



C E N T R O I N T E R N A C I O N A L D E L A P A P A

El Centro Internacional de la Papa (CIP) es una organización de investigación para el desarrollo especializada en papa, camote y raíces y tubérculos andinos. Su objetivo es brindar soluciones sostenibles basadas en la ciencia a los acuciantes problemas de hambre, pobreza, igualdad de género, cambio climático y preservación de la frágil biodiversidad de nuestro planeta y sus recursos naturales.

www.cipotato.org

El CIP es miembro del CGIAR.

El CGIAR es una alianza mundial de investigación agrícola para un futuro sin hambre. Su labor científica la llevan a cabo los 15 centros de investigación que conforman el Consorcio CGIAR en colaboración con cientos de organizaciones socias.

www.cgiar.org



CGIAR

Science for a food-secure future



CIP

CENTRO
INTERNACIONAL
DE LA PAPA

UN CENTRO DE INVESTIGACION DEL CGIAR



MANUAL

Biología reproductiva y citológica de la papa

Benny Ordoñez, Matilde Orrillo y Merideth Bonierbale



MANUAL

Biología reproductiva y citológica de la papa

Benny Ordoñez, Matilde Orrillo+ y Merideth Bonierbale

Centro Internacional de la Papa (CIP)

Segunda edición 2016



RESEARCH
PROGRAM ON
Roots, Tubers
and Bananas



Agradecimientos

La publicación de la Segunda Edición del Manual de Biología reproductiva y citológica de la papa se realizó gracias al soporte financiero de Global Crop Diversity Trust.

Agradecemos también a la Biol. María Miki por la última revisión del manuscrito y observaciones realizadas.

Biología reproductiva y citológica de la papa Manual Técnico

© Centro Internacional de la Papa (CIP), 2016

ISBN: 978-92-9060-477-8

DOI: 10.4160/9789290604778

Las publicaciones del CIP contribuyen con información importante sobre el desarrollo para el dominio público. Los lectores están autorizados a citar o reproducir este material en sus propias publicaciones. Se solicita respetar los derechos de autor del CIP y enviar una copia de la publicación donde se realizó la cita o se publicó el material, al Departamento de Comunicaciones a la dirección que se indica abajo.

Centro Internacional de la Papa

Apartado 1558, Lima 12, Perú

cip@cgiar.org • www.cipotato.org

Citación correcta:

Ordoñez, B., Orrillo, M., Bonierbale, M. 2016. Manual biología reproductiva y citológica de la papa. Lima (Perú). Centro Internacional de la Papa (CIP). ISBN 978-92-9060-477-8. 2a ed. 65 p.

Descriptor AGROVOC: ADN, citogenética, división celular, mitosis, meiosis, número de cromosomas, ploidía, *Solanum tuberosum*.

Otros descriptores: células somáticas, células sexuales, CIP, citometría de flujo, cloroplastos, embriones inmaduros, germinación de polen *in vitro* e *in vivo*, polinización.

Códigos de categorías AGRIS: F30 Fitogenética y Mejoramiento

Producido por el Departamento de Comunicaciones

Diseño y Diagramación: José Enrique Torres

Noviembre 2016

Contenido

Prólogo	5
Introducción	6
Primera Parte: Biología reproductiva de la papa. Bases teóricas.	7
1. El ciclo de vida de la papa	7
1.1. Reproducción asexual	7
1.2. Reproducción sexual	7
1.2.1. Morfología floral	8
1.2.2. Megasporogénesis	9
1.2.3. Microsporogénesis	9
1.2.4. Fecundación	9
2. División celular	10
2.1. Mitosis	10
2.1.1. Profase	11
2.1.2. Metafase	11
2.1.3. Anafase	11
2.1.4. Telofase	12
2.2. Meiosis	12
2.2.1. Meiosis I	15
2.2.2. Meiosis II	
3. Gametos no reducidos (2n)	17
4. Barreras de incompatibilidad	18
4.1 Incompatibilidad gametofítica	19
4.2 Incompatibilidad esporofítica	19
5. Androesterilidad	21
5.1. Androesterilidad genética	21
5.2. Causa citoplasmática	21
5.3. Interacción genética-citoplasmática	21

Segunda Parte: Técnicas citogenéticas.	22
1. Determinación de ploidía en células somáticas	22
1.1. Conteo de cloroplastos en las células guarda de los estomas	22
1.2. Conteo de cromosomas en puntas de raíces	25
1.3. Determinación de ploidía por citometría de flujo	31
2. Comportamiento cromosómico en células sexuales	35
3. Determinación de la fertilidad del polen	37
3.1. Prueba de tinción (con gelatina de acetocarmín glicerol o X-Gal)	39
3.2. Prueba de germinación del polen <i>in vitro</i>	42
3.3. Prueba de crecimiento del tubo polínico <i>in vivo</i>	45
3.3.1 Medición de crecimiento del tubo polínico utilizando el programa ImageJ	50
3.3.2 Ensamblaje de imágenes de pistilos utilizando el programa PanaVue Image Assembler 3	51
4. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros	54
Anexo 1. Preparación de reactivos y soluciones	56
Referencias bibliográficas	59
Glosario	62

Prólogo

Las técnicas y protocolos descritos en el presente manual son los que se utilizan actualmente en el laboratorio de citogenética del Centro Internacional de la Papa (CIP).

Se refieren principalmente a la determinación de ploidía en células somáticas, el comportamiento cromosómico en células sexuales, la determinación de la fertilidad del polen y el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros en *Solanum spp.*

Estas técnicas constituyen herramientas valiosas al momento de estudiar el apareamiento y entrecruzamiento entre cromosomas homólogos, la relación polen-pistilo, la identificación de barreras de incompatibilidad, las irregularidades meióticas en híbridos interespecíficos y la formación-producción de gametos. Por lo tanto, tienen aplicaciones en el mejoramiento genético de la papa, pero también en estudios taxonómicos y evolutivos.

Además, el manual incorpora, en la primera parte, conceptos teóricos que facilitan el entendimiento de las diversas técnicas y la interpretación de resultados, ayudando a proyectar convenientemente un plan de mejoramiento. En la segunda parte se presentan las técnicas citogenéticas básicas utilizadas en el mejoramiento de la papa. Para cada técnica se mencionan las aplicaciones potenciales y se describen en detalle, en un cuadro separado, los procedimientos utilizados. Finalmente en el anexo se describen los reactivos y soluciones necesarias y su preparación, así como las técnicas de polinización y obtención de semilla botánica utilizadas en los trabajos de mejoramiento que se realizan en los invernaderos del CIP.

Estamos seguras de la importancia de esta publicación para el campo de la citología aplicada al mejoramiento genético de la papa, no sólo por su estructura, sino por la riqueza de su contenido, permitiendo que su aplicación sea fácil y útil para quienes necesiten acercarse con rigor científico a la citología básica.

Las autoras

Introducción



La familia Solanaceae comprende el mayor grupo de angiospermas en el mundo. Dentro de esta familia, la especie de mayor importancia económica es la papa cultivada, *Solanum tuberosum*, la cual es autotetraploide ($2n=4x=48$), es decir tiene 4 juegos de cromosomas similares (donde “n” es el número gamético y “x” es el número básico). La papa forma una serie poliploide constituida por especies diploides ($2n=2x=24$), triploides ($2n=3x=36$), tetraploides ($2n=4x=48$), pentaploides ($2n=5x=60$) y hexaploides ($2n=6x=72$), siendo diploides el 70 por ciento de las especies. Hawkes (1990) reconoció 232 especies divididas en 21 series. Las especies tetraploides cubren un amplio rango de distribución, desde la parte meridional de Estados Unidos hasta la región austral de Chile, y son las de mayor importancia económica. No obstante, el nivel diploide posee mayor diversidad genética asociada a resistencia a diferentes factores bióticos y/o abióticos, y consecuentemente es de gran utilidad en el mejoramiento genético de las especies cultivadas y tiene una mayor concentración de diversidad en los Andes.

Mediante técnicas citológicas se puede determinar la ploidía, la viabilidad y fertilidad polínica, la presencia de gametos no reducidos, entre otras características importantes en las diferentes especies de papa. Los resultados obtenidos proporcionan el conocimiento necesario para una eficiente y efectiva manipulación del germoplasma silvestre y cultivado de la papa, contribuyendo a desarrollar estrategias más eficientes para la transferencia de características deseables como resistencia a factores bióticos y/o abióticos.

Primera Parte: Biología reproductiva de la papa

Bases teóricas

1. El ciclo de vida de la papa

Como ocurre en las angiospermas, en el ciclo de vida de la papa existe una fase diploide ($2n$), que comprende una serie de divisiones por mitosis (que lleva a un reparto equitativo del material hereditario), seguida por una fase haploide (n), iniciada por división por meiosis y que termina con la fusión de dos núcleos haploides (gametos) formando el cigoto diploide ($2n$). Convencionalmente, a la fase haploide se le denomina gametofito y a la fase diploide, esporofito.

1.1 Reproducción asexual

La reproducción vegetativa o asexual de la papa asegura la conservación clonal del genotipo. Una nueva planta se forma generalmente a partir de partes vegetativas (tubérculos, brotes o yemas) dando lugar a clones, es decir plantas genéticamente idénticas a la planta original. Esta reproducción se realiza por medio de mitosis.

En el mejoramiento de la papa, la propagación asexual facilita la fijación, selección y multiplicación de genotipos.

El cultivo de tejidos y el cultivo de meristemas para la erradicación de patógenos, constituyen otras aplicaciones prácticas de la reproducción asexual.

1.2 Reproducción sexual

La reproducción sexual de la papa permite que el material genético de dos individuos se intercambie formando nuevas combinaciones alélicas dando lugar a nuevos genotipos. Requiere la participación de los órganos reproductivos masculinos (anteras) y femenino (pistilo) seguido de un proceso de polinización y fecundación para formar bayas con semillas, constituyendo cada una de estas un nuevo individuo.

1.2.1 Morfología floral

Las flores de la papa se encuentran reunidas en agregados llamados inflorescencias. La inflorescencia está sostenida por el pedúnculo, cuyas ramificaciones (pedicelos) culminan en flores.

La flor contiene dos juegos de envolturas florales: el cáliz (cinco sépalos) y la corola (cinco pétalos), que forman el receptáculo floral ubicado debajo de los órganos reproductivos de la flor, los estambres y el pistilo (Fig. 1).

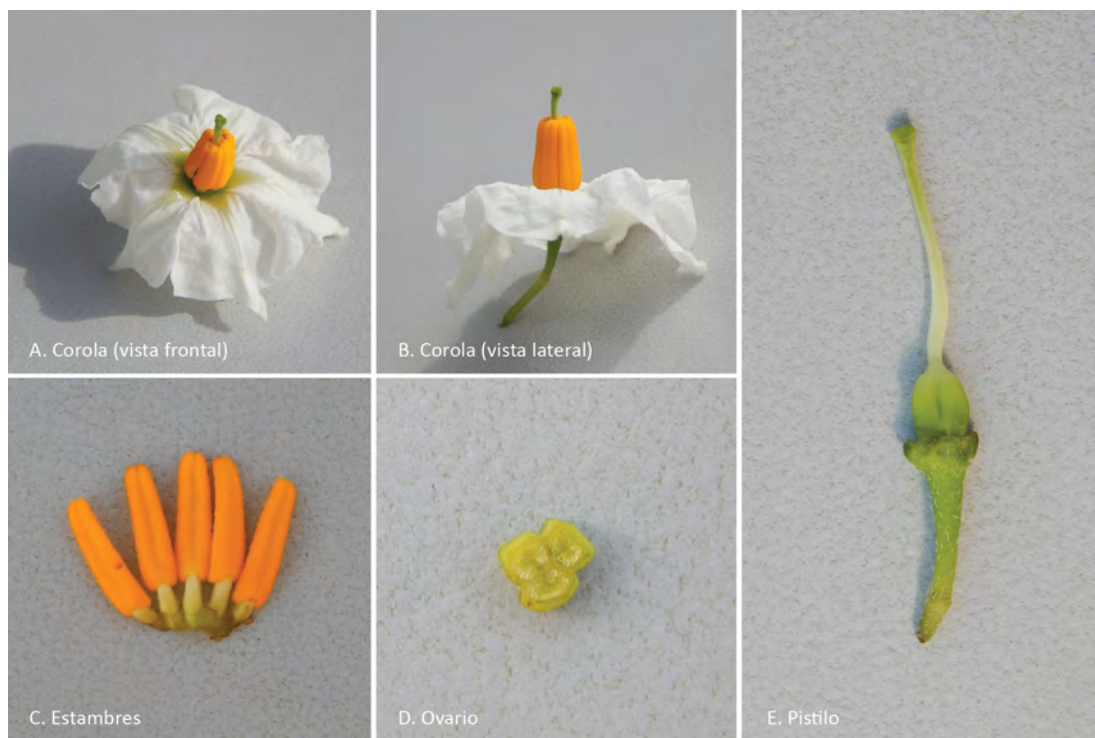


Fig. 1. Morfología floral de una flor de papa:

A) Corola (vista frontal), B) Corola (vista lateral), C) Estambres, D) Ovario y E) Pistilo.

El estambre consiste de un filamento corto, que sostiene a la antera, con dos lóbulos que contienen el polen. Los cinco estambres se encuentran separados de la corola. El pistilo comprende el ovario, que contiene 300-

600 óvulos, el estigma —que recibe el polen— y el estilo, que conecta ambas partes. Cada óvulo contiene una célula madre de las megasporas, rodeada de un tejido llamado nucela y de un integumento.

1.2.2. Megasporogénesis

La megalosporogénesis es el proceso de formación de las células reproductoras llamadas sacos embrionarios, que contienen el gameto femenino u ovocélula. Dentro del óvulo, una célula madre ($2n$) se divide por meiosis, formando en la primera división un par de células haploides. La segunda división meiótica produce cuatro megasporas haploides.

Tres de las megasporas degeneran y la cuarta (megaspora funcional) sufre tres divisiones mitóticas sin citocinesis, dando origen a ocho núcleos haploides, que al orientarse forman el saco embrionario. Tres núcleos, ubicados hacia el micrópilo del saco (abertura en los integumentos a través del cual penetrará el tubo polínico) constituyen las dos sinérgidas y la ovocélula (gameto femenino). Los tres situados en el extremo opuesto hacia la calaza se denominan antípodas. Los dos ubicados en el centro del saco embrionario son los núcleos polares que se fusionan luego para originar un núcleo diploide.

1.2.3. Microsporogénesis

La microsporogénesis es el proceso mediante el cual se forman los granos de polen. Este proceso tiene lugar en el tejido esporágeno de las anteras. Una célula madre del polen (microsporocito, $2n$) se divide por meiosis. Durante la primera división se forma un par de células haploides (díadas). La segunda división meiótica produce una tétrada de microsporas haploides. Cada microspora o grano de polen sufre dos divisiones mitóticas sin división citoplásmica formando el gametofito masculino. La primera división mitótica produce una célula con dos núcleos haploides: un núcleo vegetativo (formará el tubo polínico al germinar en el estigma) y uno generativo. La segunda división mitótica (que sucede después del desarrollo del tubo polínico) ocurre únicamente en el núcleo generativo, formando dos núcleos espermáticos.

1.2.4. Fecundación

Cuando las anteras se tornan dehiscentes, los granos de polen son transferidos al estigma por los insectos, o por acción humana. Este proceso se conoce como polinización. Una vez en contacto con el estigma, los granos de polen germinan formando el tubo polínico que crece a través del estigma y el estilo, dirigiéndose a los óvulos en el ovario. El núcleo generativo del grano de polen se divide formando los dos gametos masculinos (núcleos espermáticos) que se mueven hacia abajo por el tubo polínico. El tubo penetra en el

óvulo por el micrópilo y crece hacia al interior del saco embrionario a través de una de las sinérgidas que flanquean la ovocélula, liberando los núcleos espermáticos.

