



Acta Científica Venezolana
ISSN 0001-5504 *versión impresa*

ACV v.53 n.3 Caracas jul. 2002



MICROSPOROGENESIS Y MICROGAMETOGENESIS DE ONOTO (Bixa orellana L.)

Claret Michelangeli, Ada Maureen Medina, Paola Artioli y Jonás Mata

Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA).Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela
Apartado Postal 4579, Maracay 2101, Venezuela.

Recibido:31/10/00;Revisado: 06/02/01; Aceptado:22/01/02

RESUMEN: Botones florales de diversos tamaños fueron individualmente estudiados para examinar los eventos citológicos ocurridos en onoto (Bixa orellana L.), genotipo Portuguesa. El material se fijó en Carnoy II a las 12:30 am, momento de mayor tasa de división meiótica. Se probaron tres soluciones de tinción, siendo la orceína acética al 1% la que presentó una mejor coloración y definición en la observación para el estudio de los núcleos de las células madre de las microsporas. Por el contrario, para la tinción de los cromosomas la mejor resolución se presentó con el colorante carmín propiónico 2%. Se presentaron células madre del grano de polen en metafase I con $n=8$ cromosomas, en botones florales cuya longitud oscilaba entre 0,5 y 0,6 cm; en estado de tétrada en botones entre 0,6 y 0,7 cm; microsporas en estado uninucleado en botones entre 0,7 y 0,8 cm y microsporas en estado binucleado en botones con longitudes mayores a 0,8 cm. Se incluyen microfotografías de la secuencia de formación de microsporas y granos de polen por división meiótica y posterior mitosis. **Palabras clave:** Bixa orellana, microgametogénesis, microsporogénesis.

MICROSPOROGENESIS AND MICROGAMETOGENESIS OF ANNATTO (Bixa orellana L.)

ABSTRACT: A series of Buds of increasing maturity were individually sampled in order to examine cytological events of annatto (Bixa orellana L.), genotype Portuguesa. They were fixed in Carnoy II at 12:30 am, time of the highest rate of meiotic division. Three stain solutions were attempted. In the microspores mother cells, the use of acetic orcein 1% resulted in a good nucleus coloration and sharpness. In contrast, a well chromosome resolution was achieved with the application of propionic carmin 2%. The pollen grain mother cells ($n=8$ chromosomes) at metaphase I were found in floral buds of 0,5 to 0,6 cm long; tetrad stage in buds of 0,6 to 0,7 cm long, uninucleate stage of microspores in buds of 0,7 to 0,8 cm long and the binucleate stage (pollen) in buds longer than 0,8 cm. Microphotographies showing the sequence of meiotic division (microsporogenesis) and subsequent mitosis to originate pollen grains were included. **Key Words:** Bixa orellana,

microgametogenesis, microsporogenesis.

INTRODUCCION

El onoto (*Bixa orellana* L.) es una especie originaria de la Cuenca Amazónica, perteneciente a la familia Bixaceae, la cual es monogénica^{9,12}. Es la única especie cultivada comercialmente, siendo actualmente explotada en las zonas tropicales y subtropicales de América, Asia, África y Oceanía¹. El colorante, presente en el arilo de la semilla, es principalmente utilizado en la elaboración de productos lácteos, así como en la preparación de enlatados y embutidos, ya que es insípido y no altera el sabor de los alimentos⁸. También se utiliza en la industria de cosméticos, por ser inofensivo para las aplicaciones en la piel, en raciones alimenticias de aves como fuente de vitamina A y en mejorar el color de los huevos en gallinas ponedoras^{4,7}. Su valor comercial se ha incrementado continuamente por representar una alternativa en la sustitución de tintes artificiales que han resultado tener propiedades cancerígenas, existiendo restricciones en su uso, tanto en la industria de alimentos como en la de cosméticos^{1,7,10}.

El onoto es una especie de alta polinización cruzada que presenta desuniformidad en el tiempo de cosecha, en los rendimientos y en la calidad del producto. Esto amerita la aplicación de técnicas de mejoramiento que permitan vencer estas dificultades, como es el caso del cultivo *in vitro* de anteras y/o microsporas. La respuesta del grano de polen en la formación de embriones depende del estado de desarrollo de la microspora. Por tanto, se requiere hacer estudios de las distintas etapas de la microsporogénesis, sobre la que existe escasa información.

