

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUBAREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS



*INSTRUCTIVO PARA EL LABORATORIO
DEL CURSO DE FITOGENÉTICA*

ING. AGR. FRANCISCO VASQUEZ

ING. AGR. EDUARDO PRETZANZIN

Guatemala, Julio de 2020

Tabla de contenido

1. MORFOLOGÍA FLORAL DE ESPECIES AUTÓGAMAS Y ALÓGAMAS	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVOS	1
1.3 METODOLOGÍA	1
1.4 EVALUACIÓN	2
1.5 BIBLIOGRAFÍA	2
2. EL AISLAMIENTO DE LAS PLANTAS PARA EL ESTUDIO DE LA ALOGAMIA y AUTOGAMIA	6
2.1 INTRODUCCIÓN	6
2.2 AISLAMIENTO.....	6
2.3 OBJETIVOS	7
2.4 METODOLOGÍA	7
2.5 EVALUACION:.....	8
2.6 BIBLIOGRAFIA	8
3. INDUCCIÓN DE MUTACIONES	9
3.1 INTRODUCCIÓN	9
3.2 OBJETIVOS	9
3.3 MATERIALES y METODOS.....	9
3.4 EVALUACION	10
3.5 BIBLIOGRAFIA	10
4. MARCADORES MOLECULARES RAPD'S	11
4.1 INTRODUCCIÓN	11
4.2 OBJETIVOS	12
4.3 METODOLOG/A	12
4.4 VARIABLES DE ESTUDIO	12
4.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	13
4.6 EVALUACIÓN	13
4.7 BIBLIOGRAFÍA	13
5. USO DE DESCRIPTORES PARA LA CARACTERIZACION DE CULTIVOS	14
5.1 INTRODUCCIÓN	14
5.2 OBJETIVOS	14
5.3 6.3 CONCEPTOS BASICOS	14
5.4 METODOLOGIA	17
5.5 BIBLIOGRAFÍA	18
6 EL CONCEPTO DE GENE POOL (RESERVORIO GENÉTICO)	19
6.1 INTRODUCCIÓN	19
6.2 QUE ES EL RESERVORIO GENÉTICO (GENE POOL)	19
6.3 OBJETIVOS	20
6.4 METODOLOGIA	20
6.5 EVALUACION	20
6.6 BIBLIOGRAFÍA	21

7	TÉCNICAS PARA EL CRUZAMIENTO EN PLANTAS AUTÓGAMAS	22
7.1	INTRODUCCIÓN	22
7.2	OBJETIVOS:	22
7.3	MATERIALES y MÉTODOS:	23
7.4	EVALUACION:	25
8	POLINIZACIÓN CONTROLADA PARA MEJORAMEINTO GENETICO DE GÜICOY (<i>Cucurbita spp.</i>). 26	
8.1	INTRODUCCIÓN	26
8.2	OBJETIVOS	27
8.3	METODOLOGÍA	27
8.4	EVALUACION:	28
8.5	BIBLIOGRAFÍA.....	28
9	CULTIVO DE ANTERAS.....	29
9.1	INTRODUCCIÓN	29
9.2	OBJETIVO DE LA PRÁCTICA.....	30
9.3	MATERIALES y EQUIPO	30
9.4	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	30
9.5	EVENTOS IMPORTANTES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA	32
9.6	PREGUNTAS	32
9.7	EVALUACIÓN	32

PRESENTACIÓN

El presente manual constituye un apoyo para la parte teórica de los cursos relacionados con la Fitogenética y el mejoramiento de la plantas. Se Inician las prácticas con la morfología floral de las plantas autógamas y alógamas, para luego conocer la forma de fecundación de una especie con la que se cuenta con poca información utilizando el aislamiento mecánico con el uso de cajas aisladoras. Así mismo se proporcionan las técnicas de inducción de mutaciones para generar variabilidad utilizando elementos radiactivos como el cobalto 60 cuando no se tiene o se tiene muy poca en un material genético. El manejo de los caracteres cuantitativos es de vital importancia para el fitomejorador, por lo que se ha diseñado una práctica para reforzar esos conocimientos. En el campo de la Biotecnología se prepararon dos prácticas relacionadas, una de cultivo de anteras para la obtención de doble haploides y la segunda, está relacionada con el uso de métodos bioquímicos como lo son los marcadores moleculares para caracterizar e identificar materiales genéticos vegetales, estas prácticas se realizarán en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad. La determinación de la disponibilidad de fuentes de germoplasma (Gene Pool) con miras a utilizarlos en un programa de mejoramiento son consideradas en este manual. Por último, las técnicas básicas para la polinización controlada en plantas autógamas y alógamas es contemplada en este instructivo. Como profesores de la Facultad de Agronomía esperamos que este documento sea de verdadero beneficio para aquellos estudiantes que se dedican o se dedicarán a la genética de las plantas o sea la Fitogenética.

Los Autores

FRANCISCO VÁSQUEZ

EDUARDO PRETZANZIN

1. MORFOLOGÍA FLORAL DE ESPECIES AUTÓGAMAS Y ALÓGAMAS

1.1 INTRODUCCIÓN

La genética de plantas debe conocer a profundidad la especie que esta trabajando. Siendo la flor el órgano en el que ocurre el proceso de polinización, fecundación, formación de semillas y frutos, el conocimiento de su morfología es de vital importancia.

Por regla general los estudios de alogamia y autogamia en una especie vegetal se inicia por el estudio profundo sobre la morfología floral. En algunos casos tan solo la posición de los órganos reproductores en la flor se puede proponer hipótesis a cerca de la forma de reproducción de las especies. Existe una relación estrecha entre la morfología floral y el modo de reproducción de las especies vegetales. Toda polinización controlada requiere de un conocimiento profundo de la flor y sus partes, esta práctica pretende que el estudiante se motive al estudio de la morfología floral de las especies vegetales que **encuentra en sus investigaciones o trabajos de campo.**

1.2 OBJETIVOS

- Conocer la morfología floral de algunas plantas autógamas y alógamas
- Relacionar la morfología floral con el modo de reproducción de la especie e inferir cuales son los agentes polinizadores

1.3 METODOLOGÍA

El instructor de laboratorio entregará Inflorescencias de varias especies vegetales. Cada grupo diseccionará las flores e inflorescencias e identificará cada una de sus partes con el auxilio del estereoscopio. Se elaboraran diagramas de todo lo visto en el estereoscopio, se debe dar respuesta a las siguientes preguntas

- Con que especie trabajó en el laboratorio
- Nombre común
- Nombre científico
- Dibuje la flor o inflorescencia completa; masculina, femenina o bisexuales, señalando todas y cada una de sus partes. Además indique si están en la misma planta o en plantas separadas; clasifique si la planta o la especie

es monoica, dioica, hermafrodita, etc.