En el interior del saco embrionario se produce una doble fecundación. Uno de los núcleos espermáticos (gameto masculino, n) se fusiona con el núcleo de la ovocélula (gameto femenino, n) originando el cigoto (diploide, $2n$), que luego desarrolla en embrión. El otro núcleo espermático se une con los dos núcleos polares formando el tejido nutritivo de reserva llamado endospermo (triploide, $3n$), importante para el desarrollo del embrión.

El embrión pasa por sus primeras etapas de desarrollo mientras se encuentra dentro del ovario de la flor, los integumentos se desarrollan en la cubierta de la semilla, el ovario madura y se transforma en fruto.

2. División celular

Es un proceso continuo que ocurre en todos los organismos vivos. Las etapas a través de las cuales pasa la célula de una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular.

El ciclo celular se divide en dos fases principales:

El periodo de división o fase M (mitosis o meiosis) y la interfase, denominada de esa manera debido a que antes se pensaba que era un periodo de reposo celular entre divisiones. En realidad, en esta fase se lleva a cabo la revisión de la división celular, donde actúan los sistemas reguladores (bloqueadores o inductores), siendo el período de máxima actividad metabólica de la célula.

La interfase comprende tres etapas:

- G1 (fase de crecimiento celular activo, síntesis de proteínas y ARN),
- S (fase de síntesis de ADN, se replica el material genético dando origen a dos cadenas nuevas), y
- G2 (otra etapa de crecimiento, más breve que la G1, en la cual se acumulan los productos necesarios para la división celular).

2.1 Mitosis

Es el proceso por el cual el material genético, previamente duplicado, se reparte equitativamente dando origen a dos células genéticamente idénticas. El número cromosómico permanece constante a través de las sucesivas divisiones celulares, con una distribución exacta de los cromosomas en las nuevas células formadas, manteniéndose la ploidía original. La mitosis se realiza principalmente en los meristemas, los

tejidos en los extremos de los tallos y en las raíces que permiten el crecimiento de las plantas, estas estructuras tienen la capacidad de dividirse a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo.

La división celular mitótica consta de dos procesos secuenciales: la división nuclear (cariocinesis) y la división citoplasmática (citocinesis).

La mitosis se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, que se reconocen por el arreglo de los cromosomas en el citoplasma.

2.1.1. Profase

Se aprecia la aparición nítida de los cromosomas, los cuales se encuentran lo suficientemente condensados y son visibles bajo el microscopio óptico. Cada cromosoma consta de dos copias longitudinales, llamadas cromátidas hermanas, que se observan claramente unidas por los centrómeros. Durante la profase el nucléolo pierde visibilidad, la membrana nuclear desaparece y el huso acromático se va estableciendo. Este último está constituido por fibras polares, que llegan desde cada polo del huso a la región central, y fibras cinetocóricas que se insertan en los cinetocoros (estructuras proteicas situadas a cada lado del centrómero) de los cromosomas duplicados. Las fibras del huso posibilitan la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis, mientras los cromosomas inician un proceso de acortamiento y engrosamiento. Al final de la profase, los cromosomas están completamente condensados y con la desaparición de la envoltura nuclear, quedan en contacto con el citoplasma.

2.1.2. Metafase

Al final de la profase, las cromátidas hermanas están unidas entre sí y también a las fibras cinetocóricas. Durante la metafase, estas fibras se alargan por polimerización y desplazan a los cromosomas hacia el centro del huso donde forman la placa ecuatorial o metafásica. Los cromosomas alcanzan su mayor grado de acortamiento y condensación, encontrándose perfectamente individualizados, por lo que son visibles con el microscopio óptico.

2.1.3. Anafase.

Los centrómeros se duplican y se dividen. Las cromátidas hermanas se separan y cada cromátida se convierte en un nuevo cromosoma. A medida que transcurre la anafase, los dos conjuntos idénticos de cromosomas se dirigen hacia los polos opuestos de la célula mediante las fibras del huso mitótico o acromático.

2.1.4. Telofase.

Comienza cuando los cromosomas hijos llegan a los polos de la célula. Los cromosomas pierden su estado de condensación y se alargan, desaparece el huso mitótico, se forman la envoltura nuclear y el nucléolo.

Se produce simultáneamente la citocinesis y finaliza la formación de la placa celular que dará lugar a la nueva pared celular entre las células recién formadas.

2.2. Meiosis

Es el proceso mediante el cual se obtienen células especializadas que intervienen en la reproducción sexual.

En la meiosis ocurren dos divisiones celulares que dan origen a cuatro células con el número de cromosomas reducidos a la mitad. Estas dos divisiones sucesivas, conocidas como meiosis I (primera división meiótica) y meiosis II (segunda división meiótica), son precedidas por una única duplicación del ADN.

En toda célula diploide, uno de los cromosomas proviene del gameto de uno de los progenitores y su par del gameto del otro progenitor. Estos pares de cromosomas, que se asemejan en forma, tamaño, y en el tipo de información hereditaria que contienen, se conocen como pares homólogos. En la meiosis I ocurre una serie de intercambios de material genético entre los cromosomas homólogos. Este proceso es dinámico, abarca atracción, apareamiento, intercambio y ulterior separación de los cromosomas homólogos paternos y maternos. El reparto de los cromosomas de cada par de homólogos ocurre al azar, lo cual contribuye a la variabilidad genética de los gametos.

En la segunda división meiótica (Meiosis II) se produce el reparto de las cromátidas hermanas de cada cromosoma entre los núcleos de las células hijas.

Cada división meiótica se divide en profase, metafase, anafase y telofase.

2.2.1. Meiosis I

Profase I, fase durante la cual se produce el entrecruzamiento (los cromosomas homólogos se aparean e intercambian fragmentos de material genético). Esta fase, la más compleja y larga de la meiosis, comprende cinco subfases:

Leptoteno. En esta fase el núcleo aumenta de tamaño, los cromosomas comienzan a condensarse en filamentos dentro del núcleo y se hacen visibles, como hebras largas y finas. Un examen más detenido revela que los cromosomas son claramente dobles, es decir, divididos longitudinalmente en dos cromátidas. La membrana nuclear y el nucléolo están presentes. Además, se observa el desarrollo de pequeñas áreas de engrosamiento a lo largo del cromosoma, llamadas cromómeros, que le dan la apariencia de un collar de perlas (Fig. 2A).

Zigoteno. Comienza el apareamiento de los cromosomas homólogos (paterno y materno), proceso denominado sinapsis (Fig. 2B). Los cromosomas homólogos se acercan y se unen en toda su longitud mediante un complejo sinaptonémico de naturaleza proteica, formando un bivalente. Cada homólogo consta de dos cromátidas hermanas y el par de homólogos consta de cuatro cromátidas. En el apareamiento entre homólogos también está implicada la secuencia de genes de cada cromosoma, lo cual evita el apareamiento entre cromosomas no homólogos.

Paquiteno. Una vez formados los bivalentes se produce el fenómeno de entrecruzamiento o *crossing over*, en el cual las cromátidas homólogas se rompen a un mismo nivel e intercambian material genético (Fig. 2C). La recombinación genética resultante hace aumentar en gran medida la variación genética entre la descendencia de progenitores.

Diploteno. Los cromosomas homólogos comienzan a separarse entre sí, excepto en los puntos donde se ha producido la recombinación, llamados quiasmas. El nucléolo y la membrana nuclear empiezan a desaparecer y el entrecruzamiento se hace visible (Fig. 2D). La consecuencia es la formación de nuevas combinaciones de genes, con alteración de la información genética localizada en los cromosomas involucrados.

Diacinesis. Los bivalentes se hallan más condensados. Empieza a aparecer el huso acromático, los bivalentes quedan unidos al huso por sus centrómeros, la membrana nuclear desaparece (Fig. 2E).

Metafase I. Los bivalentes se sitúan a cada lado del plano ecuatorial (Fig. 2F). El huso se ha formado completamente y cada homólogo tiene su centrómero. Por ello, el cromosoma completo se dirige a uno de los polos. Los cromosomas aparecen más condensados.

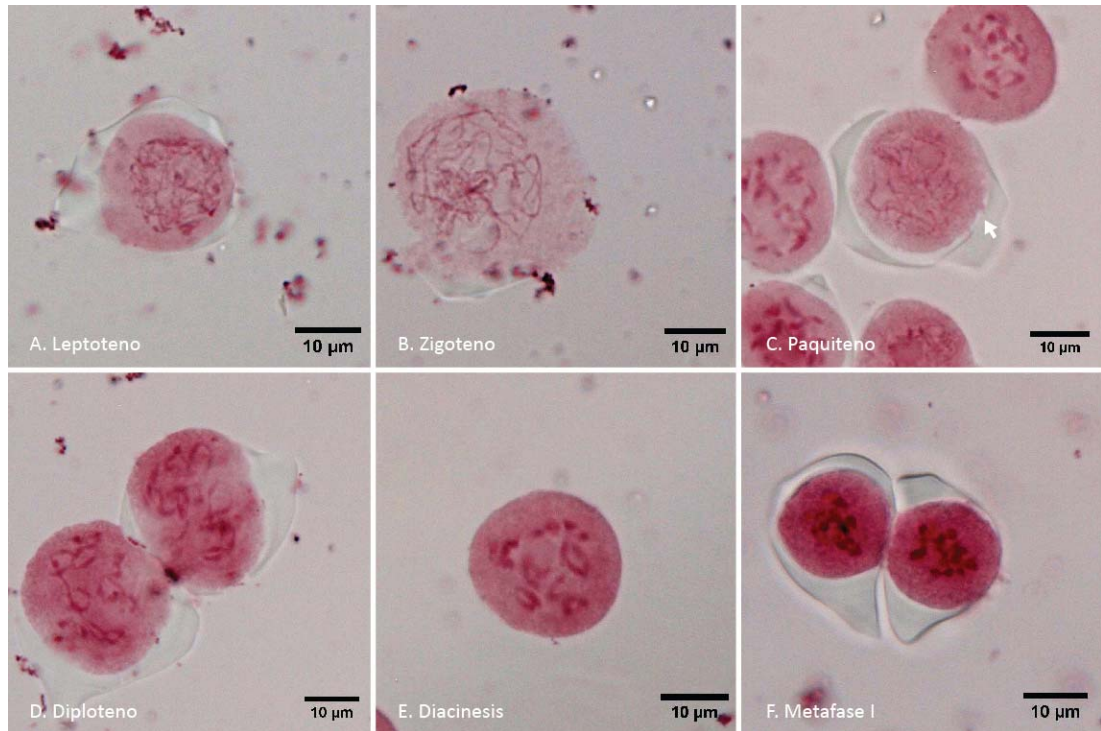


Fig.2. Fases tempranas de la meiosis

A) Leptoteno, B) Zigoteno, C) Paquiteno (flecha), D) Diploteno, E) Diacinesis y F) Metafase I. Aumento 600X. Barra 10 µm.

Anafase I. Los cromosomas homólogos se separan y migran hacia los polos respectivos u opuestos de la célula (Fig. 3A) por acción de los microtúbulos del huso acromático. Sin embargo, debido a los entrecruzamientos ocurridos, las cromátidas no son idénticas como lo fueron al comienzo de la meiosis. Los centrómeros no se dividen, las cromátidas hermanas continúan unidas, pero los homólogos se separan; como resultado, uno de los pares homólogos recibe un cromosoma de origen paterno y el otro, en el polo contrario, un cromosoma de origen materno.

Telofase I. Los pares de cromosomas homólogos llegan a los polos de la célula y se forma la membrana nuclear. La citocinesis produce dos células (Fig. 3B), que contienen la mitad del número de cromosomas presentes en la célula madre.

2.2.2. Meiosis II

La segunda división meiótica se parece a la mitosis, excepto que no está precedida por la duplicación del material cromosómico.

Profase II. Cada célula es haploide, la membrana nuclear empieza a desintegrarse. El nucléolo desaparece al final de esta etapa y se forma el huso acromático (Fig. 3C).

Metafase II. Los cromosomas que han quedado en los polos se colocan en el plano ecuatorial y se adhieren a las fibras del huso (Fig. 3D).

Anafase II. Los centrómeros se dividen y las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos (Fig. 3E).

Telofase II. Se forma la membrana nuclear alrededor de cada juego de cromosomas y ocurre la citocinesis, produciendo cuatro células hijas, cada una con un número haploide de cromosomas (Fig. 3F). Debido al entrecruzamiento, algunos cromosomas tienen segmentos recombinados de los cromosomas progenitores originales.

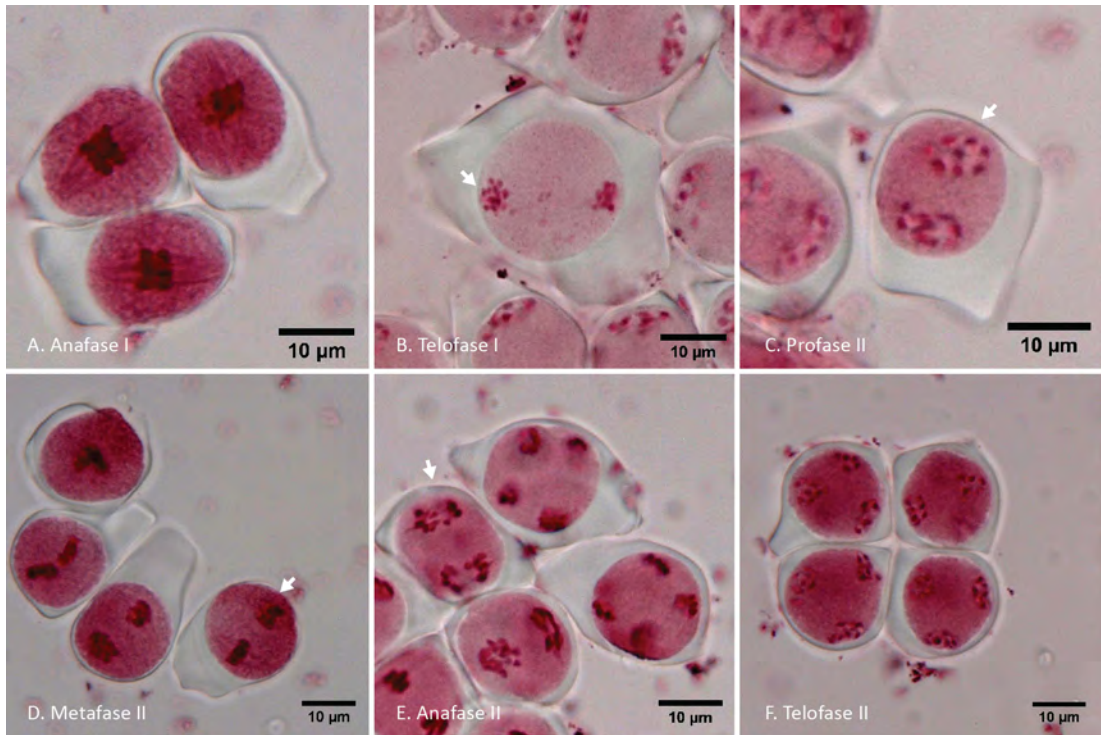


Fig.3. A) Anafase I, B) Telofase I, C) Profase II, D) Metafase II (flecha), E) Anafase II (flecha) y F) Telofase II. Aumento 600X. Barra 10 µm.

3. Gametos no reducidos (2n)

La ocurrencia de gametos 2n parece estar controlada genéticamente, pero la expresión de estos genes está influenciada por el medio ambiente (Ramana & Jacobsen, 2003). Así, algunos autores mencionan que un gen mayor es responsable de la formación de los gametos 2n mientras que varios genes controlan su frecuencia (Dewitte *et al.*, 2012).

Dependiendo de la fase en que actúan, los genes se clasifican en pre-meióticos, meióticos y post-meióticos. La mutación de dichos genes altera significativamente la meiosis, afectando la fertilidad gamética y puede conducir a la formación de gametos, con el número somático de cromosomas o no reducidos. (Bretagnolle & Thompson, 1995).