En un estudio citogenético en onoto, Baer³ determinó el número cromosómico gametofítico de los miembros de este género, utilizando células madre del grano del polen. En estudios anteriores existía discrepancia al respecto, ya que Janaki-Ammal, citado por Darlington⁶ mencionó la presencia de un número cromosómico haploide $n=7$, mientras que Simmonds¹³ reportó $n=8$. Según Baer³; posiblemente esta disparidad pudo presentarse como resultado de la dificultad en interpretar el material disponible, o podría deberse a una deleción de uno de los cromosomas a partir de un número original de ocho. Con la finalidad de esclarecer esta discrepancia, mediante observaciones cromosómicas a partir de las células madre de polen, este autor logró contar el número cromosómico haploide de $n=8$ en varias observaciones de células en metafase I. Todas estas observaciones fueron ilustradas mediante dibujos realizados a partir de microfotografías, pero no se registró ninguna evidencia fotográfica de las células en división meiótica. Tampoco se señalaron las etapas citológicas ni su asociación con el tamaño del botón floral.

La importancia de la citogenética radica en que puede ser usada con fines de mejoramiento de plantas, tanto en los aspectos básicos iniciales (determinación del número básico esporofítico y gametofítico, cariotipos, detección de anormalidades en los procesos mitótico y meiótico), como directamente en los programas de mejoramiento, como control y complemento de las técnicas convencionales (obtención de líneas homocigotas, producción de semilla híbrida, creación y mantenimiento de nuevas combinaciones de genes, entre otros). En este sentido, cuando se llevan a cabo investigaciones sobre morfogénesis *in vitro*, particularmente cuando éstas involucran una fase de callo o se usan como explante tejidos de anteras y/o microsporas, sea con fines de mejoramiento o propagación, se hace necesario evaluar el material que sirve como fuente del explante para determinar su estabilidad. Para ello, es recomendable determinar el nivel de ploidía. En consecuencia, es imprescindible contar con protocolos de contaje de cromosomas que permitan comprobar la presencia de variaciones en el número cromosómico gametofítico de la especie bajo estudio. Debido a la poca información con relación a la citogenética del onoto y a la necesidad de contar con un

método confiable para determinar el número gametofítico de cromosomas, en el presente trabajo se plantearon como objetivos, establecer una metodología para el contaje de cromosomas en células madre de las microsporas en metafase I, así como describir los eventos citológicos en células en división meiótica, relacionando ésta última con la longitud del botón, como un estudio básico para trabajos de mejoramiento genético o de propagación en este cultivo.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de citogenética del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Instituto de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Se utilizaron botones florales de plantas adultas del genotipo Portuguesa, del jardín de onoto existente en el campo experimental del Instituto de Agronomía de la misma Facultad. Las muestras de botones florales se colectaron dentro del período de floración, que va de diciembre a enero, en el segundo año de floración. Se tomaron numerosos botones en diferentes estados de desarrollo; cada botón se midió con la ayuda de un vernier desde la base del pedúnculo hasta el ápice.

Inicialmente se determinó el momento de mayor tasa de división celular, con el objeto de visualizar células en los diferentes estados de desarrollo y división nuclear. Para ello se utilizó tejido esporofítico (ápices de raíces), el cual sirvió como referencia para el momento de fijación de los botones florales.

Se seleccionaron botones florales con tamaños que oscilaban entre 0,3 y 1 cm de longitud e inmediatamente se colocaron en una solución de Carnoy II, por un período de 24 h a una temperatura de 5°C. Posteriormente se hicieron tres lavados con alcohol etílico (70 %) a intervalos de 5 min. y se almacenaron en esa misma solución a 5°C hasta el momento de su utilización. Se probaron tres soluciones de tinción: orceína acética 1%, carmín acético 1% y carmín propiónico 2%. Las anteras extraídas de cada tamaño de botón floral seleccionado se colocaron sobre un portaobjeto y se colorearon con una gota de colorante. Posteriormente se pasaron sobre la llama de un mechero, evitando su ebullición y eliminando el colorante con un papel secante; este proceso se repitió tres veces consecutivas. Nuevamente se agregó una gota de colorante, presionando las anteras para permitir la salida de las células madre de las microsporas, teniendo cuidado de no dañar el tejido. Con la ayuda de una pinza se extrajeron los restos de antera, tratando de dejar sólo la masa de células (tejido esporógeno). Posteriormente, se añadió otra gota de colorante y se colocó el cubre objeto, retirando el exceso de colorante. Finalmente, el cubre objeto fue sellado de forma semi-permanente con esmalte transparente para uñas. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento máximo de 1600x y se tomaron fotografías en diferentes etapas de la división celular.