- Dibuje únicamente el gineceo y androceo, indicando sus partes, tipo de placentación (posición del ovario).
- Dibuje únicamente el gineceo y androceo, indicando sus partes, tipo de placentación (posición del ovario).
- Dibuje un grano de polen e indique como se clasifica el polen (consulte el manual de palinología en el herbario)
- A la luz de sus observaciones de morfología floral de la especie que usted trabajo, esperaría que la planta fuera predominantemente autógama, alógama (anemófila o entomófila), o mixta.
- Que mecanismo promueve la autogamia o alogamia en las especies trabajadas.

1.4 EVALUACIÓN

- Se evaluara los esquemas de lo observado, identificando cada una de
- sus partes, entregándola al final de la práctica.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

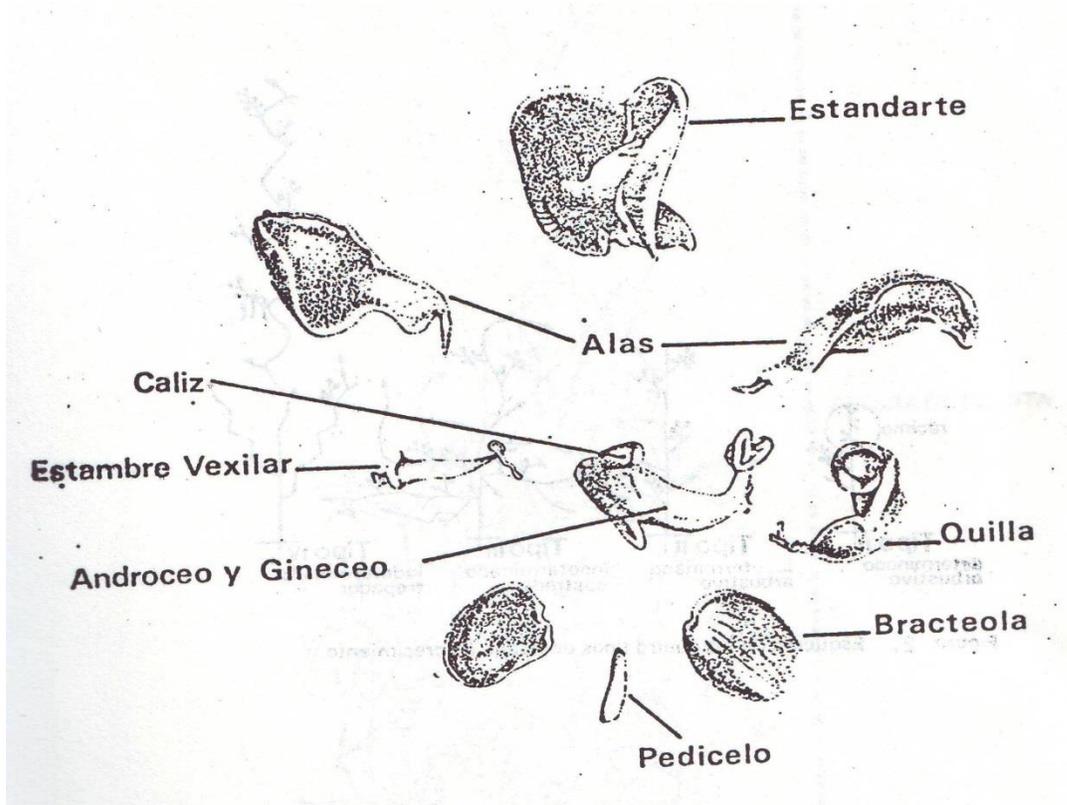
- FREYTAG, G. F AND DEBOUCK, D. 2002. Taxonomy, distribution and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionae) in North America, Mexico and Central America. Brit Press, Texas, USA. 300 páginas.
- STANDLEY, P.C.; STEYERMARCK, J. Chicago, EE. UU., Chicago (varios volúmenes). 1958. Flora of Guatemala . Natural History Museum, Botany.
- FONTQUER. 1953. Diccionario de Botánica. Barcelona. España. Ed. Labor. 1244. Págs.

Flor del Frijol

↓ ♀ K (5) C + (2) A (9) + 1 G (1)

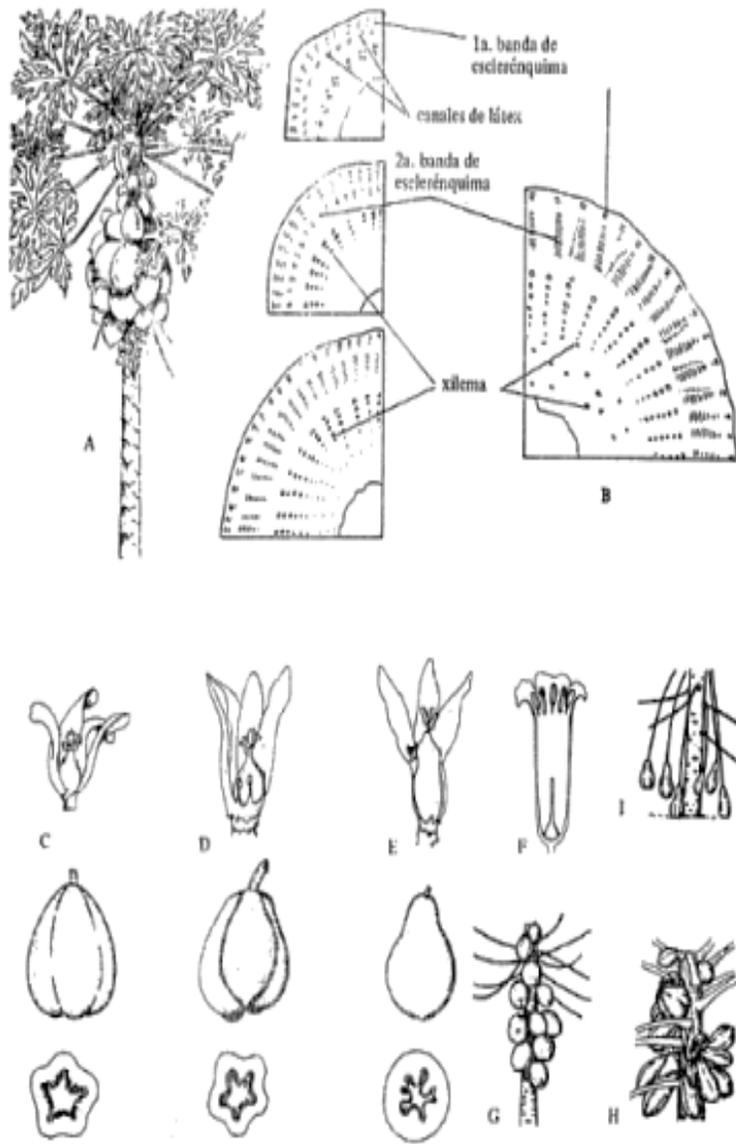
Con esto podemos deducir que la flor del frijol es cigomórfica, hermafrodita ya que tiene en su estructura tanto los órganos masculinos como los femeninos, un cáliz con 5 sépalos unidos, una corola con 5 pétalos 3 de ellos libres y 2 unidos entre sí, un androceo con nueve estambres también unidos entre sí y el gineceo es supero.