Generalmente el origen de los gametos no reducidos ocurre por la desviación de dos procesos meióticos. Recordemos que durante la meiosis normal, ocurren dos divisiones sucesivas en las células meióticas, la primera dirigida a la separación de los cromosomas homólogos apareados y la segunda, a la separación de las cromátidas hermanas de cada cromosoma.

En la división con restitución de la primera división meiótica (FDR), el apareamiento y/o la separación de los cromosomas homólogos no ocurre en la anafase I; así, la primera división ocurre como en una división mitótica y la segunda división meiótica ocurre normalmente, con las dos cromátidas hermanas moviéndose hacia los polos opuestos.

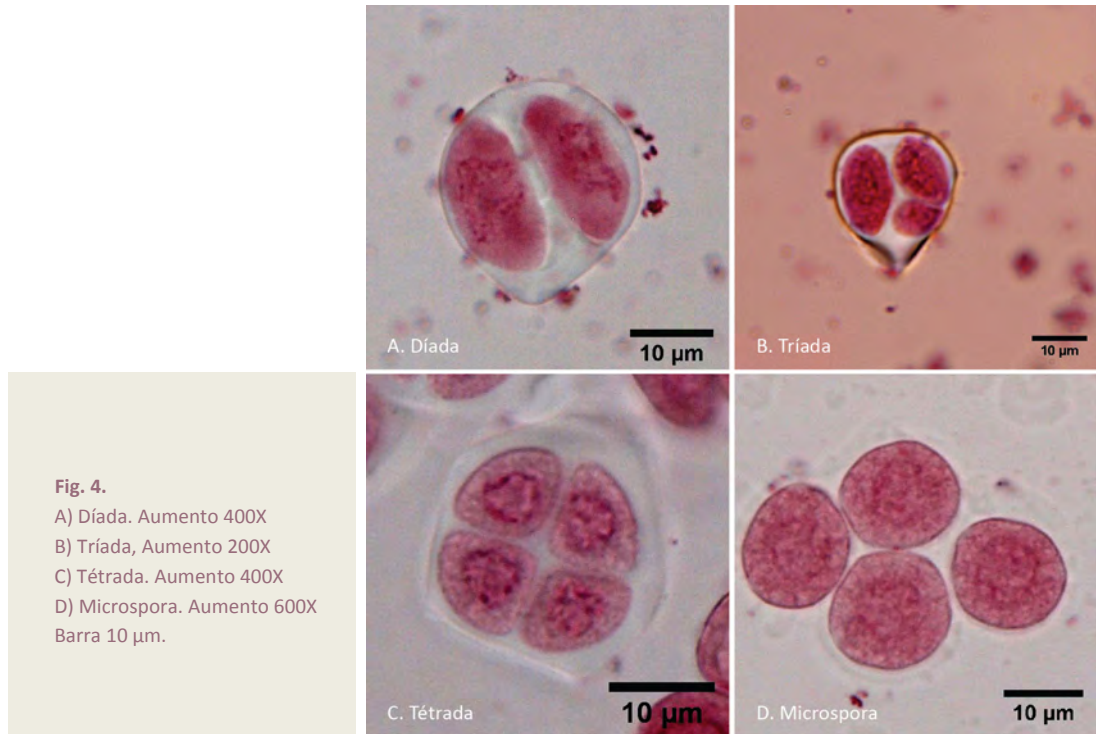
En la división con restitución de la segunda división meiótica (SDR), el apareamiento y separación de los cromosomas homólogos ocurre normalmente durante la primera división meiótica, pero las cromátidas hermanas no se separan durante la segunda división meiótica.

Un gameto no reducido se considera gameto producto de la FDR si posee dos cromátidas no hermanas, y gameto de la SDR si posee dos cromátidas hermanas.

La incidencia de gametos no reducidos es frecuente en el reino vegetal y su ocurrencia ha sido reportada en muchas especies de familias como *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Leguminosae*, *Rosaceae* y *Vitaceae* (Veilleux, 1985; Camadro, 1986; Barba-González *et al.*, 2005).

Los gametos no reducidos son de gran interés en el mejoramiento genético, ya que facilitan la poliploidización sexual y a la vez proporcionan un método muy efectivo para transmitir la diversidad genética de las especies diploides (2x) al nivel tetraploide (4x). Pueden ser detectados por la ocurrencia de una progenie tetraploide cuando se realizan cruzamientos $4x \times 2x$ (polen 2n) o $2x \times 4x$ (huevos 2n) con una distribución bimodal del diámetro del polen, así como por la presencia de díadas (Fig. 4A), tríadas (Fig. 4B) y/o tétradas (Fig. 4C), en el estadio de formación de microsporas (Fig. 4D).

Asimismo, existen mecanismos que regulan la cruzabilidad mencionados en la siguiente sección.



4. Barreras de incompatibilidad

A veces ocurre que el grano de polen (a pesar de ser fértil), no germina, o germina pero el tubo polínico detiene su crecimiento cuando se encuentra sobre un determinado estilo; por lo tanto no se logra la fecundación.

Este mecanismo tiene como finalidad evitar los cruzamientos entre genotipos emparentados, favoreciendo la heterocigosidad en las poblaciones, manteniendo así el vigor híbrido y evitando las consecuencias de la depresión endogámica.

Se estima que el 39 por ciento de especies de angiospermas presentan mecanismos de incompatibilidad.

Se ha determinado incompatibilidad en más de 3000 especies pertenecientes a las fanerógamas. Dentro de una misma familia el tipo de incompatibilidad es constante (aunque no todas las especies dentro de la familia presentan necesariamente incompatibilidad).

La incompatibilidad está determinada genéticamente y existen diferentes mecanismos genéticos que difieren en su grado de eficiencia.

4.1. Sistema de Incompatibilidad Gametofítica (GSI)

En este sistema, la especificidad de reconocimiento del polen está determinado por el genotipo haploide del Locus polimórfico S: el tubo polínico es detenido cuando este haplotipo S es el mismo que alguno(s) de los haplotipos del pistilo diploide. Es decir, ocurre polinización cuando el genotipo del polen es diferente del genotipo femenino (Fig. 5A).

Este sistema es el más extendido y ha evolucionado para impedir la homocigosidad, favoreciendo, en consecuencia, a la heterocigosidad.

Las familias que poseen este tipo de incompatibilidad son las Solanaceae, Plantaginaceae y Papaveraceae.

4.2. Sistema de Incompatibilidad Esporofítica (SSI)

En este sistema, la especificidad del reconocimiento del polen está determinada por el genotipo diploide del parental (esporofito). El tubo polínico es detenido cuando uno de los haplotipos S coincide con alguno de los haplotipos S del pistilo diploide, pero es compatible cuando el polen lleva un haplotipo S no presente en el pistilo. El sistema esporofítico difiere del sistema gametofítico en que el alelo S exhibe dominancia; además, este puede tener una acción tanto en el polen como en el estilo, haciéndolo más complejo (Fig. 5B).

Este tipo de incompatibilidad ocurre en las Brassicaceae y Asteraceae.

La incompatibilidad se debilita en ocasiones por la mutación a alelos de baja eficacia (incompatibilidad parcial) o por la acción ambiental (pseudocompatibilidad), produciéndose sistemas no muy eficaces que permiten autofecundaciones en mayor o menor grado.

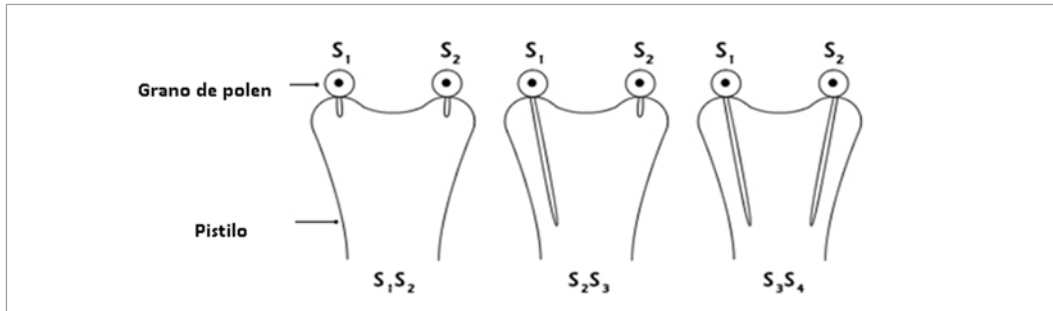


Fig. 5A. Sistema gametofítico de incompatibilidad y compatibilidad por tipo de cruce.

Compatibilidad por tipo de cruce

$S_1 S_2 \times S_3 S_4$: Totalmente compatible

$S_1 S_2 \times S_1 S_3$: Parcialmente compatible

$S_1 S_2 \times S_1 S_2$: Totalmente incompatible

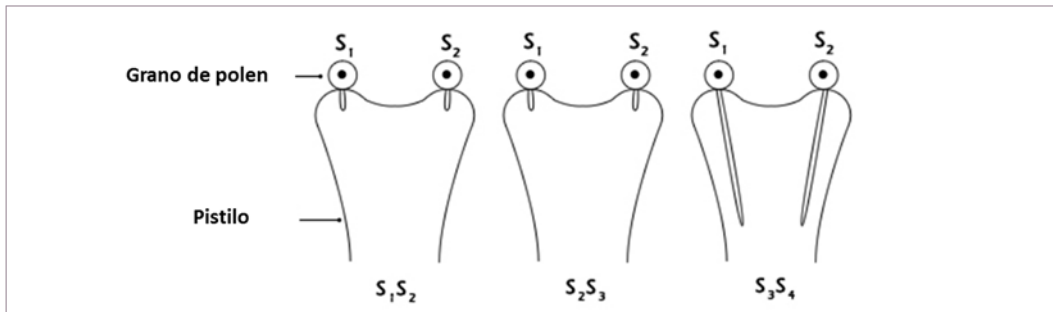


Fig 5B. Sistema esporofítico de incompatibilidad.

El polen no germina en el estigma de una flor que contenga cualquiera de los dos alelos que están presentes en el esporofito que produjo el polen.

La misma condición se aplica a pesar de que cada grano de polen (haploide) contiene sólo uno de los alelos. Por lo tanto, los granos de polen (S_1 o S_2) producidos por la planta $S_1 S_2$ germinarán sólo en planta $S_3 S_4$ y no en $S_1 S_2$ o $S_1 S_3$ y así sucesivamente.

El orden de dominancia es $S_1 > S_2 > S_3 > S_4$

5. Androesterilidad

Se refiere a la incapacidad de una planta para producir polen fértil. Se clasifica de acuerdo a las causas genéticas de la androesterilidad.

5.1. Androesterilidad genética

Está determinada generalmente por un locus con dos alelos: *Ms* y *ms* (“*male sterility*”), siendo el homocigoto recesivo el que determina la “macho esterilidad”, los otros genotipos producen plantas androfértiles. Para ser útil en el mejoramiento genético, este tipo de esterilidad debe ser estable en un amplio rango de ambientes e inhibir toda la producción de semilla.

5.2. Causa Citoplasmática

Está determinada por factores citoplasmáticos. Los genes responsables están ubicados en la mitocondria. La transmisión de esta esterilidad es vía materna.

5.3. Interacción genética-citoplasmática

Este tipo de esterilidad está determinada por la interacción entre genes nucleares (*R* y *r*) y citoplasmáticos (portadores de plasmagenes que producen androesterilidad o no).

Segunda Parte: Técnicas citológicas

1. Determinación de ploidía en células somáticas

El conocimiento de la ploidía de una especie es de gran ayuda en la determinación taxonómica y de gran importancia en los programas de mejoramiento.

Los tres métodos de determinación de la ploidía que más se utilizan son:

El conteo de cloroplastos en células guarda de los estomas, el conteo de cromosomas en puntas de raíces y la citometría de flujo (Ochat *et al.*, 2011).

1.1 Conteo de cloroplastos en las células guarda de los estomas

Aunque no es una técnica exacta para la determinación de la ploidía de un genotipo, el conteo de cloroplastos en las células guarda de los estomas permite distinguir el grupo diploide de los otros grupos (Huamán, 1995).

Se recomienda utilizar esta técnica solamente como una evaluación preliminar para la selección de diploides y no para ploidías mayores. El número promedio de cloroplastos nos da una indicación del nivel de ploidía (Tabla 1), para una ploidía $2x$, el rango es de 6 a 8 cloroplastos por célula guarda, mientras que entre 9 a 14 cloroplastos indican un nivel mayor de ploidía.

Tabla 1. Escala para determinar la ploidía de un genotipo de acuerdo al número de cloroplastos.

Nº de cloroplastos en las células guarda de los estomas	Ploidía
6 - 8	Diploide ($2n=2x=24$)
9 - 11	Triploide ($2n=3x=36$)
12 - 14	Tetraploide ($2n=4x=48$)

Toma de la muestra

Colectar de 3 a 5 folíolos del tercio superior de cada genotipo a evaluar.

Procedimiento

Preparación

1. Colocar los folíolos en una placa de Petri que contenga papel toalla en la base, humedecida con agua destilada (Fig. 6A).
2. Colocar 1 a 2 gotas de solución de yodo-yoduro de potasio (I-KI) (Anexo 1e) en el centro de una lámina portaobjeto.
3. Con la ayuda de una pinza fina extraer el tejido epidérmico del envés de la hoja, de una zona próxima a las nervaduras e inmediatamente colocarlo suavemente sobre la lámina (Fig. 6B).
4. Agregar otras dos gotas de la solución yodo-yoduro de potasio y cubrir con una lámina cubreobjetos (Fig. 6C).

Observación

5. Examinar bajo microscopio óptico a un aumento de objetivo de 100, 200 o 400X. El conteo de cloroplastos se realiza en una de las dos células guardia de los estomas, en 10 estomas diferentes. (Fig. 7 A, B y C).

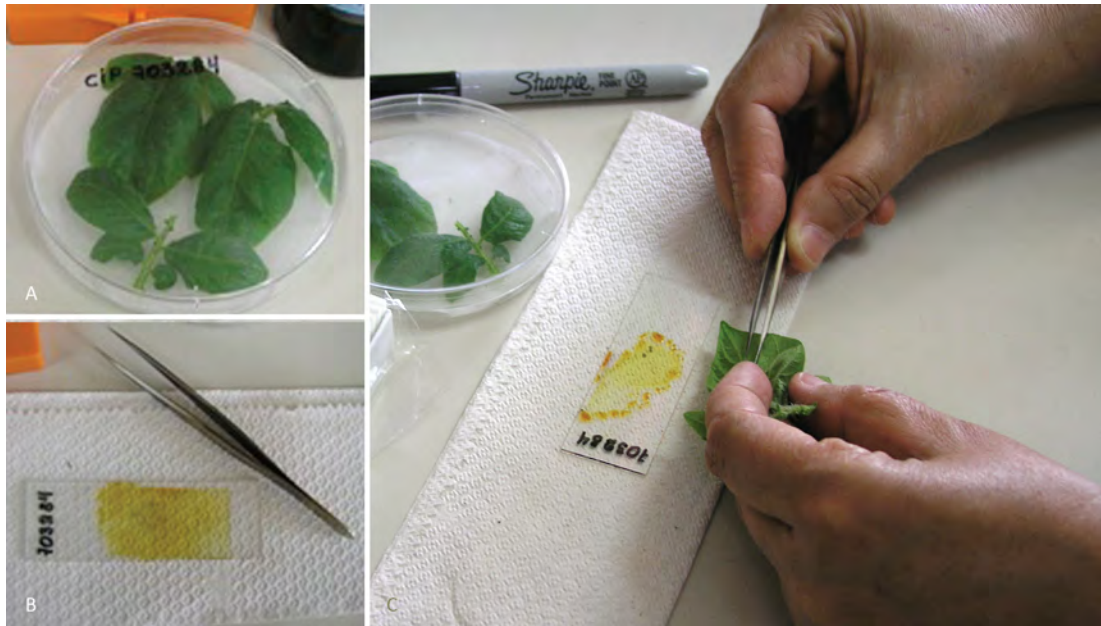


Fig. 6. A) Colecta de folíolos de papa, B) Extracción del tejido epidérmico del envés de la hoja; y C) Lámina lista para observar bajo microscopio.