RESULTADOS

La mayor tasa de división mitótica se encontró a las 12:30 am; por tanto se utilizó como referencia para la fijación de los botones florales, de manera de visualizar la secuencia meiótica en las células madre de las microsporas. Este tiempo de fijación óptima no coincide con el ya señalado por Baer³, quien determinó que el momento óptimo de recolección del material con el que trabajó eran las 10:00 am. La discrepancia posiblemente se deba a que este investigador utilizó otro genotipo, creciendo bajo otras condiciones de latitud y régimen diario de iluminación. De los tres colorantes utilizados, la orceína acética al 1% presentó una buena coloración y definición en la observación y estudio de los núcleos de las células madre de las microsporas; mientras que para la tinción de los cromosomas la mejor resolución se presentó con el colorante carmín propiónico 2%.

En general, todo el proceso de microsporogénesis y microgametogénesis (desde la ocurrencia de

meiosis hasta la maduración del grano de polen), se llevó a cabo en un intervalo de longitud de botones florales entre 0,4 y 1,0 cm. Se pudo apreciar que los botones florales con longitudes $\leq 0,5$ cm, presentaban una masa de células no diferenciadas (tejido esporógeno). Se obtuvo un valor de $n=8$ cromosomas en todas las células madre del grano de polen en metafase I donde se logró contabilizar el número de cromosomas; se presentó en botones florales cuyas longitudes oscilaban entre 0,5 y 0,6 cm ([Figura 1a](#)). En un estudio citogenético sobre el número cromosómico haploide realizado por Baer³ y Simmonds¹³ se determinó este mismo número, pero sólo presentaron un dibujo de los mismos, sin evidencia fotográfica. La anafase I ([Figura 1b](#)), señala el movimiento de los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula; y para finalizar la primera división meiótica, se muestra la telofase I ([Figura 1c](#)), donde se aprecia la migración completa de los cromosomas. Por otra parte, en la meiosis II, o segunda división meiótica, se observó la profase II ([Figura 1d](#)), donde se visualizó una contracción de los cromosomas, y finalmente la telofase II, donde ha ocurrido un desplazamiento completo de las cromátidas hacia los cuatro extremos de la célula ([Figura 2a](#)). Durante la meiosis no se presentó la formación de las paredes celulares hasta después de ocurrida la Telofase II, cuando se da inicio al desarrollo de las tétradas (meiosis de tipo simultáneo).



Figura 1. Secuencia del desarrollo de microsporas de *Bixa orellanateñidas* con carmín propiónico

2%, (a) célula madre del grano de polen en metafase I con $n=8$ cromosomas (640X), (b) anafase I (1000X), (c) telofase I (1000X), (d) profase II (1000X). A la derecha se muestra una representación esquemática y detallada de los mismos.



Figura 2. Secuencia del desarrollo de microsporas y granos de polen de *Bixa orellana* teñidas con carmín propiónico 2% (a) y orceína acética 1% (b-e). Las flechas señalan a las células en estado de (a) telofase II (1000X), (b) tétradas (630X), (c) disociación de las tétradas liberando una de las microsporas (1000X), (d) microspora en estado uninucleado (1008X), (e) grano de polen en estado binucleado (1008X). A la derecha se muestra una representación esquemática y detallada de los mismos.

En el intervalo de tamaño comprendido entre 0,6 y 0,7 cm predominaron células en estado de tetrada ([Figura 2b](#)). Seguidamente, la microspora es liberada de la tetrada ([Figura 2c](#)) y aquellos botones florales con longitudes entre 0,7 y 0,8 cm presentaron alta proporción de granos de polen en estado uninucleado ([Figura 2d](#)). Posteriormente, ocurre la primera división mitótica que da origen a un grano

de polen binucleado, cuyos núcleos presentaron diferentes tamaños (Figura 2e). Esta etapa de la división se presentó en botones con longitudes mayores de 0,8 cm. Aunque los botones florales de una misma longitud podían contener células madre en fases diferentes, todo parece indicar que existe una estrecha relación entre el estado de la célula madre y la formación de microsporas con el tamaño del botón floral. Dicha uniformidad se presentó en el estado de las células madre de una misma antera y entre anteras de una misma flor.