Gráfica tomada de FREYTAG, G. F AND DEBOUCK, D. 2002. Taxonomy, distribution and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionae) in North America, Mexico and Central America. Brit Press, Texas, USA. 300 páginas.



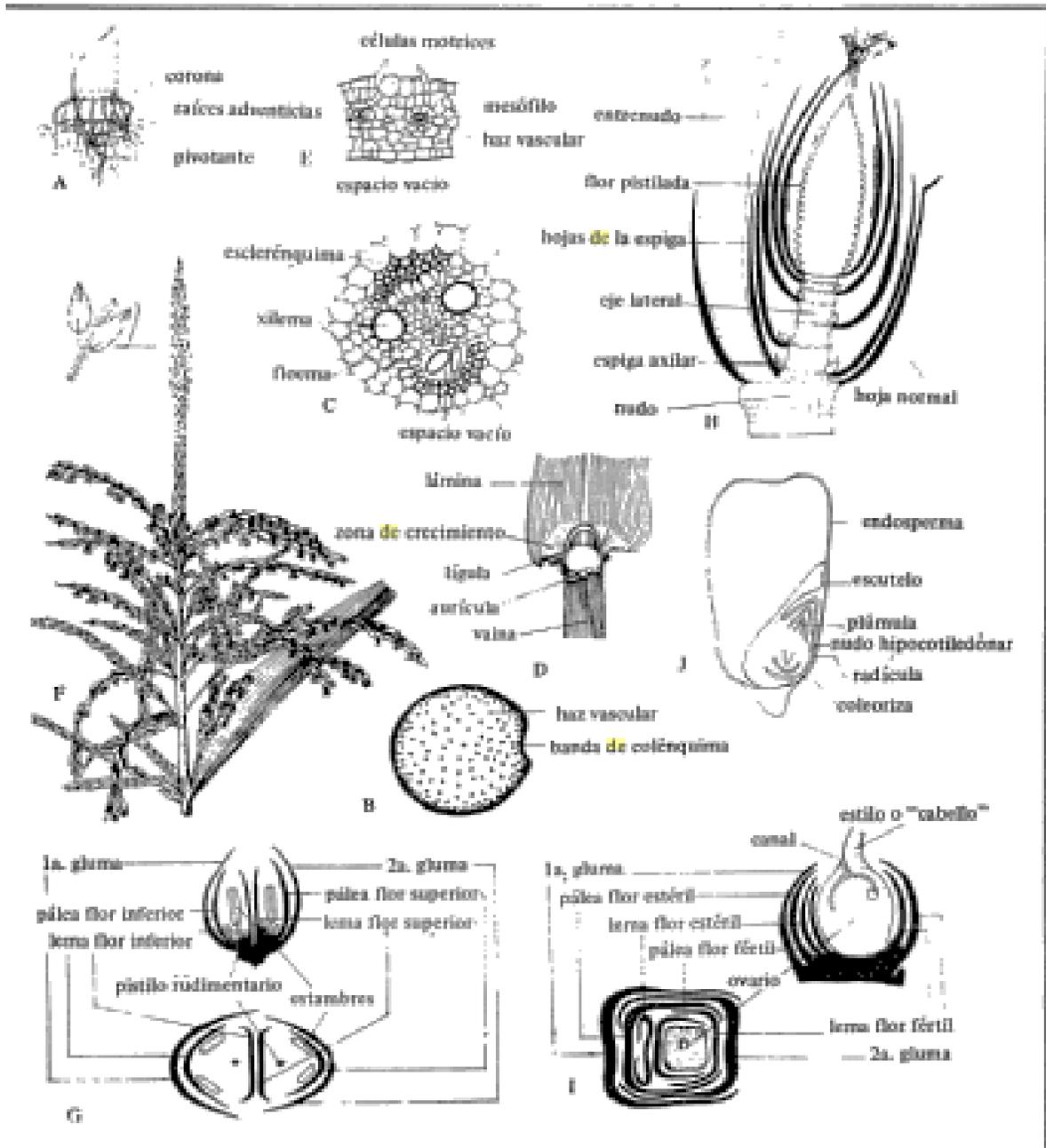
Partes de la flor de frijol, según Daniel Debpuq, en su documento denominado Morfología de la planta de frijol.

Figura Tomada de: , Jorge Leon. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª. Edición IICA. San José de Costa Rica.



Carica papaya. A, porte. B, cortes del tallo. C, flor pistilada y fruto. D, flor pentandria y fruto. E, flor elongata y fruto. F, flor estaminada. G, planta de flores pistiladas. H, planta de flores hermafroditas. I, planta estaminada estacionalmente fértil.

Figura Tomada de: , Jorge Leon. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª. Edición IICA. San José de Costa Rica.



37.1. *Zea mays*, maíz. A, corona. B, tallo, corte transversal. C, haz vascular. D, hoja. E, hoja, corte transversal. F, panoja. G, flor estaminada, diagrama. H, espiga pistilada. I, flor pistilada, diagrama. J, cañamo.

2. EL AISLAMIENTO DE LAS PLANTAS PARA EL ESTUDIO DE LA ALOGAMIA y AUTOGAMIA

2.1 INTRODUCCIÓN

Para el mejorador de plantas, las especies pueden agruparse en dos categorías, a saber: Predominantemente autógamias o alógamas. Por regla general los métodos de mejoramiento que se aplican en cada grupo son diferentes.

El conocimiento de la autogamia y la alogamia de una especie, es de vital importancia para iniciar un programa de mejoramiento genético, esto es más imprescindible en aquellas especies que se sabe muy poco de ellas y es necesario someterlas a un proceso de domesticación.

El procedimiento para aproximarse a una información valedera es el recomendado por Allar (Vea página 50 de su libro introducción a la mejora de plantas cultivadas) Después de haber aislado a una planta de la forma que mejor convenga, se le permite que se desarrolle y produzca flores. Posteriormente se examinan las inflorescencias para confirmación de frutos (y/o semillas). Si la planta fue incapaz de producir frutos, es una muestra clara que el cultivar estudiado presenta alogamia. Sin embargo, a la inversa (que la fructificación es indicio de autogamia) no es tan cierto en vista de que existen especies alógamas autofértiles como el maíz. Así que la autogamia es en términos generales más difícil su determinación que alogamia. Por tanto, habría que recurrir el efecto de la consanguinidad.

Debe indicarse que previo al estudio de la autogamia o alogamia en un cultivar, debe efectuarse estudios profundos en su morfología floral.

2.2 AISLAMIENTO

En el mejoramiento genético se dan dos tipos de aislamiento, a saber. Físico y genético. El genético consiste en el uso de la androesterilidad que juega un papel muy importante en la formación de híbridos.

En el aislamiento pueden identificarse: El mecánico, mediante el uso de bolsas, jaulas, etc., se considera que este tipo de aislamiento podría introducir condiciones adversas al individuo aislado que le afectarían su floración y fructificación. El aislamiento por espacio tiene una gran aplicación en este tipo de estudios y consiste en sembrar plantas a cierta distancia que limita el transporte de polen de otras plantas que podría crecer cerca de ella.