Fig. 7. A) Partes de un estoma B) genotipo tetraploide (flecha, 12 cloroplastos en célula guardia), C) genotipo diploide (flecha, 7 cloroplastos en célula guardia). Aumento 400X. Barra 10 µm.

1.2. Conteo de cromosomas en puntas de raíces

La papa posee cromosomas muy pequeños, lo que dificulta su observación y conteo. Para una determinación correcta del número de cromosomas es necesario utilizar técnicas citológicas que muestren resultados confiables y contar con cromosomas bien separados y coloreados, por lo que las muestras deberán ser colectadas en estadio de metafase.

La determinación del número cromosómico en células somáticas de papa se realiza en las puntas de raíces. Inicialmente, las raíces son sometidas a un pretratamiento o prefijación que permite:

- la acumulación de un gran número de células metafásicas en el meristemo,
- la separación y acortamiento de los cromosomas, y;
- la clarificación de los centrómeros, facilitando así el conteo cromosómico.

Este pretratamiento se realiza con sustancias denominadas inhibidores de mitosis, como agua helada, 8-hidroxiquinoleína, colchicina, paradiclorobenceno y los piretroides (Tjio and Levan, 1950; Hermsen, 1971; Klein, 1990; Watanabe y Orrillo, 1993; Singh, 1993; Chen & Li, 2005).

Los inhibidores de mitosis inhiben la formación de los microtúbulos que constituyen las fibras del huso mitótico, por lo tanto, impiden la separación y la migración de las cromátidas hacia los polos, deteniendo la división celular en el estadio de metafase.

En el laboratorio de citogenética, se realiza un pretratamiento con permetrina, un insecticida piretroide con esta composición química: 3-fenoxifenil metil () cis-trans 3-(2,2-dicloroetenil) 2,2-dimetil carboxilato de cicloropropan.

Precisamente, Watanabe y Orrillo (1993) reportan que el pretratamiento con permetrina produce una mejor visibilidad de los cromosomas que el agua helada o la 8-hidroxiquinoleína.

Las raíces prefijadas son luego fijadas para conservar invariable la estructura celular. Como fijadores se usan generalmente mezclas alcohol-ácido.

Al momento de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa de células, evitando la superposición. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos (celulasas y pectinasas) que destruyen tanto la pared celular como la pectina de las uniones intercelulares. El más utilizado es el ácido clorhídrico, que provoca una hidrólisis de las sustancias pécticas de la lámina media, facilitando la separación de las células.

Finalmente, las raíces se colorean para visualizar los cromosomas utilizando colorantes como lacto-propiónico orceína u orceína-acética. El aplastado o squash completa la disociación del tejido, facilitando así la observación de los cromosomas.

Toma de la muestra

Procedimiento

1. Sembrar individualmente en macetas de 4 pulgadas (que contengan un sustrato compuesto de tierra y musgo en proporción 2 a 1) tubérculos de 3 a 5 cm. de diámetro y con brotes de buen tamaño. También se pueden germinar semillas, enraizar esquejes, o cultivar plantas *in vitro*.
2. Dejar desarrollar las plantas hasta que alcancen una altura de 5 cm. Las plantas deben estar en perfecto estado de desarrollo y con raíces finas.
3. Realizar la colecta de raíces considerando el índice mitótico (Im). En el caso de Lima, Perú, efectuar la colecta entre las 10 u 11 horas de la mañana (Talledo *et al.*, 1993).
4. Remover las plantas de las macetas, volteando la maceta y aplicando un ligero golpe en la base de la misma.
5. Con la ayuda de una pinza de punta fina, cortar aproximadamente 10 mm de la parte terminal o punta de la raíz, la cual presenta un color blanco hialino (Fig. 8A).

Pre-tratamientos alternativos:

- Agua helada: colocar las raíces en frascos con agua destilada y almacenar los frascos dentro de un recipiente que contenga agua y hielo, por 48 horas, bajo refrigeración a 4°C.
- 8-hidroxiquinoleína: colocar las raíces en frascos que contengan una solución de 8-hidroxiquinoleína (Anexo 1a), por un mínimo de 3 horas (el tiempo óptimo es de 5 horas), a 15°C.
- Colchicina: dejar las raíces en una solución de colchicina 0.05 a 0.5 %, (Anexo 1b) durante 4 a 6 horas, a 10-15°C.

Prefijación

6. Colocar las raíces colectadas en viales o frascos pequeños conteniendo agua destilada a temperatura ambiente (Fig. 8B), con la finalidad de que la presión de turgencia expanda las células.
7. Después de 1 hora, trasladar las raíces a una solución de prefijación, que contenga el piretroide (15 μ L de permetrina disuelta en 100 mL de agua helada a un pH de 5 a 5.8), dejándolas por 24 horas bajo refrigeración a 4°C (Fig. 8C).

Fijación*

8. Transferir las raíces a la solución de Farmer (Anexo 1c), y mantener a temperatura ambiente durante 24 horas.

* Esta etapa se puede obviar si se procesan las muestras inmediatamente.

Hidrólisis

9. Agregar a las raíces ácido clorhídrico (HCl) 1N, previamente calentado a 60°C (Fig. 8D).
10. Calentar la solución de ácido clorhídrico (HCl) conteniendo las raíces en una incubadora a 60°C, por 8 a 10 minutos (Fig. 8E).
11. Eliminar el ácido clorhídrico (HCl) y lavar cuidadosamente las raíces con agua destilada.

Tinción

12. Colocar las raíces en una solución de lacto-propiónico orceína (Anexo 1d) en contenedores pequeños o lunas de reloj por 5 minutos (Fig. 8F).

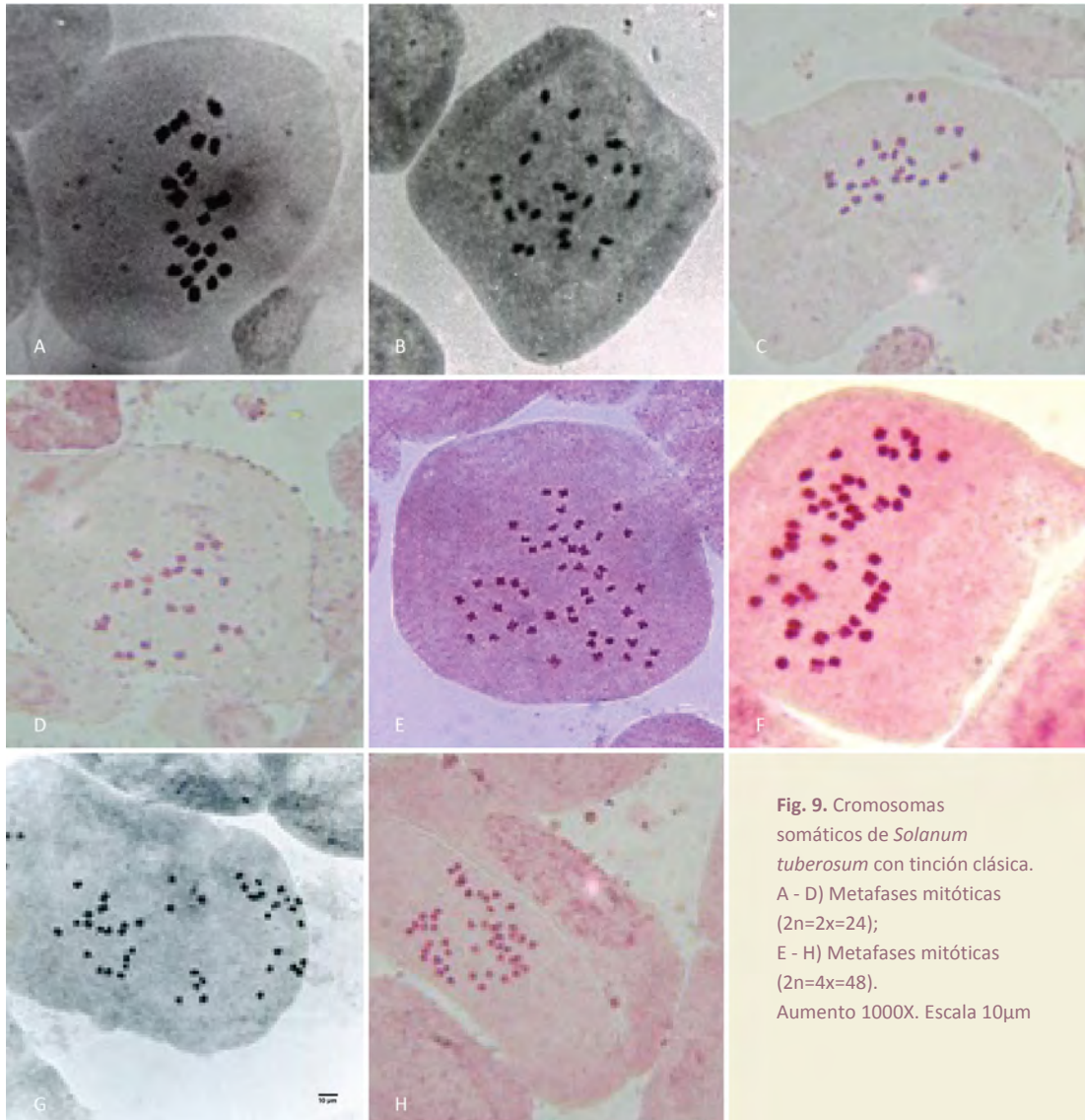
Aplastado o squash

13. Cortar 1-2 mm de la punta de la raíz y colocarla en el centro de una lámina portaobjeto (Fig. 8G).
14. Añadir una gota de lacto-propiónico orceína y colocar sobre esta una lámina cubreobjetos.
15. Asegurando uno de los extremos de la lámina, presionar suavemente la punta con un borrador de lápiz, o dando golpes repetidos y firmes.
16. Colocar la lámina portaobjeto entre hojas de papel de filtro y presionar fuertemente con el dedo pulgar, este paso se denomina en inglés “squash”; evitar cualquier movimiento lateral de la lámina cubreobjetos (Fig. 8H).

Observación

17. Colocar la lámina portaobjeto conteniendo la muestra bajo microscopio óptico a un aumento de 100 o 200X.
 18. Seleccionar los campos con las mejores metafases y observar con un objetivo de mayor aumento, de 400X o 1000X, para el conteo de cromosomas (Fig. 9A-H).
- Solo se considerarán válidas las células intactas y no superpuestas, a fin de no distorsionar el conteo exacto de los cromosomas.





1.3. Determinación de ploidía mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es un método rápido, que ayuda a inferir la ploidía de una planta, a partir de la medición de la cantidad de ADN existente en los núcleos de sus células.

Permite evaluar un gran número de muestras por día, pues la preparación de estas ocupa sólo unos minutos y no requiere reactivos costosos. Existen más de 800 publicaciones, además de una base de datos dedicada a estudios de citometría de flujo en plantas, como FLOWER (<https://botany.natur.cuni.cz/flower/search.php>) de cerca de 6000 especies de angiospermas evaluadas (Bennett & Leitch, 2011).

La técnica está basada en las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) de las partículas que fluyen en una suspensión líquida, lo que permite una discriminación eficaz y precisa de la cantidad de núcleos que previamente han sido aislados y marcados con un fluorocromo.

La estimación del contenido de ADN nuclear de una muestra requiere comparar la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con un tamaño de genoma conocido. Por lo tanto es importante incluir muestras control (de la especie y de ploidía conocida) cada vez que se realice una evaluación. A medida que desfilan las muestras marcadas son arrastradas por un flujo portador del analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), frente a un sistema de detección (lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 488 nm de longitud de onda). La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 μm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), mientras es iluminada por la luz ultravioleta. El fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN en el núcleo, emisión que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema se calibra previamente, situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor 100 de la escala de abscisas (Gutierrez y Moreno, 2005). El patrón se determina según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares (2C, 4C, 8C, etc.).

Toma de la muestra

1. Colectar aproximadamente 40 a 50 mg de folíolos de la parte apical de la planta y colocarlos en placas de Petri (Fig. 10A).

Procedimiento

Preparación

2. Colocar la muestra en una placa de Petri y adicionar 0.5 mL del búfer de extracción (CyStain UV Ploidy), el cual contiene el fluorocromo DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) que colorea el ADN.
3. Cortar los folíolos con una hoja de afeitar, seccionándolos en pequeños cuadrados hasta disgregar el tejido (usar una cuchilla nueva por cada muestra) (Fig. 10B).
4. Adicionar nuevamente 1.5 mL del búfer de extracción e incubar por 5 min. a temperatura ambiente.

Una vez resuspendida, pasar la mezcla a través de un filtro de nylon de 30 μm (Partec 50 μm , Cell Trics™) que permite la separación de los núcleos, los cuales pasan a un tubo receptor, colocado en el analizador (Fig. 10C y 10D).

Observación

El sistema informático del citómetro de flujo convierte cada señal fluorescente en un resultado, presentándolo en un histograma con escala logarítmica. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de las abscisas (eje "x"), y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de las ordenadas (eje "y") (Fig. 11).

Todas las células que pertenecen a un solo pico tienen la misma cantidad de ADN medido y este pico representa un nivel de ploidía. El ruido consiste en una pequeña señal indeseada y aparece como resultado de los fragmentos resultantes de las células al momento de su preparación.

La cuantificación del ADN permite conocer también la existencia de aneuploidías, si se observa que la curva de los histogramas se desplaza levemente hacia uno u otro lado de la ploidía esperada.