DISCUSION

En el presente trabajo se determinó el número cromosómico haploide de $n=8$ cromosomas a partir de células madre de las microsporas en metafase I, en conformidad con los estudios citogenéticos de onoto, realizados por Simmonds¹³ y Baer³.

En programas de mejoramiento, donde se persigue la producción de plantas haploides mediante la inducción de embriogénesis a partir de microsporas, se ha determinado que el potencial morfogénico está directamente relacionado con el estado de desarrollo de la misma. En la especie *Brassica* se encontró que este potencial se presentó en poblaciones de microsporas en fase uninucleada tardía⁵; mientras que en cebada (*Hordeum vulgare* L.), la embriogénesis fue inducida a partir de microsporas en estado uninucleado medio¹¹. Asimismo, en café, después de haber colocado anteras en sus diferentes estados (uninucleado, mitótico y binucleado) en los medios de cultivo, solamente se observó respuesta de crecimiento en aquellas donde predominaban los granos de polen uninucleados². Dado que en otros cultivos el estado de la microspora más comúnmente usado para la regeneración de embriones y/o plántulas a partir de cultivo *in vitro* de anteras es en general el estado uninucleado; sería apropiado usar como explante botones florales de onoto con longitudes mayores a 0,7 cm, al menos para el genotipo Portuguesa, donde se concentra la mayor cantidad de células en esta fase.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y al Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía-UCV por el financiamiento del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. **Arce, P.** Caracterización de 81 plantas de achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección del CATIE procedentes de Honduras y Guatemala, y propagación vegetativa por estacas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE, 1984, 170 p.
2. **Ascanio, C.** y **Arcia, A.** Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var. Garnica. *Café Cacao ThéXXXVIII* (2): 75-80, 1994.
3. **Baer, D.** Systematics of the genus *Bixa* and geography of the cultivated annatto tree. PhD. Thesis. University of California, Los Angeles, 1976, 252 p.
4. **Barreto, C.** Las especies en Venezuela. *Dinámica Empresarial. Venezuela* 2(9): 18-20, 1973.
5. **Chatelet, P., Gindreau, K.** and **Hervé, Y.** Development and use of microspore culture applied to vegetable *Brassica oleracea* breeding. En : *Anther and Pollen from Biology to Biotechnology*. Springer, Germany, 1999, 263 p.

6. **Darlington, C and Wylie, A.** Chromosome Atlas of flowering plants. George Allen and Unwin LTD, 2nd Ed., London, 1955, 524 p.
7. **Guzmán, J.** El cultivo del onoto; explotación comercial. Espande, s.r.l. editores. Serie Agrícola Vegetal no. 12, Venezuela, 1989, 146 p.
8. **Knwestubb, C.** Technical aspects of some natural extrates and their use in a coloration of foods and beverages. Food Ingredients Europe, Conference Proceedings, 1989, pp 70- 73.
9. **León, J.** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Segunda Edición. San José, Costa Rica, 1987, 445 p.
10. **Morton, J.F.** Can annatto (*Bixa orellana* L) an old source for food color, meet new needs for safe dye?. Proc. Fla. State Hort. Soc.73: 301-309, 1960.
11. **Mouritzen, P. and Holm, P.** Microspore embryogenesis and plant regeneration from anthers of barley cultured through meiosis. Hereditas117: 179-188, 1992.
12. **Ramos, G.** El cultivo del onoto en Venezuela. Fonaiap Divulga 36:5-17, 1991.
13. **Simmonds, N.** Chromosome behaviour in some tropical plants. Heredity 8: 139, 1954.

© **2011 Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia.**

Acta Científica Venezolana. Edificio FundaVAC. Avenida Neveri. Colinas de Bello Monte. Apartado de correos 47286. Caracas-Venezuela. Telf: (058) 7511420. Fax (058) 7511420.



jtovar@strix.ciens.ucv.ve