2.3 OBJETIVOS

- -Que el estudiante conozca el procedimiento para determinar alogamia o autogamia en un cultivar.
- Que conozca los tipos de aislamiento que existen.

2.4 METODOLOGÍA

1. Cada grupo de estudiantes utilizará una planta adulta de chinita de desarrollo vegetativo.
2. El grupo llevará un estudio minucioso de las fases de floración y fructificación (en un cuadro).
3. Se efectuarán cruza con otras plantas de la misma especie pero diferente color de flor aislando flores con bolsa.

Cuadro auxiliar para hacer anotaciones del experimento de determinación de alogamia o autogamia.

FECHA	No. De inflorescencias	No. De inflorescencias con frutos	No. De frutos por inflorescencia	NO. De frutos

Para la toma de datos que se inicia con mayor grado al inicio de la floración, se llevará un registro por flor y/o inflorescencia emitida y al final si fue fecundada o no. Se recomiendan etiquetas de hilo con diferentes colores.

Al aparecimiento de la flor deben efectuarse lecturas continuas cada 7 días para anotar los incrementos en producción de flores.

Si existe formación de fruto indicar si es de autopolinización o por cruza (artificial). Debe entregarse un reporte completo: Introducción, Objetivos, Hipótesis, Materiales y métodos, Resultados, Conclusiones y Recomendaciones, Así como el resumen de la bibliografía consultada según normas del IICA.

Al final del estudio, el estudiante mostrará la planta al instructor indicando los resultados obtenidos.

2.5 EVALUACION:

El reporte de la práctica, *vale* 3 puntos y se entregará 6 semanas después de haber impartido el laboratorio.

2.6 BIBLIOGRAFIA

1. Allard R. W. Principios de la mejora genética de las plantas. España. España, Ediciones Omega, S.A.
2. Standley P. Steyermark A. Botanical Fieldmuseum Flora of Guatemala; Fieldiana Botany, of Natural History. 1976.

3. INDUCCIÓN DE MUTACIONES

3.1 INTRODUCCIÓN

Cuando existe una buena variación genética en el material con que se trabaja, el mejorador tiene mayor ventaja en obtener las características que le interesan; de ahí la importancia de conocer y evaluar la técnica de inducción de mutaciones, como herramienta auxiliar en la producción de cambios artificiales heredables, que sirvan en la investigación de fitomejoramiento o en trabajos aplicados. Una de las interrogantes que afronta el mejorador es, ¿Qué dosis de radiación aplicará al material vegetal que utilizará en la investigación? Además, ¿Cómo hacer para estimar dicha dosis? Las respuestas a éstas interrogantes constituyen el objetivo de ésta práctica.

3.2 OBJETIVOS

- Que el estudiante conozca los tipos, fuentes e importancia de las mutaciones en el mejoramiento de las plantas.
- Que el estudiante determine la dosis óptima de irradiación Gama 60 para inducir mutaciones en variedades de frijol.
- Que determine la radiosensibilidad intra e interespecífica a la radiación ionizante.
- Conocer que avances se han tenido en el mejoramiento genético por **mutaciones**.

3.3 MATERIALES y METODOS

- Se formarán grupos de estudiantes por cada día de laboratorio.
- Cada grupo trabajará un ensayo completo de inducción de mutaciones, así:
- Obtendrá cajas de madera aproximadamente de las dimensiones siguientes: 60 cms de ancho x 80 cms de largo x 15 cms de alto o en un tablón que el grupo elaborará.
- Las semillas irradiadas con dosis de 10, 20, 30, y 40 Krads., se sembrarán en tres réplicas de semillas(total de semillas) por dosis, incluyendo un testigo.

- El diseño experimental será con distribución completamente al azar.
- Las distancias de siembra serán de 10 cms entre hileras y 5 entre plantas. (Puede usar bandejas de germinación)
- Desde el momento de la germinación se registrará cada día la altura de las plantas, por tratamiento y el % de germinación.
- Se ploteará la altura de plantas (cm) contra tiempo (días), para conocer el punto de estabilización de la altura. Se ploteará la reducción de crecimiento (%) contra tiempo (días) y en otra gráfica, la reducción de la sobrevivencia (%) contra días.
- En base a las últimas dos gráficas se determinará la dosis a utilizar, de acuerdo a los criterios dados en la teoría.
- Se elaborará un informe completo de la práctica. Deben incluirse los resultados obtenidos y los ANDEVAS y otros análisis efectuados.

3.4 EVALUACION

El reporte de la presente práctica se entregará 2 semanas después de finalizar la toma de los últimos datos de campo.

3.5 BIBLIOGRAFIA

1. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. 1977. Manual on Mutation Breeding. Second edition. Vienna. 288 p.
2. -----1974. Polyploidy and induced mutations in plant Breeding. Vienna. 413 p.
3. -----1984. Selection in mutation Breeding. Vienna.180 p.
4. -----Induced mutations.1973. in vegetatively propagated plants. Vienna. 222 p.
5. -----1989. Plant Domestication by induced mutation. Vienna. 206 p.
6. -----1961 . Effects of ionizing radiations on seeds. Vienna. 655 p.

4. MARCADORES MOLECULARES RAPD'S

4.1 INTRODUCCIÓN

Los avances de la biología molecular han aportado una clase nueva de marcadores genéticos que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homologas del ADN de los organismos. Estas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula. La técnica de marcadores RAPD' s (Randomly Amplified Polymorphic DNA, polimorfismos de ADN amplificadas al azar) se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma. Las bandas son generadas por la existencia de varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido en particular. Para que se lleve a cabo la reacción se requiere del ADN que se desea amplificar, una enzima termoestable conocida como Taq (Aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*), magnesio como cofactor de la enzima, secuencias cortas de oligonucleotidos (e.g., 10 pares de bases) conocidas como nprimers^H y nucleotidos libres. La técnica como tal es una variación de PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permite amplificar a gran escala regiones específicas del ADN, y facilita la manipulación posterior de los fragmentos amplificados.

Por tanto, la técnica como tal le es útil al fitomejorador en el sentido que le permite conocer la "Variabilidad Genética" de sus materiales. Integrándola por tanto a la información Morfológica Bioquímica con que debe contar, y con ello tener un criterio de decisión más sólido en la "Selección de Progenitores". El criterio a seguir es planificar "Cruzar" los materiales que sean más disímiles para con ello buscar heterosis.

Por último cabe mencionar que actualmente se trabaja con otras técnicas más específicas de análisis de ADN como lo son: AFLP (técnica del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) RFLP (Técnica de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, Microsatélites, y otras. Con las cuales se rastrean características de interés como resistencia a enfermedades, o bien como diagnóstico

Fitopatológico Ej. test para diagnosticar la presencia de *Xanthomonas albilineans* y *Clavibacter xili* que provocan la escaldadura foliar y el raquitismo en Caña de Azúcar.

4.2 OBJETIVOS

General:

Determinar la variabilidad genética existente en los genotipos proporcionados mediante la utilización de fragmentos RAPD's con el propósito de seleccionar progenitores para incluirlos en el programa nacional de mejoramiento.