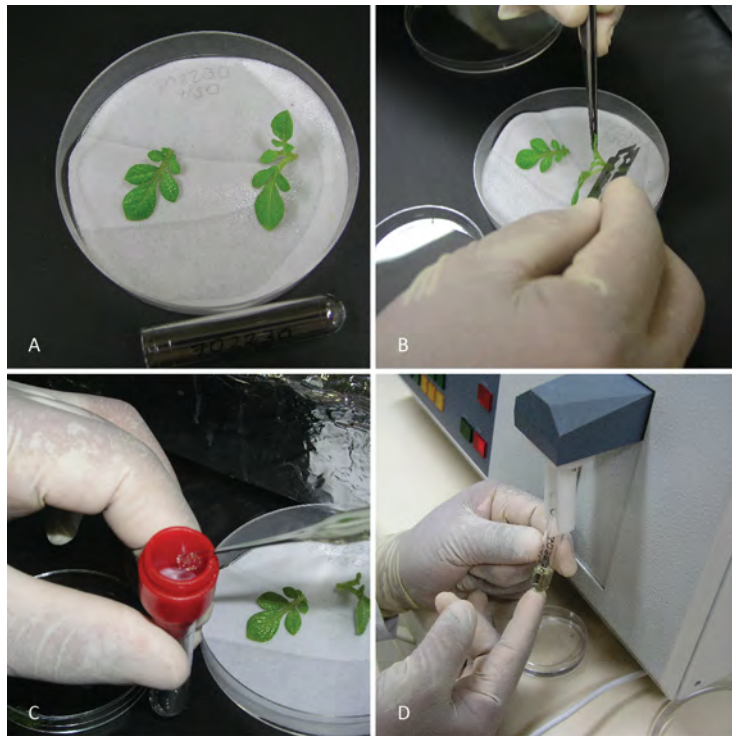
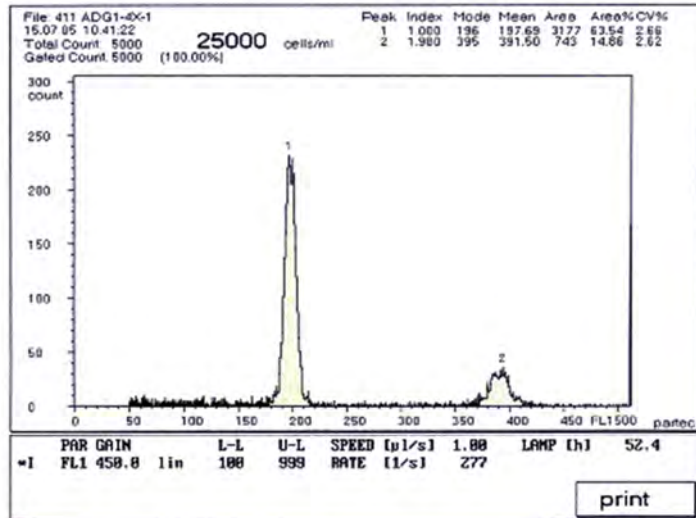
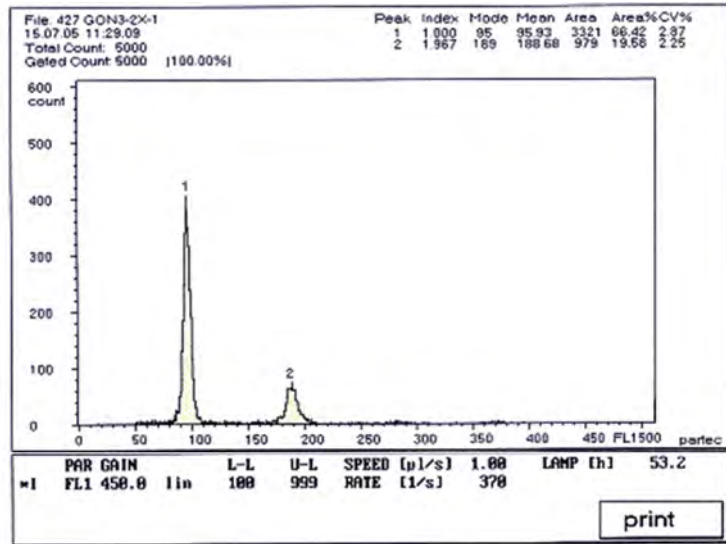


Fig. 10.

- A) Muestras para evaluación
- B) Seccionar muestra con una hoja de afeitar
- C) Filtrar la muestra para separación de los núcleos
- D) Análisis de muestra en el citómetro de flujo

Fig. 11.
 Histogramas con
 resultados para ploidías
 A) *Solanum goniocalyx*
 ($2n=2x=24$) y *Solanum*
tuberosum spp *andigena*
 ($2n=4x=48$)



2. Comportamiento cromosómico en células sexuales

La microsporogénesis se estudia en anteras inmaduras, debido a que el proceso meiótico termina muy pronto en la diferenciación celular.

Se utiliza el método de tinción de las células madres del polen que se obtienen de los botones florales, pues éste es un proceso tejido-específico.

La obtención de muestras apropiadas de botones florales depende de varios factores, como el medio ambiente, la hora de la colecta y factores genéticos. Cabe recordar que el proceso de microsporogénesis generalmente tiene una duración de 7 a 14 días antes de la floración.

Sólo es posible observar meiosis en primordios tempranos, en los que la diferenciación no está avanzada.

Toma de la muestra

Colectar botones florales de diferentes estadios de desarrollo.

Fijación

1. Colocar los botones florales en pequeños recipientes de vidrio que contengan una solución recientemente preparada de Carnoy modificada (Anexo 1f).
2. Realizar un corte con una hoja de bisturí en los botones florales con la finalidad de que el fijador penetre completamente en los tejidos.
3. Dejar las muestras dentro de esta solución de 24 a 48 horas a temperatura ambiente.

Preparación

4. Seleccionar los botones previamente fijados y colocarlos en una luna de reloj conteniendo etanol al 70% (Fig. 12A).
5. Sobre una lámina portaobjeto, diseccionar los botones cortando los extremos y presionándolos con una aguja de disección hasta obtener fragmentos de tejido muy pequeños.
6. Colocar una gota de carmín propiónico sobre la muestra y cubrirla con una lámina cubreobjetos (Fig. 12B).

Observación

7. Calentar la muestra pasando la lámina portaobjeto por la llama de un mechero Bunsen.
8. Retirar el exceso de tinte colocando la lámina entre dos papeles de filtro, evitando el movimiento de esta.
9. Golpear suavemente la lámina cubreobjetos con la ayuda de un borrador de lápiz para expandir los cromosomas.
10. Examinar la preparación bajo microscopio óptico a un aumento de 400 o 1000X, e identificar los diferentes estadios (Fig. 13).



Fig. 12. A) Botones florales fijados. B) Tinción de las anteras con el colorante carmín propiónico.

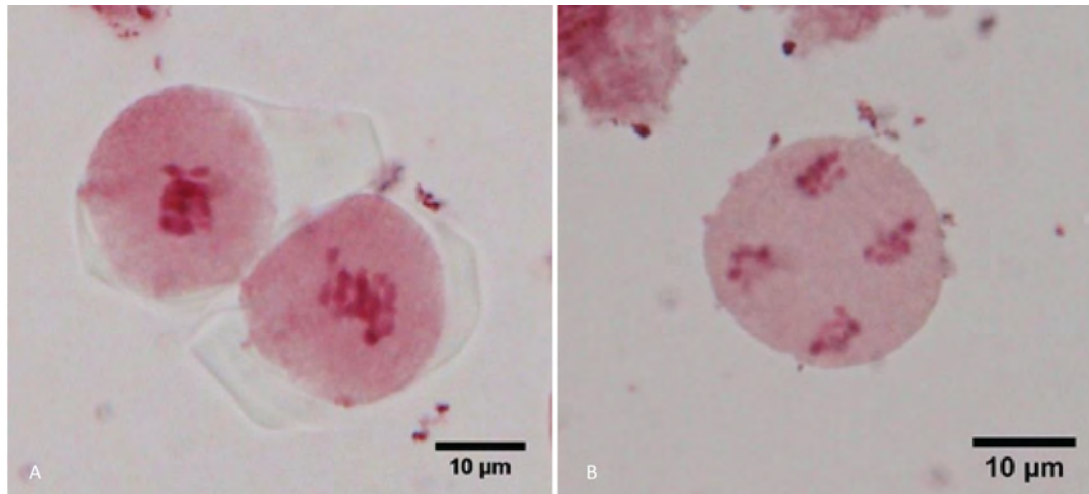


Fig.13. A) Anafase I exhibiendo cromosomas retrasados, B) Anafase II exhibiendo husos paralelos. Aumento 600X. Barra 10 µm

3. Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del polen

En los programas de mejoramiento genético, la determinación de la viabilidad del polen es un factor esencial para iniciar el plan de cruzamientos, lograr hibridaciones dirigidas exitosas y así obtener semilla híbrida. La evaluación de la viabilidad del polen permite identificar los progenitores masculinos fértiles para utilizarlos como polinizadores. La viabilidad de polen se puede estimar calculando el porcentaje de polen viable mediante una prueba de tinción o el porcentaje de polen germinado con la prueba de germinación in vitro. Se pueden aplicar distintos métodos en el estudio de la viabilidad del polen, entre ellos la tinción con colorantes o la germinación in vitro. Además, se propone una escala basada en los rangos de la viabilidad de polen de genotipos promisorios a fin de determinar si pueden ser utilizados como parentales masculinos en los programas de mejoramiento (Tabla 2 y Fig. 16).

Tabla 2. Asignación de escala de acuerdo al porcentaje de polen viable.

Escala	Rangos (%)	Descripción de la viabilidad
1	0	Estéril
3	$0 < \% \leq 50$	Bajo
5	$50 < \% < 80$	Moderado
7	$80 \leq \% \leq 100$	Alto

Fig. 14.

- A) Extracción de polen en una cápsula de gelatina
- B) Colocar el colorante en la lámina
- C) Esparcir el polen en el colorante
- D) Guardar las muestras a 4°C



3.1. Prueba de tinción (con Gelatina de acetocarmín glicerol o con X-Gal)

El objetivo de las técnicas de tinción es determinar en el grano de polen la actividad enzimática de la membrana, así como la integridad y color del núcleo.

La viabilidad del polen se puede estimar calculando el porcentaje de polen viable mediante la prueba de tinción con gelatina de acetocarmín glicerol o con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido).

Toma de la muestra

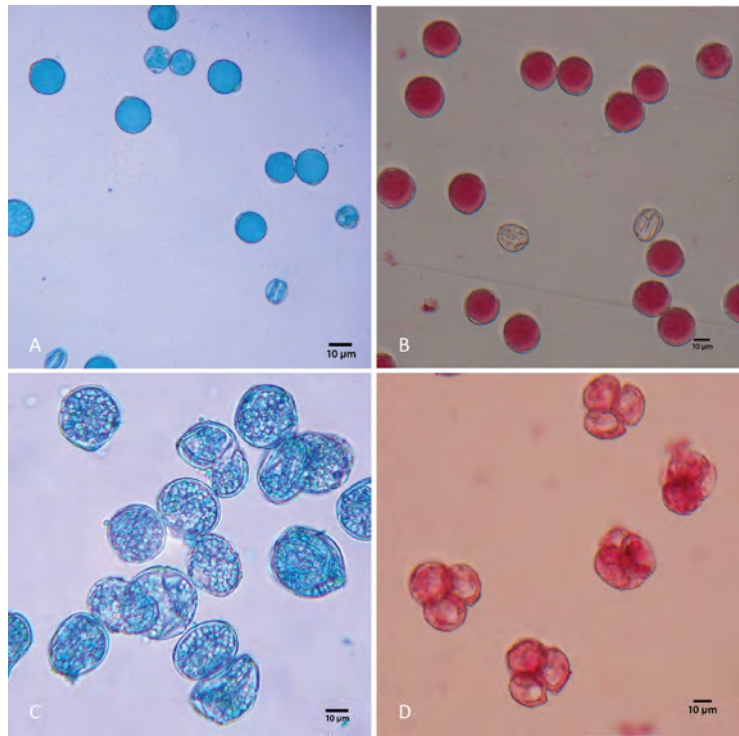
1. Colectar flores completamente abiertas, con las anteras próximas a la dehiscencia o completamente dehiscentes.
2. Extraer polen de una o más anteras con la ayuda de un vibrador (Fig. 14A) o dando golpecitos a las anteras con una aguja de disección para dejar caer el polen directamente sobre una lámina portaobjeto (si el polen ha sido previamente colectado en cápsulas de gelatina, una cantidad suficiente es colocada de la misma manera con la punta de una aguja o con un palillo mondadientes de madera).
3. En el centro de un portaobjeto, previamente identificado, colocar 1 o 2 gotas de gelatina de acetocarmín glicerol al 2% (Fig. 14B) (Anexo 1h). En caso se utilice el colorante X-Gal, incubar el polen en la solución X-Gal (Anexo 1i), por 30 min. en oscuridad a 37°C.
4. Esparcir el polen en el colorante con ligeros movimientos circulares con ayuda de un palillo mondadientes (Fig. 14C).
5. Deja reposar la muestra por 1 min. y cubrirla con una lámina cubreobjetos.
6. Mantener las láminas montadas en posición horizontal por uno o dos días.
7. En caso se requiera almacenar las muestras, colocarlas en cajas diseñadas para este propósito, bajo refrigeración a 4°C (Fig. 14D).

Observación

8. La observación de un citoplasma coloreado uniformemente es indicativo de un polen viable o fértil, mientras que un citoplasma no coloreado, granular y/o retraído indica un polen no viable o estéril.
9. En el caso de la tinción con gelatina de acetocarmín glicerol, un grano de polen será viable cuando presente un citoplasma límpido y de color rojo intenso, e inviable cuando los granos presenten un citoplasma rosado y/o estén deformes (Fig.15 ByD).
10. En el caso de la tinción con X-Gal, el grano de polen se considera viable si muestra un citoplasma uniformemente coloreado de azul, e inviable cuando los granos presentan un citoplasma celeste y/o constreñido (Fig. 15 A y C).

Fig. 15.

A y B) Polen viable,
C y D) Polen no viable.
Tinción con X-Gal y gelatina
de acetocarmín glicerol,
respectivamente.
Aumento 400X. Barra 10µm.



Utilizando la tinción con gelatina de acetocarmín glicerol, se considera fértil aquella muestra que presenta de moderada a alta viabilidad de polen (Fig.16 C y D). La observación de anomalías como tétradas o granos de polen con cuatro núcleos indica que la muestra de polen es infértil (Fig. 16A).

En muestras de polen de papas diploides, también podrá observarse granos de polen con carga genética no reducida ($2n$) los cuales presentan un tamaño 1.2 veces mayor al de un grano normal (n) (Fig. 17).

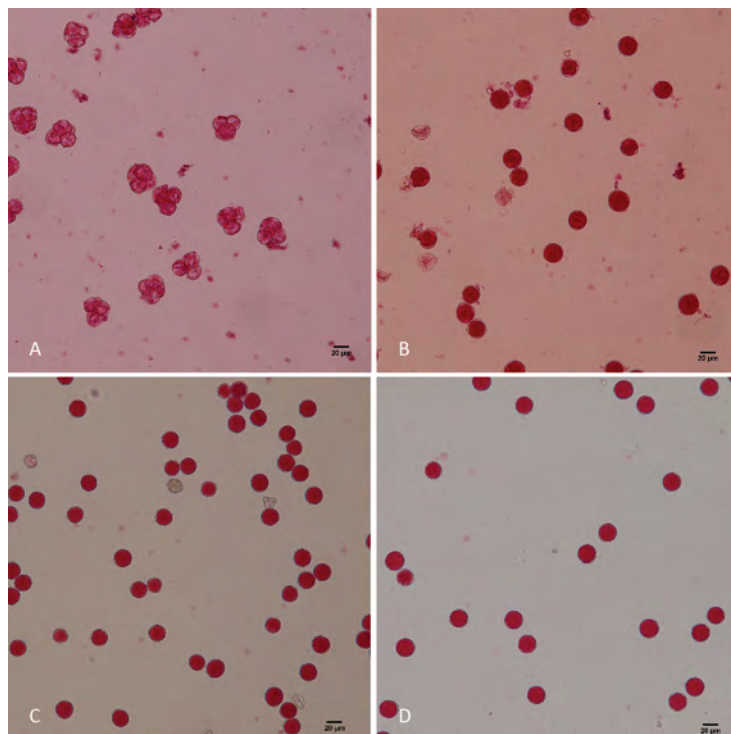


Fig. 16. Diferentes grados de viabilidad de polen, tinción con Acetocarmín Glicerol.

A) Tétradas estériles (HER-3.1)

B) Baja viabilidad (HER-50.84)

C) Moderada viabilidad
(HER-56.13)

D) Alta viabilidad (HER-44.8).

Aumento 200X. Barra 10 µm.

