divisiones asincrónicas de las células (WAN *et al.*, 1989).

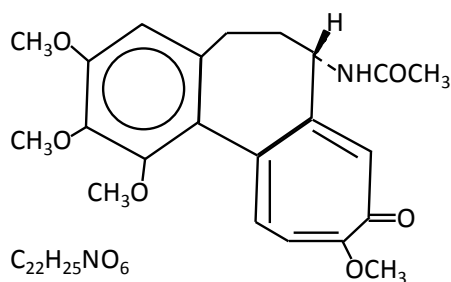


Figura 2. Estructura de la colchicina.

Orizalina y trifluralina

La **orizalina** (3,5-dinitro-N,N-dipropylsulfanilamida) (Fig. 3 A) y la **trifluralina** (α, α , α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidina) (Fig. 3 B), son herbicidas de la clase dinitroanilinos que se caracterizan porque producen fuertes anomalías en las plantas, sobre todo, en regiones que tienen una elevada actividad meristemática, como por ejemplo los ápices de las raíces.

Estos herbicidas, van a interrumpir la mitosis mediante la inhibición de la formación de microtúbulos, ya que ambos inhiben de forma específica el ensamblaje de la tubulina de las células vegetales, en una concentración que no tiene un efecto inhibitor sobre la tubulina de las células animales (CLEARY y HARDHAM, 1988). La respuesta de estos herbicidas en las plantas, a concentraciones micromolares, es similar a la respuesta de las plantas tratadas con concentraciones milimolares de colchicina (QUADER y FILNER, 1980). Estudios ultraestructurales mostraron que concentraciones nanomolares de dinitroanilinos, causan la parcial o completa desaparición de los microtúbulos en todos los sistemas subcelulares (ASHTON y CRAFTS, 1981).

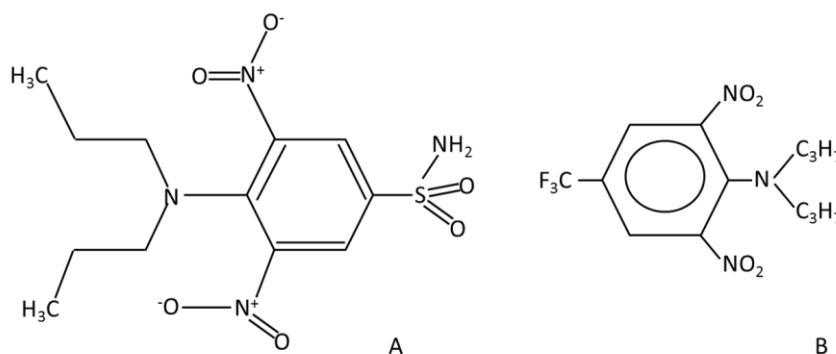


Figura 3. A. Estructura de la orizalina. B. Estructura de la trifluralina.

Amiprofos metil

El **Amiprofos metil (APM)** (Fig. 4) fue descubierto por AYA *et al.*, 1975, y pertenece a la clase de herbicidas amida fosfóricos considerados como drogas antimicrotubulares, debido a que provocan la desaparición de los microtúbulos después de su aplicación, dando como resultado la interrupción de la mitosis.

En suspensiones celulares vegetales, concentraciones micromolares de APM, despolimerizan completamente el conjunto de microtúbulos, lo que significa la aparición de un alto rango de metafases detenidas y por lo tanto un significativo aumento del índice mitótico. SREE RAMULU *et al.*, 1988, observaron en suspensiones celulares de *Nicotiana plumbaginifolia* tratadas con diferentes concentraciones de APM, que los cromosomas de estas células perdían su regular organización sobre el huso y en algunas células estos cromosomas se reunían en grupos sencillos en el centro de la célula. Varias

de estas células mostraban cromosomas dispersos por todo el citoplasma. En estas C-metafases ("metafases explotadas") los cromosomas se organizaban en grupos de dos, tres o más cromosomas. Después del tratamiento con AMP, la mitosis estaba desprovista de anafase y los cromosomas en metafase entraban directamente en telofase sin la división de los centrómeros y sin separación de las cromátidas. Estos autores comprobaron la alta eficiencia del APM como agente antimitótico, deteniendo la mitosis y conduciendo a la acumulación de un elevado número de metafases y a la formación de una alta frecuencia de micronúcleos.