Específico:

Determinar el índice de similitud entre materiales con el propósito de identificar progenitores contrastantes.

4.3 METODOLOG/A

- a. Seleccionar la fuente del material vegetal.
- b. Procedimiento para la extracción de ADN de los cultivares
- c. Procedimiento para limpiar el ADN de contaminantes, verificación de pureza y verificación de integridad.
- d. Procedimiento de amplificación de fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- e. Detección y evaluación de la presencia de fragmentos RAPD's

4.4 VARIABLES DE ESTUDIO

- a. Distancia de migración de los fragmentos RAPD's
- b. Calibración de la longitud de los fragmentos.
- c. Número de los fragmentos producidos
- d. Presencia o ausencia de fragmentos.

4.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

a. Evaluación del grado de similitud entre individuos de una *misma* población

$$SA_{i,j} = 2 NA_{i,j} / (NA_i + NA_j) \times 100$$

b. Obtención de la distancia genética entre individuos de una misma población $DA_{i,j} = 100 - SA_{i,j}$.

c. Con la información obtenida en las matrices generar un dendrograma.

d. Discutir resultados al integrar con datos de caracterización morfológica bioquímica que será proporcionada,

4.6 EVALUACIÓN

Se hará entrega de un reporte técnico una semana después de finalizada la práctica.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

- Moctezuma, E.V.; Kahl, G. 1972-2000, Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Universidad Autónoma de Chapingo. Mundi Pesa México, S,A. de C.V. 147 p.
- Genética Molecular para el Inventario y la Caracterización de la Biodiversidad. Background. CIAT. Unidad de Biotecnología. 68 p.

5. USO DE DESCRIPTORES PARA LA CARACTERIZACION DE CULTIVOS

5.1 INTRODUCCIÓN

Es posible identificar dos formas de utilización de los resultados de una descripción de cultivares o varietal, cada una de las cuales varía en la precisión que se requiere. En primer término debe citarse los estudios genéticos, evolutivos aplicados típicamente en los bancos de germoplasma, los cuales requieren gran precisión en la toma de datos, de muchas características. Por otro lado, la descripción varietal aplicada con fines de mejoramiento genético y de promoción comercial, solo requiere resaltar aquellas características de interés agronómico, morfológico, nutricional de interés para el fitomejorador y comercial, de importancia para el agricultor.

En todo programa de mejoramiento que sigue un científico, puede desarrollar etapas como: Exploración, Recolección, introducción, evaluación, y conservación de germoplasma. Para la evaluación y caracterización de germoplasma es necesario el uso de descriptores, que describan la variabilidad de uno o varios cultivares específicos que desean estudiar. De tal manera, que el descriptor uniformiza la información a obtener en una caracterización con el objeto del intercambio de información o conservación de germoplasma y principalmente en el mejoramiento genético.

5.2 OBJETIVOS

- Estructurar descriptores de observación y comparación de muestras.
- Capacitar al estudiante de Fitomejoramiento en el uso del descriptor y llevar la descripción de especies, tomando datos directamente en el campo.

5.3 6.3 CONCEPTOS BASICOS

Descriptor:

Es la clasificación, medición o análisis fenotípico de cada entrada, muestra o línea

de una especie para un conjunto de características bien definidas.

Funciones:

- a) Uniformizar y estandarizar la descripción sistemática de cultivares.
- b) Facilitar y Posibilitar una descripción sistemática.
- c) Intensificar el intercambio de datos entre mejoramiento genético tanto nacionales como internacionales.

Generalmente existe un descriptor para cada especie, siendo la institución líder en la elaboración de éstos es el IBPGR CIRF) Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos.

Descripción del Fenotipo:

La descripción varietal, se realiza sobre el fenotipo observado de las plantas de una variedad y éste dependerá del potencial genético (genotipo) de cada planta y de su expresión (fenotipo) acorde con los efectos ambientales presentes; por lo tanto, se debe conocer la manifestación de un fenotipo para tratar de diferenciar las variaciones debidas a efectos ambientales ya que es prácticamente imposible eliminar las variaciones ocasionadas por causas ambientales.

Con base a estos criterios, la descripción varietal debe incluir, entre otras características fenotípicas más lógicas y aparentes, aquella variación esperada y medible lo que requiere de técnicas de muestreo y uso de estimadores estadísticos adecuados en los cuales se fundamentará la confiabilidad de la descripción.

Parámetros descriptivos y su medición:

Entre los parámetros descriptivos debe diferenciarse aquellos que son fijos de los que son variables. Los fijos dependen generalmente de uno o de pocos genes que determinen una característica de distribución discreta, es decir de fácil diferenciación entre las posibles alternativas fenotípicas, como son por ejemplo, el color de la flor del frijol, el del grano de maíz, la presencia de aristas en el arroz y

otros. Estos caracteres se denominan cualitativos y son los más confiables por estar menos influenciados por el ambiente.

Por el contrario, los parámetros descriptivos variables dependen generalmente de un número mayor de genes y se manifiestan fenotípicamente como una distribución continua.

Estos caracteres se denominan cuantitativos y son más afectados por el ambiente. Ejemplos de éstos son la longitud de la guía de los frijoles de crecimientos indeterminados, altura de planta de maíz y otros.

En vista que los descriptores contienen datos cualitativos y cuantitativos, es necesario ampliar su discusión.

A. Datos Cuantitativos: son valores numéricos derivados de mediciones directos del atributo, carácter, ejemplo: Peso de mazorca, altura de planta, número de flores, porcentaje de viabilidad, etc.

Cuando se hacen las lecturas, los datos pueden anotarse utilizando 2 tipos de escalas, la escala intervalórica y escala de razón o relación.

A.1 La escala intervalórica usa unidades estándar que son muy conocidas: gramos, metros, grados centígrados y la medida directa representa una relación o un %. ejemplo en los casos de % de germinación es una relación entre el número de semillas germinadas y el número total de semillas.

B. Datos Cualitativos: Representan objeto que se examina, color del objeto textura del objeto (rugoso, medio liso) la calidad o (rojo, azul, propiedades del amarillo, etc.), Los datos cualitativos son codificados para cada característica y cada número represente el "estado de carácter". En los datos cualitativos pueden usarse dos tipos de escalas; a saber, escala nominal y ordinal.

B.1 En la Escala Nominal los estados del carácter no tienen ninguna relación lógica entre uno y otro, ejemplo:

Uso del Fruto la escala

1. Verdura

2. Postre
3. Medicinal o Puede ser otro uso

1. Postre
2. Medicinal
3. Verdura
4. Otro uso

B.2 Escalas Ordinales:

En esta escala los estados del carácter están listos en orden lógico, Muchos caracteres cuantitativos se pueden expresar "Cualitativamente" y expresarlos en escalas ordinales, ejemplo:

Altura de planta:

1. Corta (1 m)
2. Intermedia (1-1.5 m)
3. Alta (1.50 m)

C. Datos Binarios:

Algunos caracteres cualitativos que registran su presencia o ausencia utilizando la codificación.