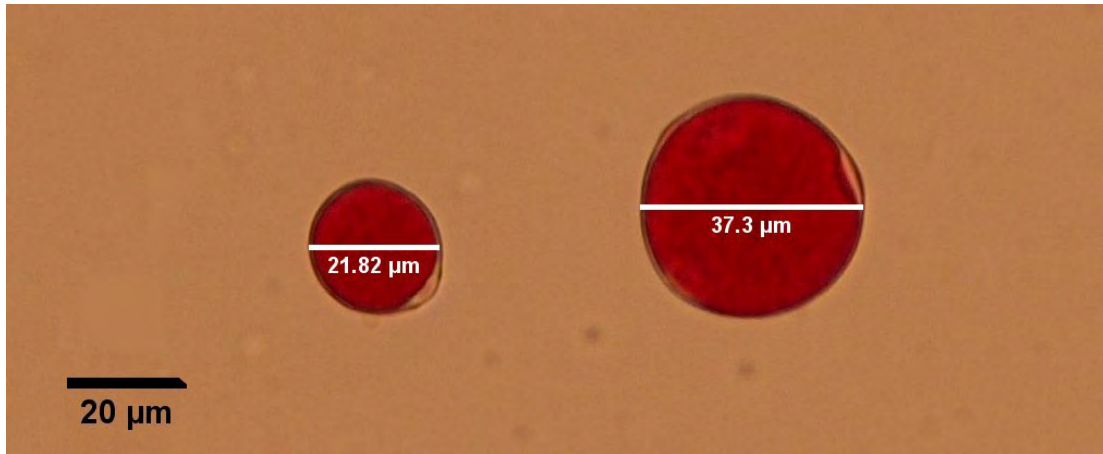


Fig. 17. Muestra de polen de genotipo diploide (BSLI-7.95), se observa polen n y $2n$. (21.82 μm y 37.3 μm , respectivamente). Aumento 200X, Barra 20 μm .

3.2. Prueba de germinación de polen *in vitro*

La determinación de la germinación del polen *in vitro* posibilita hacer estimaciones confiables de la fertilidad, que se define por el crecimiento del tubo polínico en un medio adecuado (Van Marrewijk, 1993). Es un método confiable debido a que los métodos de tinción tienden a sobreestimar la viabilidad. Así, la germinación o cultivo de polen *in vitro*, simula el desarrollo del tubo polínico en los tejidos estilares, ya que el medio de cultivo utilizado semeja en su composición al mucílago del estigma.

El medio de cultivo utilizado para la germinación y crecimiento del tubo polínico, contiene sucrosa, ácido bórico (H_3BO_4) y polisorbato 20 (Tween 20) (Anexo 1j).

Otros autores recomiendan modificaciones en el medio de cultivo. Así, Mortenson *et al.* (1964) proponen una solución de 20% de sucrosa y 50 ppm de ácido bórico como el medio más adecuado para la germinación *in vitro* de polen en *Solanum*. Bamberg & Hanneman (1991) consideran que el medio de 20% de lactosa y 50 ppm de ácido bórico es superior al medio que contiene sucrosa. Trognitz (1991) encuentra una respuesta altamente variable para este mismo medio.

Por otro lado, González *et al.* (2002) utilizan un medio compuesto por 12% de sacarosa, 300 ppm de nitrato de calcio (CaNO_3), 200 ppm de sulfato de magnesio (MgSO_4), 100 ppm de nitrato de potasio (KNO_3) y 100 ppm de ácido bórico en solución con pH de 6.

Procedimiento

Germinación del polen

1. Preparar una cámara húmeda colocando un papel filtro humedecido con agua destilada en la base de la placa de Petri de 5.5 cm de diámetro.
2. Colocar 4 gotas del medio de cultivo sobre el interior de la tapa de la placa de Petri, distribuyéndolas en los vértices de un cuadrado imaginario (Fig. 18A).
3. Con la punta de un palillo moadientes de madera adicionar pequeñas cantidades de polen de una misma muestra sobre cada gota, esparciéndolo con ligeros movimientos circulares (Fig. 18B).
4. Cubrir la placa de Petri con la contratapa y dejar a una temperatura de 20 a 24°C hasta el día siguiente.

Observación

5. Colocar una gota de solución de yodo-yoduro de potasio (I-KI) (Anexo 1e) sobre la muestra de polen.
6. Cubrir con una lámina cubreobjetos de 22 × 40 mm, procediéndose a la observación bajo un microscopio óptico a un aumento de 60X o 100X.
7. Se considera que un grano de polen ha germinado exitosamente cuando el desarrollo del tubo polínico alcanza un tamaño igual o mayor al diámetro del grano de polen (Fig. 19).

El conteo de granos de polen germinados y no germinados debe realizarse en un mínimo de 10 campos, expresándose los resultados como el porcentaje con respecto al número total de granos de polen por campo. Un porcentaje promedio de 80 por ciento indicará un polen fértil.

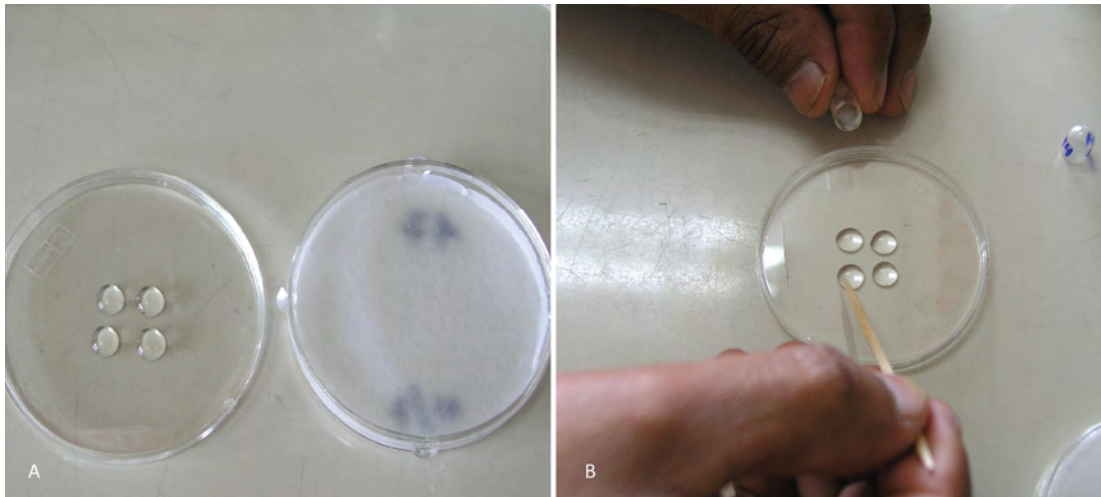


Fig. 18. A) Colocar medio de cultivo en la placa de Petri. B) Adicionar el polen en el medio de cultivo utilizando un palillo.

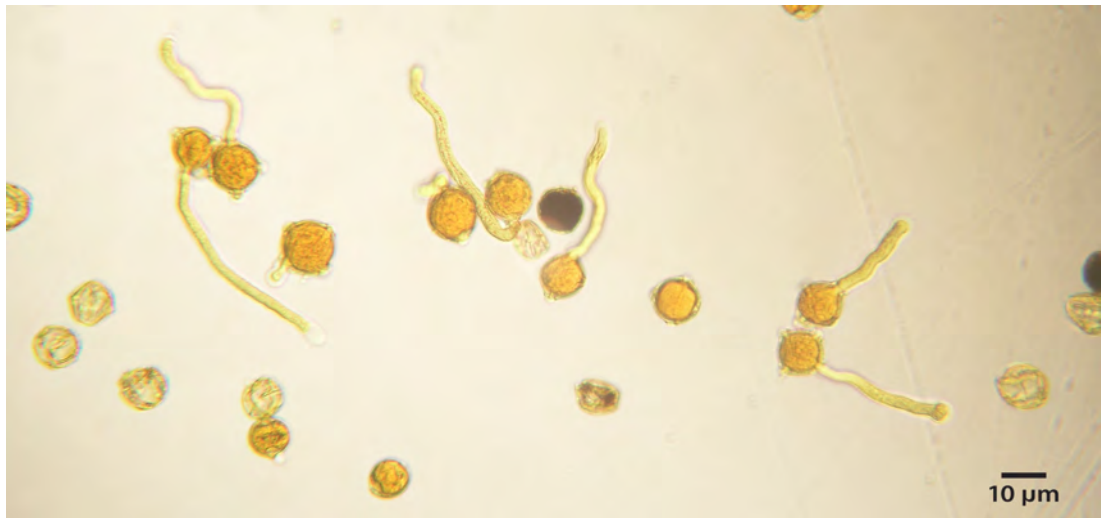


Fig. 19. Germinación de granos de polen en medio de cultivo. Aumento 400X. Barra 10 μm .

3.3 Prueba de crecimiento del tubo polínico *in vivo*

El periodo comprendido entre la polinización y la fecundación engloba un intenso proceso de interacción entre los tubos polínicos y el pistilo. Cabe recordar que el éxito de la reproducción sexual depende de la interacción específica y exitosa entre polen y pistilo.

El análisis del crecimiento del tubo polínico muestra las diferencias existentes en cruzamientos compatibles, parciales o completamente incompatibles.

La determinación de la autoincompatibilidad y la caracterización de la incompatibilidad interespecífica se realizan mediante la observación del crecimiento del tubo polínico en el pistilo (Fig. 20).

El crecimiento de los tubos polínicos puede verse afectado por las condiciones ambientales, lo que puede enmascarar los resultados de incompatibilidad.

Los tubos polínicos, una vez originados por el grano de polen, van creciendo a lo largo del pistilo y hacia la base del estilo, dejando depósitos de calosa para aislar el extremo del tubo en crecimiento de la parte más vieja. Aquellos tubos polínicos que detienen su crecimiento pueden dejar un depósito de calosa en el extremo del tubo.

Otra manifestación de incompatibilidad, adicional a las ya conocidas, es la producción de anomalías morfológicas, tales como arrugamiento de los tubos polínicos o explosión con liberación del contenido de éstos. Las anomalías incluyen placas de calosa, formas espiraladas, etc.

El método de tinción por fluorescencia se basa en la absorción selectiva del azul de anilina (componente de la solución de Schreiter) por la calosa depositada a lo largo de la pared del tubo polínico, identificándose por la presencia de calosa en puntos discontinuos (Aronne *et al.*, 2001).

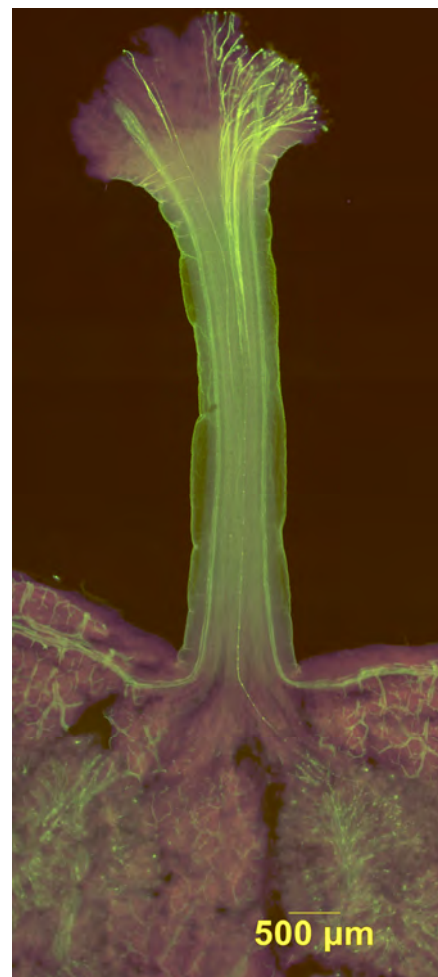


Fig. 20. Desarrollo del tubo polínico en el cruzamiento interespecífico de *S. stenotomum* × *S. chiquidenum*. 48 HDP. Barra 500 um.

Toma de la muestra

Colectar 3 a 5 pistilos por tipo de cruzamiento, 48 horas después de realizada la polinización (H.A.P). Deben ser cortados cuidadosamente desde la base con una hoja de bisturí.

Procedimiento

Fijación

1. Sumergir inmediatamente los pistilos colectados en un tubo Eppendorf conteniendo la solución de Schreiter (Anexo 1k y1l).
2. Almacenar las muestras a 4°C hasta su preparación.

Las muestras pueden permanecer almacenadas en esa condición hasta un máximo de 9 meses.

Preparación

3. Colocar en baño maría a 55°C los tubos Eppendorf conteniendo los pistilos, hasta que el tejido de estos se muestre lo suficientemente claro y suave (Fig. 21 A). En promedio, dejarlos 30 min., sin embargo el tiempo dependerá de la consistencia del tejido, variando entre los genotipos.

Los pistilos tienden a flotar, por lo que se recomienda agitar suavemente cada vial de 3 a 5 segundos, a fin de que se mantengan sumergidos la mayor cantidad de tiempo posible.

Observación

4. Sobre una lámina portaobjeto añadir una gota de solución acuosa de glicerol y agua destilada en una proporción 1 a 1. Extender los pistilos en la gota de solución, cubrir con una lámina cubreobjetos y aplastar suavemente (Fig. 21 B).
5. Evaluar el crecimiento del tubo polínico bajo un microscopio de fluorescencia con una lámpara HBO 200 UV como fuente de luz, un filtro de excitación (BG 12), un filtro de barrera (UG 1) y un filtro de protección (Y-455), a un aumento de 60X.

El crecimiento del tubo polínico se evalúa usando una escala o matriz combinada de 18 niveles cualitativos (nivel al que llegan los tubos polínicos) y cuantitativos (cantidad de tubos polínicos) (Trognitz, 1991)(Fig.22). Muchos investigadores evalúan la longitud del tubo polínico utilizando programas de libre acceso que permiten realizar mediciones, como el programa Image J (Fig. 23).

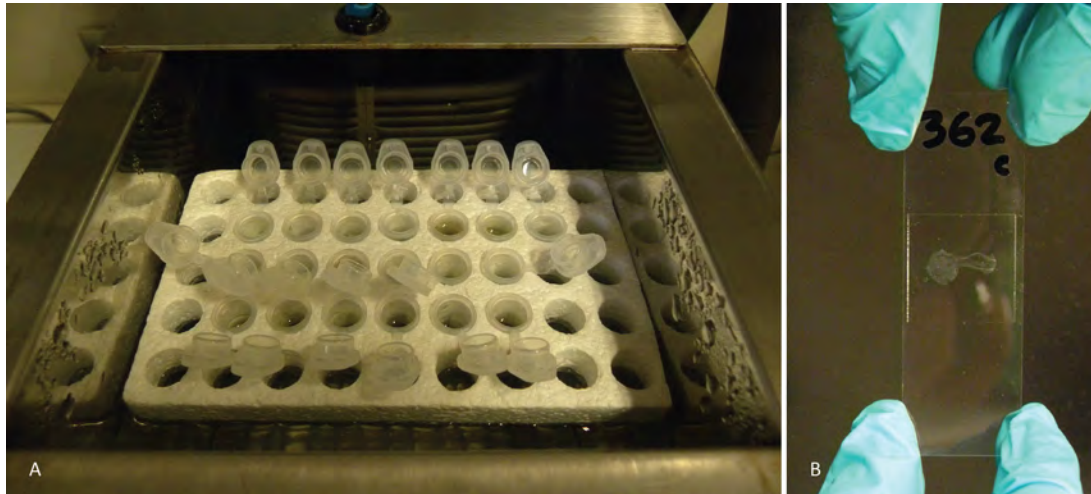


Fig. 21. A) Hervir los pistilos en baño maría por 30 min. B) Lámina lista para observación.

Niveles*		Cantidad (número total de tubos polínicos en el estilo-ovario)		
		>30	10-30	<10
↓		Valor combinado del nivel y cantidad de polen		
No germinado	6	16	17	18
Estigma	5	13	14	15
Estilo-estigma	4	10	11	12
Estilo	3	7	8	9
Estilo (final)	2	4	5	6
Placenta	1	1	2	3

Fig. 22. Matriz de valores para evaluación cualitativa y cuantitativa. Niveles de longitud del tubo polínico: 6_polen no germina; 5_estigma; 4_estilo-estigma; 3_estilo; 2_final del estilo; 1_placenta. FUENTE: Trognitz., 1991.