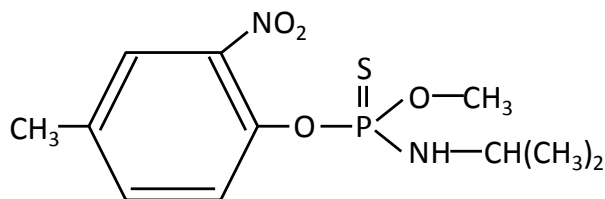


Figura 4. Estructura del amiprofos-metil.

Pronamida

La **pronamida** (N-(1,1-dimetilpropinil)-3,5-diclorobenzamida) es un herbicida benzamida (Fig.5), que interrumpe la mitosis por un mecanismo muy similar a los anteriores agentes antimitóticos (CARLSON *et al.*, 1975). Este herbicida probablemente no produzca una pérdida completa de los microtúbulos, pero sí provoca un acortamiento de los mismos (VAUGHAN y VAUGHN, 1987).

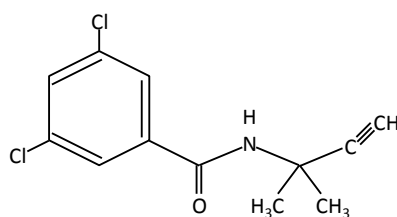


Figura 5. Estructura de la pronamida.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashton, F. M. y Crafts, A. S. 1981. Dinitroanilines. pp: 180-223. En: Ashton, F. M. y Crafts, A. S. (Eds.). *Mode of Action of Herbicides*. New York.
- Aya, M.; Takase, I.; Kishino, S. y Kurihana, K. 1975. Amiprofosmethyl, a new herbicide in upland crops. *Proc. 5th Asian Pac. Weed Sci. Conf.*:138-141.

- Blakeslee, A.F. 1937. Dédoublément du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. *C.R. Acad. Sciences*, 205: 476-479.
- Cleary, A. L. y Hardham, A. R. 1988. Depolymerization of microtubule arrays in root tip cells by oryzalin and their recovery with modified nucleation patterns. *Can J. Bot.*, 66: 2353-2366.
- Carlson, W. C.; Lignowski, E. M. y Hopen, H. J. 1975. The mode of action of pronamide. *Weed Sci.*, 23: 155-161.
- Hadlaczy, G.; Bistray, G.; Parznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta*, 157: 278-285.
- Quader, H. y Filne, r P. 1980. The action of antimitotic herbicides on flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*: A comparison with the action of colchicine. *Eur. J. Cell Biol.*, 21: 301-304.
- Rao, P. S. y Suprasanna, P. 1996. Methods to double haploid chromosome numbers. pp: 317-340. En: Mohan Jain, S., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. (Eds.). *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Sree Ramulu, K.; Verhoeven, H. A.; Dijkhuis, P. y Gilissen, L. J. W. 1988. Chromosome behaviour and formation of micronuclei after treatment of cell suspension cultures with amiprofos-methyl in various plant species. *Plant Science.*, 56(3): 227-237.
- Vaughan, M. A. y Vaughn, K. C. 1987. Pronamide disrupts mitosis in a unique manner. *Pestic Biochem. Physiol.*, 28: 182-193.
- Wan, Y.; Petolino, J. F.; Widholm, J. M. 1989. Efficient production of doubled-haploid plants through colchicine treatment of anther derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 889-892.

Recibido: 20 de febrero 2014.

Aceptado: 10 de diciembre 2014.