1. Presente Sí
0. Ausente No

Se llaman binarios porque para un carácter solo puede estar presente o ausente es decir no pueden existir los *dos* al mismo tiempo.

5.4 METODOLOGIA

1. Cada grupo de estudiantes tendrá una especie de maíz identificada con número de cultivar.
2. El grupo recibirá el descriptor respectivo.
3. Tomarán los datos utilizando el descriptor respectivo para toda la población en cada parcela. (Para altura de planta se recomienda utilizar una estadía).
4. El trabajo es real, se pretende caracterizar cada cultivar de maíz, así como

incrementar su germoplasma.

5. Para el caso de variables cuantitativas reportando rango, media y desviación estándar. Para variables cualitativas se analizará con sus frecuencias.
6. El informe final tendrá el detalle completo del cultivar caracterizado en un cuadro resumen anotando la variable, su valor y sus análisis estadística descriptiva.

El reporte final se entregará 15 días después de finalizada la práctica.

El informe será completo con todos los puntos discutidos el primer día del laboratorio.

Cualquier duda en la toma de datos, consulte a los encargados del laboratorio.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

Además de la citada en el programa del curso se recomienda consultar las tesis de grado de la facultad de agronomía de la Universidad de San Carlos sobre evaluación y caracterización de variedades o cultivares de maíz (*Zea mays*). Así mismo se recomienda consultar el descriptor oficial del IBPGR del maíz (*Zea mays*) consultándolo en las páginas de internet.

6 EL CONCEPTO DE GENE POOL (RESERVORIO GENÉTICO)

6.1 INTRODUCCIÓN

Las actividades a desarrollar en el campo de los recursos Fitogenéticos (variedades comerciales, cultivares primitivos, parientes **silvestres**, etc) tales como la recolección, caracterización, evaluación preliminar, documentación y conservación, se efectúan para conocer la diversidad genética de una especie de nuestro interés. Sin embargo el objetivo último de los recursos Fitogenéticos es su utilización o explotación como recursos, de tal manera que la incorporación de caracteres tales como resistencia o tolerancia a plagas, enfermedades, factores abióticos, dentro de nuevas variedades es la justificación de las actividades en recursos Fitogenéticos. Los mejoradores de plantas, están interesados en generar nuevas variedades o no tienen tiempo para establecer relaciones entre especies consideradas en programas de mejoramiento. Son los evolucionistas de plantas los que se encargan de establecer relaciones entre especies, subespecies, razas, ecotipos, etc. , a través de la hibridación experimental, comúnmente estos trabajos se conocen como estudios sobre recruzamientos y permiten evaluar las posibilidades de éxito en la incorporación de genes de una especie a otra. debido a los anteriores se propuso el termino de Gene Pool (reservorio genético, traducción e interpretación del autor de esta guía), por tanto entraremos a conocer dicho concepto.

6.2 QUE ES EL RESERVORIO GENÉTICO (GENE POOL)

Este concepto fue propuesto por Harían y de Wet (1971) y sirve para formular un esquema de información sobre estudios de precruzamiento. Para formular el esquema se coloca en el centro del diagrama la especie de interés o sea la especie biológica acompañada de aquellas sub especies, cultivares o ecotipos que se hibridizan con facilidad y los híbridos resultan ser fértiles, se dice que este grupo pertenece al reservorio genético (uno 1) o (RG-1) o gene pool uno (GP-1).

Aquellas especies que se pueden cruzar con individuos o especies del RG-1 con bajo grado de dificultad y se obtienen híbridos relativamente fáciles, decimos que estas especies o individuos pertenecen al RG-2; en este caso la transferencia de genes de un reservorio a otro es relativamente fácil.

Para aquellas especies o individuos que al realizar el cruzamiento con las especies de la RG-1 resulta muy difícil y que además se obtienen híbridos anómalos o letales o completamente estériles, se considera que estas especies o individuos se considera parte del reservorio genético tres o RG-3. La transferencia de genes es casi imposible requiriendo técnicas muy sofisticadas como rescate de embriones.

Como puede entenderse, las especies o subespecies o cultivares del mismo reservorio genético de que nuestra especie de interés se pueda utilizar fácilmente, pero el uso de otra especie ubicada en otros reservorios genéticos presentan dificultades. A medida que nos alejamos del centro del esquema del reservorio la posibilidad de transferir genes es muy difícil.

6.3 OBJETIVOS

- Conocer cual es el concepto de Gene Pool o Reservorio Genético.
- Establecer el reservorio genético para una especie, basados en la revisión de literatura.

6.4 METODOLOGIA

A cada grupo de estudiantes se le asignará una especie cultivada de importancia económica y elaborarán su reservorio genético para esa especie incluyendo el esquema gráfico. Esta formulación se hará con base a revisión de literatura. Elaborar y presentar un informe completo.

6.5 EVALUACION

Para su valoración vea la programación de las prácticas.

Entrega del reporte 2 semanas después de impartido el laboratorio.

6.6 BIBLIOGRAFÍA

1. Ford-Lloyd and Jackson M. 1986. Plant Genetic Resources. Edward Arnold. London. 81-90 pp.
2. Harlan J.R. and De Wet, J.M. 1971. Classification of cultivated plantas. Toward a rational Tazon; 20, 50g-17
3. Hoyt, Erich. 1992. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Trad. Enrique Forero. Addison-wesley. USA. 52 p.

7 TÉCNICAS PARA EL CRUZAMIENTO EN PLANTAS AUTÓGAMAS

Tamami Udagawa ¹

7.1 INTRODUCCIÓN

El cruzamiento en los vegetales ha resultado ser una herramienta de vital importancia para el mejorador de plantas, muchas características de un individuo son trasladadas a otro gracias al cruzamiento entre individuos. Cuando se ha seleccionado cuidadosamente los padres que se cruzarán el fitomejorador prepara la siguiente fase que consiste en la polinización controlada de estos progenitores.

Es recomendable que el técnico que va a realizar la cruce en la especie objeto del mejoramiento debe conocer la estructura floral de la especie, poniendo mucha atención no solo en la morfología, disposición de los órganos sexuales, el momento en que el grano de polen se dispersa y el momento en que el estigma está receptivo.

Para esta práctica hemos seleccionado la familia *Solanaceae* la cual incluye muchas especies económicas para el hombre (tomate, chile berenjena, papa, etc), esta técnica puede ser utilizada para otras especies en que el mejorador pueda estar interesado.

7.2 OBJETIVOS:

- Que el estudiante adquiera habilidades en la técnica de cruzamiento en una especie autógama.
- Que reconozca el momento oportuno de efectuar la cruce.

¹ Ingeniera Agrónoma, Voluntaria Japonesa de la J.O.C.V.

7.3 MATERIALES y MÉTODOS:

Para efectuar los cruzamientos el equipo y los materiales a utilizar no son muy onerosos, de esa cuenta se necesitan las plantas como material parental, pinzas, alcohol (70%), caja petri, isopos, clips y bolsas de papel.