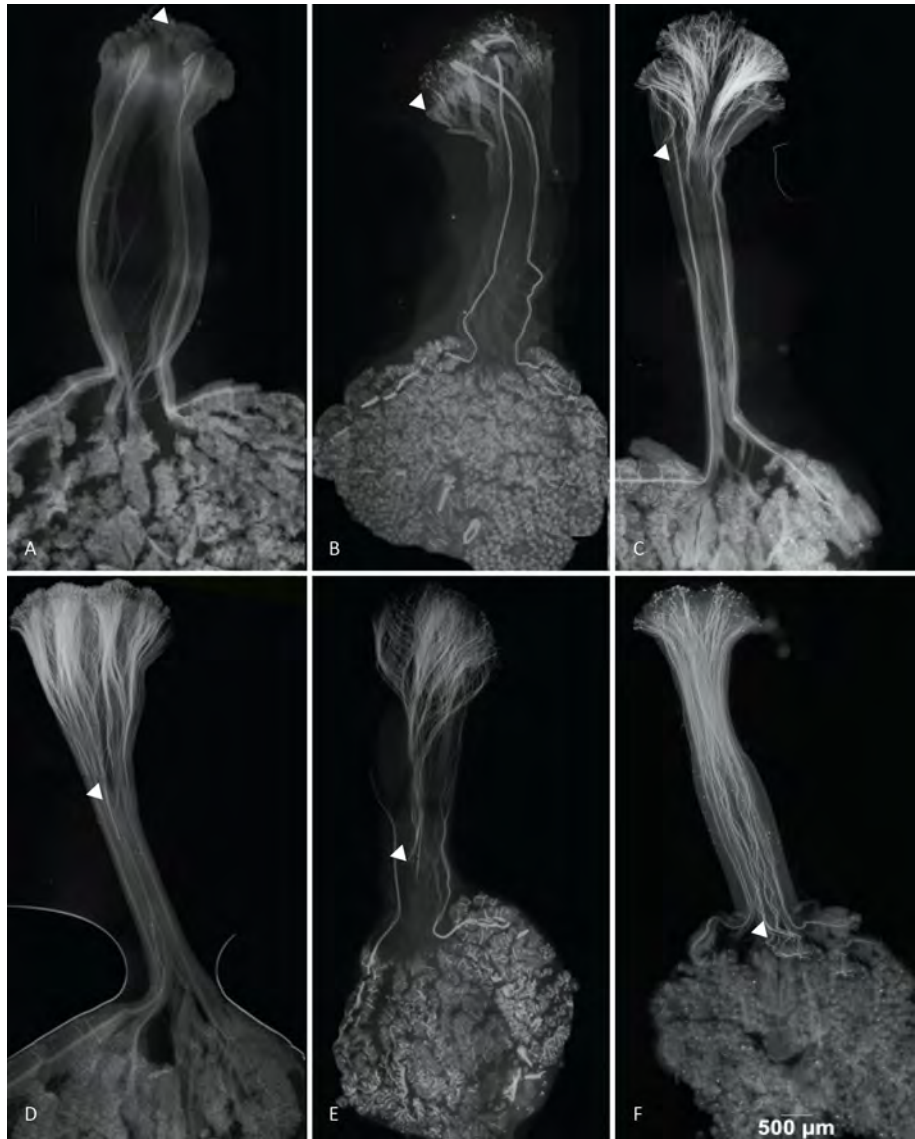


Fig. 23. Niveles de longitud del tubo polínico 48 HDP: A) 6_polen no germina, B) 5_estigma; C) 4_estilo-estigma; D) 3_estilo; E) 2_final del estilo; F) 1_placenta. Aumento 200X. Barra 500µm.

Otro Procedimiento basado en Covey *et al.*, 2010

Fijación

1. Colocar los pistilos en tubos Eppendorf conteniendo la solución de Farmer (Anexo 1c).
2. Almacenar las muestras a 4°C durante toda la noche.

Preparación

3. Descartar la solución de Farmer con ayuda de una pipeta, enjuagar dos veces con agua destilada para remover el fijador.
4. Sumergir los pistilos en una solución de 0.5 mL de NaOH 8N por 24 horas.


Tinción

5. Remover la solución de NaOH con ayuda de una pipeta (cuidadosamente, para no dañar los pistilos) y lavar delicadamente de 3 a 5 veces con agua destilada.
6. Después de retirar el agua destilada del último lavado, se le debe reemplazar con la solución de tinción (*Anexo 1q*).
7. Una vez adicionada la solución de tinción a los tubos, se colocan en oscuridad al menos por 24 horas.



Montaje

8. Después de la incubación con la solución de tinción, se remueven los pistilos y sobre una lámina portaobjeto se añade una gota de solución acuosa de glicerol y agua destilada en una proporción 1 a 1. Extender los pistilos en la gota de solución, cubrir con una lámina cubreobjetos y aplastar suavemente.
9. La solución de tinción contiene una sustancia fluorescente que permite la observación de los puntos de calosa presentes en los tubos polínicos. El azul de anilina de la solución los colorea a fin de que sean detectados con luz ultravioleta (Dionne y Spicer, 1958).

3.3.1 Medición del crecimiento del tubo polínico utilizando el programa Image J

- 1) Abrir el archivo con la imagen utilizando el programa Image J.
- 2) Primero se debe establecer la escala, para lo cual:
 - a. En la barra de herramientas del programa, hacer click derecho en el botón que muestra una línea recta diagonal ().
 - b. Trazar la barra de escala o “**Bar scale**”.
 - c. Ir al botón “**Analyze**” y luego al botón “**Set scale**”.

Escribir una distancia conocida (por ejemplo, si la barra de escala que va a utilizar representa 100 μm , colocar la distancia conocida en micrómetros en la unidad de longitud).

Teclear el botón “**Global**”. Esto mantendrá la escala de barra durante el tiempo que el programa Image J se encuentre abierto.
- 3) Luego, regresar a la barra de herramientas del programa y hacer clic derecho en el botón que muestra una línea recta diagonal (). Ahora se tiene que establecer el ajuste con el botón “**freehand**” ().
- 4) Trazar el tubo polínico desde el borde del grano de polen hasta el final del tubo polínico.
“**Comando + M**” mide la longitud del tubo de polen.
- 5) Existen dos formas de medir la longitud del tubo polínico: por medio de la combinación de botones del teclado “**Ctrl + M**”, o yendo a la barra de herramientas del programa y seleccionar “**Analyze**”.
- 6) Las medidas que se realicen se mostrarán en una ventana emergente denominada “**Results**”.
- 7) Después de medir 10 tubos polínicos por cada una de las 3 repeticiones, realizar el respectivo análisis.

3.3.2 Ensamblaje de imágenes de pistilos usando el programa PanaVue Image Assembler 3

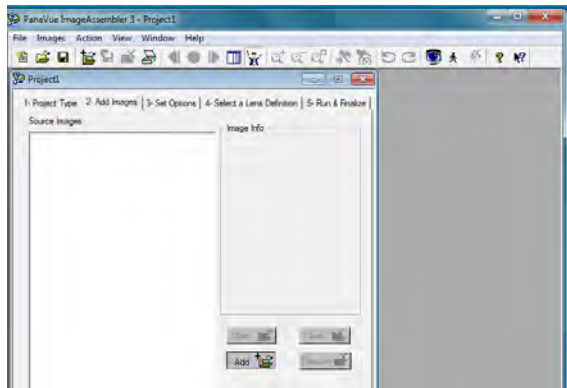
PanaVue Image Assembler es un programa para ensamblar imágenes de microscopía. Puede ser descargado del siguiente vínculo <http://www.panavue.com/en/downloads/index.htm>

Procedimiento

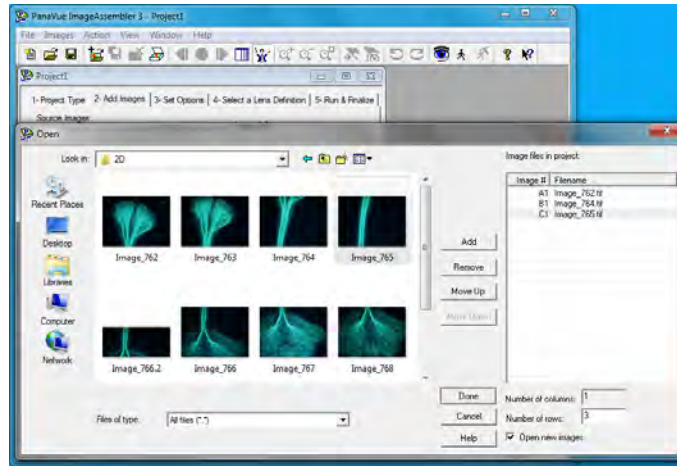
1. Abrir el programa y crear un nuevo proyecto con la opción “Mosaic Stitching”



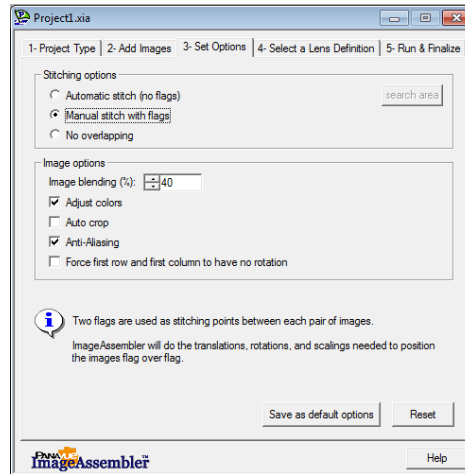
2. Seleccionar “Add image” y dar click en el botón “Add”



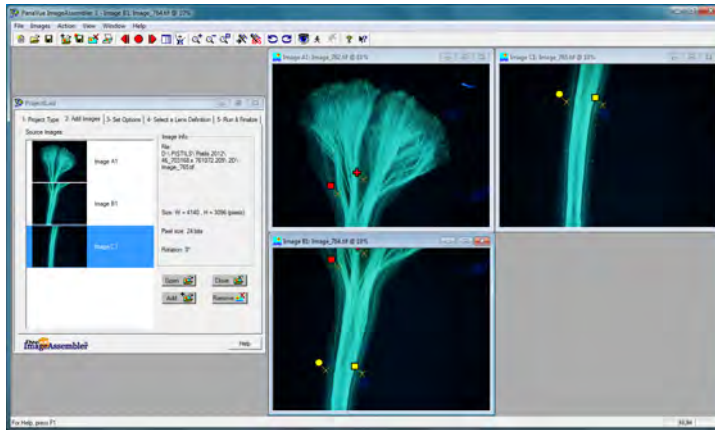
3. Adicionar las imágenes que se desea ensamblar en orden, de arriba hacia abajo, o de izquierda a derecha. En el caso de fotografías de pistilo, del estigma hasta la base del pistilo. La primera imagen que se agrega aparecerá ubicada arriba a la izquierda, y la última abajo a la derecha. Escribir el número de columnas que se desea ensamblar.



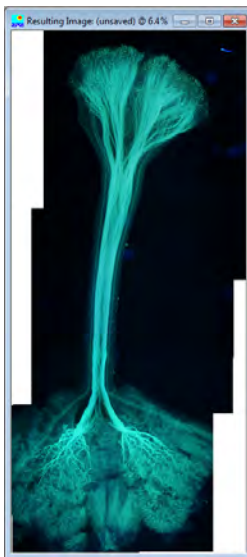
4. En la opción “Set Options” colocar las siguientes características.



5. Dar clic y arrastrar las flechas con ayuda del cursor. Colocarlas en zonas comunes para todas las imágenes y dejar partes superpuestas en las imágenes consecutivas, a fin de que el ensamblaje mantenga ese orden.



6. Clic en el botón “Full run” para iniciar el ensamblaje. Puede demorar algunos segundos hasta que aparezca la imagen final.



4. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros

La técnica de cultivo *in vitro* de embriones ha resultado muy útil en la obtención de híbridos interespecíficos e intergenéricos, al permitir que los embriones que no desarrollan normalmente o degeneran debido a su condición de inmaduros, lleguen a progresar hasta formar una plántula si son colocados en un medio adecuado, superando con éxito la falta de viabilidad de las semillas procedentes de cruzamientos difíciles (Brown & Thorpe, 1995).

El éxito del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros está influenciado por la composición química del medio de crecimiento, el cual debe ser capaz de inducir el desarrollo exitoso de embriones híbridos, estableciéndose de acuerdo a los principales requerimientos nutricionales de la especie (Pellegrineschi et al., 1997).



Fig 24. Procedimiento de rescate de embriones. (Ordóñez B., 2008)

Procedimiento

Dependiendo del tipo de cruzamiento, se puede colectar las bayas entre 19 a 27 días después de la polinización (D.A.P por sus siglas en inglés).

Preparación de las bayas

1. Colocar las bayas colectadas por aproximadamente 10 min. en una solución que contenga los acaricidas Azociclotin (Peropal 50 SC) e Imidacloprid (Confidor 35 SC) al 1%, adicionándole 6 gotas de Tween 20.
2. Desinfectar con etanol al 70% por 30 seg.
3. Lavar dos veces con agua destilada.
4. Esterilizar superficialmente las bayas con una solución de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 2.5% por 10 min.
5. Enjuagar las bayas con agua destilada estéril, dentro de una cámara de flujo laminar.

Rescate y cultivo de los embriones

6. Abrir las bayas a lo largo del eje longitudinal, usando un escalpelo y una hoja de bisturí N°11 (la operación se realiza dentro de una cámara de flujo laminar con ayuda de un estereoscopio bajo condiciones de asepsia).
7. Separar cuidadosamente los embriones inmaduros de la cubierta de la semilla y sembrarlos directamente en placas de Petri de 9 × 50 mm conteniendo el medio de cultivo (Anexo 1m). (Fig. 24).
8. Colocar las placas de Petri con los embriones inmaduros en una cámara de crecimiento (temperatura: 18-22°C, fotoperiodo: 16 horas, intensidad lumínica: 3000 lux) hasta la germinación (Ordoñez, 2008).
9. Una vez desarrollada la plántula, proceder al trasplante en tubos conteniendo el medio de propagación (Anexo 1n).

Anexo 1. Preparación de reactivos y soluciones

a. Solución de 8-hidroxiquinoleína.

Pesar 0.29 g de 8-hidroxiquinoleína y disolverlos en 25 mL de algún solvente (generalmente etanol). Agregar agua destilada deslizándola muy lentamente por una vara de vidrio, evitando la precipitación de la solución, hasta completar 1 L. Almacenar esta solución de 8-hidroxiquinoleína 0.002M en un frasco color oscuro o ámbar a temperatura ambiente.

b. Solución de Colchicina 0.05-0.5 % w/v.

Disolver 0.05 a 0.5 g (según concentración requerida) de colchicina en 100 mL agua destilada.

c. Solución de Farmer.

Mezclar tres partes de etanol al 96% y una parte de ácido acético glacial (CH_3COOH).

Nota importante: La solución debe ser preparada y usada como máximo media hora después de su preparación, ya que con el tiempo el ácido se reducirá y disminuirá el potencial de fijación de la solución.

d. Solución de lacto-propiónico orceína.

Para preparar 100 mL de una solución de lacto-propiónico orceína, disolver 1 g de orceína en una mezcla de 23 mL de ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) y 23 mL de ácido propiónico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$) a temperatura ambiente, completando a 100 mL con agua destilada. Agitar bien y filtrar.

e. Solución de yodo-yoduro de potasio.

Disolver 1 g de yodo (I_2) y 1 g de yoduro de potasio (KI) en 100 mL de etanol al 70%. Almacenar en un frasco de color oscuro a temperatura ambiente.

f. Solución modificada de Carnoy.

Mezclar etanol absoluto y la solución saturada de acetato férrico en ácido propiónico en una proporción de tres a uno.

Solución saturada de acetato férrico: Agregar 10 g de acetato férrico a 100 mL de ácido propiónico puro. Mezclar bien la solución y decantar cuidadosamente, evitando que el precipitado pase a la solución final.

g. Solución de carmín propiónico.

Calentar una solución de ácido propiónico ($C_3H_6O_2$) al 45% hasta punto de ebullición, agregar 1 g de carmín, dejar hervir, filtrar, agregar 5 gotas de solución saturada de acetato férrico.

h. Solución de gelatina de acetocarmín glicerol al 2%.