7.3.1 EMASCULACIÓN:

La emasculación (eliminación de los órganos masculinos de la flor) previa a la ejecución de la cruce es un punto muy importante, pues nos garantiza que la cruce controlada se efectuará en el sentido que el mejorador lo ha decidido y se evita la contaminación genética, especialmente en las plantas que pertenecen a la familia *Solanaceae*, como el tomate y la berenjena, que tienden a auto polinizarse antes de la antesis (cleistogamia). Por eso se realiza la emasculación el día antes de la antesis.

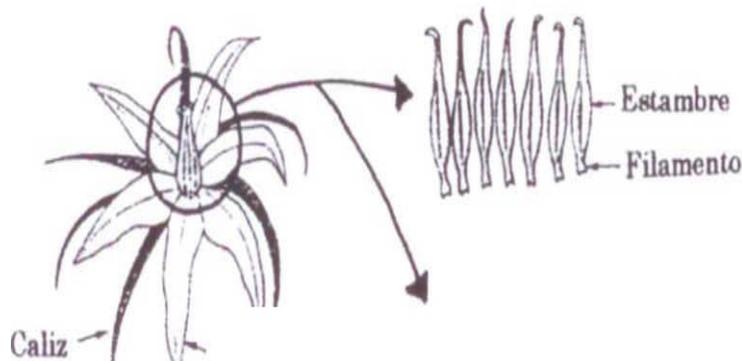


Figura 1. Flor de tomate mostrando sus partes floral

El día anterior a la antesis, se abre el botón floral con pinzas cuidadosamente y se quita todas las anteras, o se pega el polen a las pinzas con alcohol al 70%, para evitar contaminación de polen. Además en caso que se tenga sospecha que la flor a utilizar haya sufrido autogamia la misma no se puede usar para el cruzamiento.

Después de la emasculación, se corta todas las flores que no fueron emasculadas para evitar polinización por otras flores.

7.3.2 RECOMENDACIONES PARA TOMATE:

La flor del tomate tiene 5 estambres, así que hay que quitar todos completamente (emasculación) se recomienda utilizarlo al botón floral 2 o 3 días antes de la antesis. El botan floral adecuado para emasculación posee un color verde amarillento. Se selecciona solo botón floral que esté bien formado y se emascula. Se desechan los botones florales muy pequeños, es decir, los que están en la base del racimo floral.

7.3.3 COLECCION DEL POLEN:

Hay que coleccionar polen también el día anterior. (Se puede coleccionar polen ese día de cruzamiento, pero no es muy eficiente. Se pueden coleccionar polen de las flores de ese día de la antesis. Se puede conservar el polen en recipiente con cal en la parte baja del recipiente (para evitar la humedad) se guarda en lugar frio hasta el día de la polinización.

7.3.4 POLINIZACIÓN:

Se realiza la polinización en la mañana muy temprano porque las flores acaban de llegar a la antesis son capaces de fecundar con una probabilidad más alta. Se poliniza con isopos que llevan los granos de polen. Después de la polinización, se cubre la flor con bolsa de papel escribiendo la fecha y nombres de planta madre y padre. Unos 5 días después de la polinización, se quita la bolsa y conserva la planta hasta la cosecha.

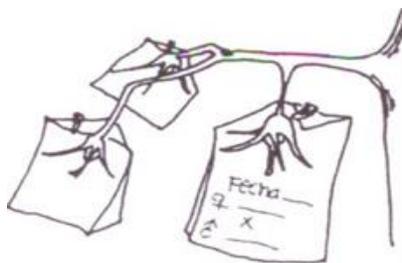


Figura 3. Identificación de las cruzas después de efectuada la polinización.

7.4 EVALUACION:

Después de haber efectuado las cruzas por grupo y de su correspondiente identificación, después de 6 días podemos confirmar si la craza fue efectiva o no, dependiendo del éxito de las cruzas, cada una será ponderada en puntos.

8 POLINIZACIÓN CONTROLADA PARA MEJORAMIENTO GENETICO DE GÜICOY (*Cucurbita spp.*).

8.1 INTRODUCCIÓN

Una de las técnicas más utilizadas en el mejoramiento genético vegetal es el cruzamiento entre plantas. De hecho el origen de la hibridación está precisamente en el cruzamiento de dos individuos con características contrastantes. El éxito de un cruzamiento depende en buena forma de la sincronización de las épocas de maduración de los órganos reproductivos, pero más importante es la técnica utilizada para ello. Con la especie que se desarrollará esta práctica es una planta alógama es decir de polinización cruzada en la que el conocimiento de su estructura y de la época propicia para el cruzamiento es de vital importancia para el éxito del cruzamiento.

La polinización natural de esta especie la realizan los insectos es decir una polinización entomófila como se observa en la figura y esta debe hacerse durante el tiempo en que el estigma es receptivo, y los granos de polen están maduros listos para dispersarse, es necesario practicar el aislando totalmente las flores antes y después de la polinización y de es a manera evitar cruza no deseadas



Figura que muestra una flor masculina y polinizadores.

8.2 OBJETIVOS

- Conocer la morfología floral de los órganos reproductores en el momento de cruza.
- Relacionar la morfología floral con el modo de polinización
- Hacer cruzamientos efectivos utilizando la polinización controlada

8.3 METODOLOGÍA

En el cultivo de Güicoy bajo las condiciones del CEDA del realizaran los reconocimientos de las estructuras reproductivas listas para su cruzamiento.

Se aislara flores masculinas y femeninas por la tarde o antes de su apertura, colocando bolsas de papel mercerizado y sujeta con una liga en el pedúnculo de la flor evitando de tal manera el ingreso de insectos, debidamente identificadas.

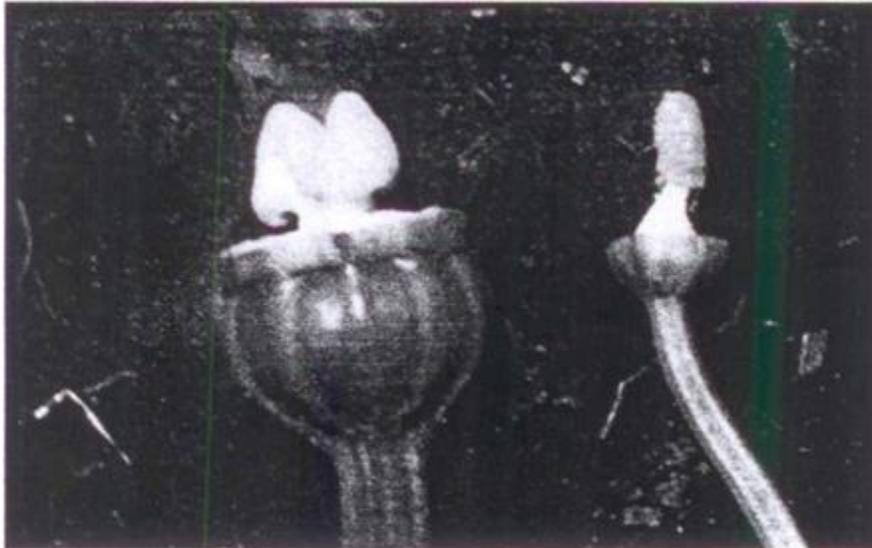


Figura que muestra la flor femenina y masculina de la especie en estudio.