Dentro de una campana extractora y bajo constante agitación, calentar una solución de ácido acético al 45% hasta llegar a ebullición, agregar 2 g de carmín y esperar hasta que esté completamente disuelto y queden aproximadamente 60 mL, dejar enfriar, filtrar y agregar un volumen igual de glicerina a la solución (Marks, 1954). Almacenar a 4°C.

i. Solución de X-Gal.

Disolver 1 mg de x-Gal en 50 μ L de N, N'-dimetilformamida y 1 mL del buffer acetato (50 mmol, pH 4.8).

j. Medio de cultivo utilizado para la germinación y crecimiento del tubo polínico.

En un vaso de precipitados agregar 5 mL de una solución stock de ácido bórico a 200 ppm, 20 g de sucrosa y 0.2 mL de polisorbato 20, conocido comercialmente como Tween 20. Disolver y homogeneizar en 100 mL de agua destilada. El pH del medio se ajusta a 5.5.

k. Solución acuosa de azul de anilina (2%).

Disolver 2 g de azul de anilina en 100 mL de agua destilada, hervir la solución y filtrarla.

l. Solución de fijación de Schreiter.

A 100 mL de una solución de azul de anilina, agregar 700 mL de una solución acuosa 0.2N fosfato de potasio tribásico (K_3PO_4), 200 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y 200 mL de Tween 20. Almacenar la solución de Schreiter en un frasco oscuro o ámbar, bajo refrigeración a 4°C (Schreiter & Tiemann, 1977). La solución puede reutilizarse aproximadamente por 10 ciclos. Si se torna turbia debe filtrarse nuevamente.

m. Medio de cultivo de pro embriones modificado de Singsit y Hanneman (1991).

A 4.6 g/L del medio basal Murashige y Skoog (Sigma), agregar 4% de sucrosa, 100 mg/L de mio-inositol, 0.001 mg/L de adenina, 2 mg/L de glicina, 1 g/L de caseína hidrolizada, 0.1 mg/L tiamina-HCl, 1 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina-HCl, 100 mg/L de ácido málico y 0.7 % de agar y 1 g/L de carbón activado. El pH del medio se ajusta a pH 5.6 y se coloca en el autoclave a 120°C por 20 min. Después se le agregan 0.1 mg/L de ácido 3-indol-acético y 0.001 mg/L de kinetina por filtración. Se homogeniza y se dispensa en placas de Petri.

n. Medio de propagación de embriones.

A 4.6 g/L del medio basal Murashige y Skoog (Sigma), agregar 25 g/L de sucrosa, 2.9 g/L de phytigel (substituto del agar) y 5 mL del stock de vitaminas (0.025 g de ácido giberélico, 0.5 g de glicina y 0.125 g de ácido nicotínico), a un pH de 5.6.

o. Solución de HCl 1N.

Diluir 82.8 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado en 1 L de agua destilada.

p. Solución de NaOH 1N.

Disolver 4 g de los gránulos de hidróxido de sodio (NaOH) en 100 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados.

q. Solución de tinción con azul de anilina

Disolver 1.42 g de de una solución acuosa 0.1N fosfato de potasio tribásico (K_3PO_4) en 200 mL de agua destilada. Agregar 0.2 g de azul de anilina y mezclar. Almacenar en un frasco oscuro o ámbar a 4°C (Covey et al., 2010).

Referencias bibliográficas

- **Aronne, G., Cavuoto, D. and P. Eduardo. 2001.** Classification and counting of fluorescent pollen using an image analysis system. *Biotechnol. Histochem.* 76: 35-40.
- **Bamberg, J.B. and R.E. Hanneman Jr. 1991.** An effective method for culturing pollen tubes of potato. *Amer. Pot. J.* 68:373-379.
- **Barba-González, B., Lim, K.B., Ramanna, M.S., Visser, R.G.F. and J.M. Van Tuyl. 2005.** Occurrence of 2n gametes in the F1 hybrids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*): Relevance to intergenomic recombination and backcrossing. *Euphytica* 143:67-73.
- **Bennett, M.D. and I.J. Leitch. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Ann. Bot. (Oxford)* 107(3): 467-590.
- **Bretagnolle, F. and J.D. Thompson. 1995.** Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129:1-22.
- **Brown, D.C.W. and T.A. Thorpe. 1995.** Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:409-415.
- **Camadro, E.L. 1986.** Los gametos 2n en el origen y la evolución de las angiospermas poliploides. *Mendeliana* 7:85-100.
- **Chen, Q. and H.Y. Li. 2005.** An improved technique for high resolution mitotic chromosome studies in *Solanum*. *HortScience* 40:54-56.
- **Covey, P. A., Kondo, K., Welch, L., Frank, E., Sianta, S., Kumar, A., Nuñez, R., et al. 2010.** Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *Plant Journal* 64: 367–378.
- **Dewitte, A., Van Laere, K. and J. Van Huylenbroeck. 2012.** Use of 2n gametes in Plant Breeding. In: Abdurakhmonov, I.Y. (Ed.) *Plant Breeding*. 59-86.
- **Dionne, L. and P.B. Spicer. 1958.** Staining germinating pollen and pollen tubes. *Stain Technology* 33:15-17.
- **González, M.E., Estévez, A., Castillo, J., Salomón, J., Moré, O., y M. Hernández. 2002.** La calidad del polen: requisito indispensable del mejoramiento tradicional de la papa en Cuba. *Revista Latinoamericana de la Papa.* 13:75-94.

- **Gutierrez, L.L y V. Moreno Ferrero. 2005.** Análisis de ploidía por citometría de flujo de callos embriogénicos de Aliso Andino (*Alnus acuminata* H.B.K.). Scientia et Technica. XI (28):205–209.
- **Hermesen, J.G.T. 1971.** Tetraploids from colchicine-induced octaploid *Solanum acaule subsp. aemulans*. Euphytica 20:490–492.
- **Huamán, Z. 1995.** Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de Investigación CIP 10. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 18p.
- **Klein, M. 1990.** C-Mitotic action of the insecticide Ambush 25 EC in *Allium cepa* L. Genetica Polonica 31:107-113.
- **Marks, G.E. 1954.** An aceto-carminic glycerol jelly for use in pollen fertility counts. Stain Technol. 29:277.
- **Mortenson, L.R., Peloquin, S.J., and R.W. Hougas. 1964.** Germination of *Solanum* pollen on artificial media. Am. Pot. J. 41:322-328.
- **Ochatt, S.J., Patat-Ochatt, E.M. and A. Moessner. 2011.** Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. Plant Cell Tissue Organ Cult. 104: 329-341.
- **Ordoñez, B. 2008.** Cultivo *in vitro* de embriones de *Solanum spp.* para selección de híbridos resistentes a *Phytophthora infestans*. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Federico Villareal, Lima, Perú. 122p.
- **Pellegrineschi, A., Fatokun, C.A., Thottappilly, G., and A. Adepoju. 1997.** Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. Plant Cell Rep. 17:133–138.
- **Ramanna, M.S. and E. Jacobsen. 2003.** Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – a review. Euphytica 133: 3- 18.
- **Schreiter, J. and H. Tiemann. 1977.** Testing the pollen tube growth *in vivo* in dihaploids of *Solanum tuberosum* L. Arch. Züchtungsforschung 7:253-258.
- **Singh, R.J. 1993.** Plant cytogenetics. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- **Singsit, C. and R.E. Hanneman. 1991.** Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. Plant Cell Rep. 9:475-478.
- **Talledo, D., Escobar, C. and V. Alleman. 1993.** Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima, Universidad Ricardo Palma. 141 p.
- **Tjio, J. H. and A. Levan. 1950.** The use of oxyquinoline in chromosome analysis. Ann. Estac. Exp. Aula Dei. 2:21- 64.

- **Trognitz, B. 1991.** Comparison of pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica* 56:143-148.
- **Van Marrewijk, G. A. 1993.** Flowering biology and hybrid varieties. Hybrid varieties- In: International Course on Applied Plant Breeding. The Netherlands. IAC. 80 p., 66(1):61-71.
- **Veilleux, R. 1985.** Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Rev.* 3:253–288.
- **Watanabe, K.N. and M. Orrillo. 1993.** An alternative pretreatment method for mitotic chromosome observation in potatoes. *Am. Potato J.* 70: 543-548.

Glosario

ADN (ácido desoxirribonucleico): Molécula portadora de información genética, que posibilita su transmisión de una generación a la siguiente.

Alternancia de generaciones: Ciclo vital en el cual a un estadio diploide le sigue uno haploide y así sucesivamente. El gametofito (n) produce por mitosis gametos (n), la fusión de los gametos masculino y femenino produce cigotos ($2n$). Cada cigoto origina un esporofito ($2n$) que por meiosis origina esporas haploides(n). Cada espora haploide forma un gametofito, cerrando así el círculo.

Androceo: Órgano reproductivo masculino de una flor.

ARN (ácido ribonucleico): Molécula que dirige las etapas intermedias de las síntesis de proteínas.

Autotetraploide: Un tetraploide formado por el doblaje de un solo genoma. En un autotetraploide todos los cromosomas vienen de la misma especie.

Calosa: Polímero de glucosa (enlace 1-3, B-D glucopiranosas) que se deposita como una delgada película a lo largo de la pared del tubo polínico.

Carpelo: Estructuras femeninas de la flor, comprende el ovario, el estilo y el estigma. Colectivamente a los carpelos se les denomina gineceo.

Célula madre de la microspora: Célula que por meiosis produce microsporas o granos de polen.

Células germinales: Células de los órganos reproductivos de los organismos multicelulares, que se dividen por meiosis para producir gametos.

Centrómero: Región en el cromosoma donde se unen las fibras del huso acromático durante la división celular. En esta región se unen las dos cromátidas del cromosoma.

Cigoto: Estructura resultante de la fecundación, óvulo fecundado. Célula diploide ($2n$) resultante de la fusión de un gameto masculino con uno femenino.

Citocinesis: División del citoplasma.

Cromátida: Una de las unidades longitudinales de un cromosoma duplicado.

Cromatina: Sustancia que forma un cromosoma, consiste en la combinación de ADN con proteínas.

Cromosoma: Estructura física, formada por ADN y proteínas; los cromosomas sólo son visibles en la división celular.

Cromosomas homólogos: Par de cromosomas de similares características y funciones, uno aportado por la madre y otro por el padre; se aparean durante la meiosis.

D.A.P: Días después de la polinización (siglas en inglés).

Diploide: Especie o individuo que posee en sus células somáticas dos juegos de cromosomas.

Doble fecundación: Proceso en que la célula huevo y un núcleo espermático forman al cigoto ($2n$), y los dos núcleos polares (en el centro del saco embrionario) y un núcleo espermático forman al endospermo ($3n$).

Endospermo: Tejido de reserva (en las angiospermas) que provee nutrientes al embrión en desarrollo.

Entrecruzamiento o “crossing over”: Proceso por el cual los cromosomas homólogos intercambian segmentos genéticos. Tiene como resultado una combinación nueva de material genético en el gameto.

Esporofito: Generación ($2n$) que por meiosis produce esporas.

Estambre: Estructura masculina de la flor que produce polen, está formada por un filamento que sostiene a la antera productora de polen.

Estigma: En las flores, es la región del carpelo que recibe los granos de polen que germinan sobre ella. Secreta una sustancia húmeda y pegajosa para fijar los granos de polen.

Estilo: Parte del carpelo de la flor formado a partir de la pared del ovario. La punta del estilo lleva al estigma. Parte del pistilo que separa el estigma del ovario.

Fenotipo: Expresión del genotipo en un determinado ambiente.

Fibras del huso acromático: Grupo de microtúbulos que se extiende desde los centrómeros de los cromosomas a los polos del huso, o de polo a polo, en una célula en división.

Gametofito: En las plantas que presentan alternancia de generaciones, el estadio haploide (n) que produce por mitosis gametos femeninos o masculinos (n) que tras la fecundación darán lugar al esporofito.

Gametogénesis: Proceso meiótico mediante el cual se forman los gametos o células sexuales.

Gametos: Células sexuales resultados de la meiosis.

Gen: Unidad fundamental de la herencia. Contiene la información genética que determina una o varias características de un organismo. Secuencia de bases de ADN que usualmente codifican para una secuencia polipeptídica de aminoácidos.

Genoma: Es la totalidad de la información genética que posee un organismo en particular.

Genotipo: Constitución genética de una célula o individuo.

Gineceo: Término colectivo aplicado a todos los carpelos (o pistilos) de una planta.

H.A.P: Horas después de la polinización (siglas en inglés).

Haploide: Célula que contiene la mitad del material genético. Tiene una sola serie de cromosomas.

Hibridación interespecífica: Se refiere a cruces entre dos especies diferentes dentro del mismo género. Ejemplo: *Solanum phureja* × *Solanum chomatofilum*.

Hibridación intraespecífica: Se refiere a cruces entre subespecies dentro de la misma especie. Ejemplo: *L. culinaris ssp. culinaris* × *L. culinaris ssp. orientalis*.

Huso acromático: Estructura de filamentos proteicos, encargada de trasladar y sostener los cromosomas durante la mitosis.

Índice mitótico: Relación entre el número de células en mitosis y el número total de células observadas. Es una medida relativa y varía de acuerdo a cada zona horaria, la cual permite conocer la hora más apropiada para la colecta de raíces con un número mayor de células metafásicas.

Megasporas: Las cuatro células haploides producidas por meiosis en el óvulo de la flor. Generalmente tres degeneran y la célula remanente se convierte en un gameto (n): ovocélula.

Microsporangios: Estructura del esporofito que produce, por meiosis, las microsporas. En las plantas con flores se conocen como sacos polínicos de la antera.

Microsporas: Las cuatro células haploides producidas por división meiótica en los sacos de la antera de las flores; se dividen por mitosis y se rodean de una pared gruesa para formar los granos de polen.

Número básico o monoploide (x): Número de cromosomas diferentes que constituyen un juego cromosómico completo. Representa el mínimo de cromosomas de una serie poliploide.

Número gamético o haploide (n): Número de cromosomas que llevan los gametos y puede coincidir o no con el número básico, de acuerdo con el nivel de ploidía de la especie que se trate.

Número somático o diploide (2n): Número total de cromosomas en una célula somática.

Ovario: Parte inferior del gineceo que contiene los óvulos.

Placa celular: Placa que separa a las células vegetales dividiendo el citoplasma en la telofase.

Pétalos: Estructuras no reproductoras que forman la corola de la flor.

Ploidía: Número de grupos o juegos de cromosomas que posee un individuo.

Polen: En las plantas con semilla, el gametofito masculino rodeado por una cubierta protectora.

Poliploide: Especie o individuo que presenta más de dos juegos de cromosomas.

Poliploidía: Cambios en el número de cromosomas, originado por accidentes en la meiosis.

Receptáculo: Parte de la flor donde se insertan los verticilos.

Sépalos: Hojas modificadas que protegen a los pétalos de las flores y a las estructuras reproductivas.

Sinérgidas: Células en el saco embrionario de las angiospermas que flanquean la ovocélula. El tubo polínico crece a través de una de ellas (generalmente la más pequeña).

S locus: Locus de la autoincompatibilidad. Este consta de un solo locus polimórfico que controla la autoincompatibilidad en muchas especies.

Tubo polínico: Estructura originada en la célula vegetativa del grano de polen a través del cual el núcleo espermático viaja hasta llegar al óvulo.

Turgencia: Fenómeno por el cual las células se hinchan al absorber agua, ejerciendo presión contra las membranas celulares, las cuales se ponen tensas.

Valor C: Cantidad de ADN por genoma haploide (un solo juego cromosómico).

Variabilidad genética: Variación en el material genético en una población o especie, producto de mutaciones, recombinaciones, flujo génico, migración, selección natural o deriva genética.

Verticilo: Conjunto de piezas (hojas, sépalos, tépalos, etc.) que nacen en un mismo nudo.