Se efectuarán 10 cruzamientos por grupo de estudiantes, los que deberán identificarse plenamente. Se utilizarán cruza recíprocas. Cuando las flores estén listas para ser polinizadas, se debe retirar las bolsas y en condiciones asépticas con un pincel se debe tomar el polen de las anteras y se depositara en el estigma, evitando causar cualquier daño a este último. Realizada la polinización se aislara nuevamente por un tiempo de 48 horas.

A los 8 días de realizada la polinización se evaluara cuantas flores fueron fertilizadas (los ovarios deben estar ensanchados) .

8.4 EVALUACION:

La evaluación se realizará en función del éxito obtenido por las cruza realizadas, cada cruza con éxito tiene un valor de 10 puntos sobre cien.

8.5 BIBLIOGRAFÍA

- BARRIENTOS GRIJALVA, B.A. 1995. Informe del año 95 del proyecto identificación y obtención de variedades de Guicoy (*Cucurbita sp.*) de alto contenido de provitamina A (beta-caroteno). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas. 50 p.
- BARRIENTOS GRIJALVA, B.A. 1995. Caracterización de 20 cultivares y formación de líneas S1, en el CEDA. Tesis Ing. Agr. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, 81 P .Facultad de Agronomía.
- VASQUEZ, F. et. al. 1998. Identificación y obtención de materiales genéticos de Güicoy (*Cucurbita L.*) con buenas características de demanda y con alto contenido de provitamina "A" (beta caroteno). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación. 35 p.

9 CULTIVO DE ANTERAS

9.1 INTRODUCCIÓN

Mediante la técnica de cultivo de anteras, las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo se colocarán en medios donde el polen inmaduro se divide para formar callo. Transferidos éstos a medios de regeneración, se formarán plantas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides que en forma espontánea duplican el juego cromosómico en las etapas de desarrollo de callo y de regeneración de plantas, obteniéndose plantas doble haploides en alto porcentaje.

Desde que GUHA y MAHESHWARI lo descubrieron en 1964, el cultivo de anteras se ha extendido a más de 150 especies. La integración de ésta técnica con el mejoramiento práctico tiene importancia especialmente en gramíneas y en papa.

El potencial que posee el cultivo de anteras surge de la constitución genética de las células del polen. Las células del polen de los híbridos F1 contienen la dotación genética de las plantas paternas y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Estas células son haploides y permiten por ello al mejorador seleccionar eficazmente la homocigosidad, lo que constituye una de las aplicaciones más importantes en el cultivo de anteras en el desarrollo de variedades nuevas ya que el tiempo, el espacio y los costos necesarios para desarrollar las líneas mejoradas disminuirán considerablemente las líneas homocigóticas (R,) manifestarán la variabilidad inherente a la generación F" añadiendo una ventaja: cada individuo habrá fijado su genotipo y no sufrirá segregación adicional.

9.2 OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

Que el estudiante practique los diferentes eventos que conlleva el proceso del cultivo de anteras para la obtención de plantas doble haploides de trigo.

9.3 MATERIALES y EQUIPO

- Espigas de trigo conteniendo anteras con microsporas en estado uninucleado medio a tardío.
- Medios de cultivo apropiados para el cultivo de anteras de trigo.
- Porta y cubreobjetos
- Microscopio
- Acetocarmín 0.5%
- Mechero
- Refrigerador
- Etanol 50%
- Incubadora calibrada a 26-28°C.
- Cámara de flujo laminar.

9.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Preparación del material experimental

Crecimiento de los materiales

Diferentes cultivares de trigo fueron plantados en condiciones de un sombreador de sarán, con temperaturas predominantes durante el día de 20°C y 15°C durante la noche. Las plantas obtenidas son las donadoras de anteras para llevar a cabo la práctica.

Muestreo

Las primeras 3 o 4 espigas de cada planta serán muestreadas cuando las aristas o barbas de la espiga estén justamente visibles en el orificio de la hoja bandera. En este estado las microsporas de la parte central de la espiga se encuentran en estado uninucleado medio o tardío.

Para estar seguro del estado correcto de las microsporas, de 1 a 3 anteras son colocadas en un portaobjetos. Se coloca una gota de acetocarmín 0.5%, se rompen las anteras y se descartan los tejidos residuales de dichas anteras. Cuidadosamente

se coloca un cubreobjetos sobre la preparación teniendo el cuidado de que no queden burbujas. Se calienta la preparación a una temperatura cercana a 50 °e, luego se corrobora en el microscopio. Solamente las anteras con microspora en estado uninucleado de medio a tardío responden a la inducción de embrioides (puntos verdes) o callo.

Pretratamientos

Las espigas muestreadas serán colocadas en una bolsa plástica y envueltas con papel toalla humedecida con agua destilada estéril. Seguidamente las bolsas o paquetes de espigas se almacenarán en un refrigerador a 4°C por dos a tres días con un pretratamiento en frío. Las espigas pueden ser almacenadas hasta 7 o 10 días sin efectos negativos en su respuesta al cultivo in vitro.

Esterilización

Antes del aislamiento de las anteras, las espigas tratadas con frío son esterilizadas con etanol 80% y cloro comercial al 20% .

Inducción de embrioides

La hoja envolvente o bandera es retirada y las anteras en estado medio a uninucleado tardío son sacadas y plaqueadas en un medio líquido de inducción para inducir embrioides o callos. Las cajas petri con anteras aisladas son selladas con parafilm y colocadas en una incubadora a 26-28°C en oscuridad. Cerca de 25 días más tarde, los embrioides y/o callos son inducidos de las microsporas de dichas anteras.

Regeneración de Plantas

Los embrioides inducidos de las anteras cultivadas son transferidas al medio de regeneración cuando tienen arriba de 1 mm de diámetro. Cerca de 20 embrioides son colocados en cajas Petri de 100 x 15 mm. El cultivo de regeneración es llevado a cabo a temperatura de aproximadamente 25⁰ C y a intensidad de luz de 150

mol/seg. m. Los brotes verdes y las raíces aparecen 10 días más tarde en las plántulas y éstas son transferidas a suelo en los 20 días subsiguientes.

9.5 EVENTOS IMPORTANTES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA

- Visualizar el estado uninucleado de las microsporas.
- Esterilizar las espigas de trigo tratadas previamente con frío.
- En la cámara de flujo laminar aislar las anteras e inocularlas en el medio de cultivo ya preparado.

9.6 PREGUNTAS

- ¿Cuál es la contribución principal del cultivo de anteras en el mejoramiento?
- Haga un esquema donde se integre el cultivo de anteras a un programa de mejoramiento, desde un cruce de parentales deseables hasta la producción comercial de semilla comercial de trigo.

9.7 EVALUACIÓN

Se evaluará en función del éxito de formación de plántulas.