

RAICES ANDINAS

Contribuciones al conocimiento y a la capacitación

I. Aspectos generales y recursos genéticos de las raíces andinas

6

Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas

Andrés Valladolid¹, Raúl Blas, Roberto González¹

El número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma. Nos pueden mostrar las relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia y clarificar el origen de los híbridos naturales y variedades cultivadas. Además, gran parte de las características reproductoras y evolutivas de las especies se explican por el conocimiento de sus rasgos citológicos.

Una propiedad importante de los cromosomas es el hecho de que casi siempre el número de cromosomas en las células es constante, a nivel de individuo y entre todos los individuos de la misma especie. Esta propiedad es sumamente útil en estudios filogenéticos y en la solución de problemas sistemáticos (citotaxonomía) (De la Sota,

¹Centro Internacional de la Papa (CIP).

1982). En las células somáticas se encuentran dos juegos de cromosomas homólogos, cada uno de los cuales proviene de uno de sus progenitores masculino y femenino respectivamente, denominándose a esta condición como diploide. En algunas especies, las células somáticas presentan más de dos juegos de cromosomas, recibiendo el nombre de poliploides. La poliplodización es un proceso, no un evento (de Wet, 1981), y se constituye como el rasgo más conspicuo de la evolución cromosómica en las plantas superiores (Stebbins, 1971). Una proporción grande de las especies de plantas superiores son poliploides. Según Averett (1981), aproximadamente 36% de las angiospermas son poliploides, pero entre 70 y 80% pueden presentar poliploidía en su historia evolucionaria, además, se alcanzan altos niveles de ploidía en varios géneros (Grant, 1986).

Recuento de cromosomas mitóticos

Existen métodos directos e indirectos para estimar el número de cromosomas y consecuentemente del nivel de ploidía de una especie vegetal. La Citometría de Flujo del ADN (Costich *et al.*, 1993), por ejemplo, es un método rápido y directo de conocer la ploidía de una planta a partir de la cantidad de ADN existente en sus células, sin embargo, se necesita de un equipamiento especial. Chong y Ozias-Akins (1992) consideran que el conteo de cromosomas en células meristemáticas es el método inequívoco para la determinación del número de cromosomas y nivel de ploidía de una especie.

Los primeros citólogos desarrollaron métodos basados principalmente en el uso de la parafina y el corte al micrómetro de secciones finas de la punta de la raíz para la observación de cromosomas bajo el microscopio óptico. Esta metodología dio buenos resultados en su tiempo, hasta la aparición de la técnica del aplastado de puntas de raíz conocido como "squash" que consiste en un número de pasos a seguir desde la obtención de raíces, hasta la observación de los cromosomas bajo el microscopio óptico:

Germinación o enraizamiento

Las células de un organismo poseen cromosomas, pero estos sólo son evidentes cuando la célula se encuentra en división mitótica o meiótica. Por eso, para efectuar el conteo de cromosomas mitóticos se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por encontrarse en constante mitosis, poseer núcleos grandes y permanecer indiferenciados (Roth, 1966). Los tejidos meristemáticos localizados en la zona apical de la raíz son los más utilizados en citología para el recuento y análisis de cromosomas mitóticos. Las raíces pueden obtenerse por germinación de las semillas sexuales en placas petri bajo condiciones asépticas, o mediante el enraizamiento de esquejes, brotes u órganos de reserva, en un sustrato apropiado (musgo, perlite, grava, agua corriente).

Determinación de la hora de recolección

Un paso importante previo al pretratamiento es la determinación del índice mitótico, el cual nos permite conocer la hora más apropiada para el tratamiento previo de las raíces (Talledo *et al.*, 1993). Para tal fin se fijan las raíces en la mezcla alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1 v/v) a diferentes horas del día. Después de macerar y teñir las muestras (ver a continuación) se procede a observarlas bajo el microscopio óptico. Se anotarán la frecuencia de interfases, profases, metafases y telofases por cada hora de colección. Luego de sistematizar esta información en forma de cuadros, se puede tener una idea de cual es la mejor hora de colección, es decir aquella donde se encuentre un mayor número de células metafásicas. Como el medio ambiente tiene influencia sobre la duración del ciclo celular, es posible que para cada localidad se obtenga una hora de recolección distinta.

Prefijación o pretratamiento

Es el tratamiento que se realiza a las puntas de raíz con sustancias denominadas inhibidores de mitosis (Colchicina, 8-hidroxiquinolina, 1-bromonaftaleno, bajas temperaturas positivas, etc.) para acumular el mayor número de células metafásicas en el meristemo. En la metafase, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación, se encuentran individualizados y presentan una forma característica que permite diferenciarlos y clasificarlos morfológicamente. Los inhibidores de mitosis actúan sobre el proceso de formación del huso acromático, impidiendo el paso hacia la anafase y causando el acortamiento y dispersión de los cromosomas (Talledo *et al.*, 1993). El huso acromático está formado por microtúbulos que empiezan a crecer desde la profase, hasta llegar a la metafase donde algunos de ellos (en la mitosis) se unen a los cinetocoros del centrómero de los cromosomas, dirigiendo la migración de las cromátides hermanas o fraternales hacia los polos de la célula. Los microtúbulos que conforman el huso acromático están constituidos por dímeros de α , β tubulina.

El crecimiento de los microtúbulos se produce por la adición de subunidades de tubulina (α , β tubulina), al extremo creciente de los microtúbulos. La colchinina bloquea la adición de las subunidades de tubulina a los extremos de los microtúbulos existentes, originando la depolimeración de los mismos y consecuentemente la no formación del huso acromático (Darnell, 1986).

Un paso importante en la estandarización de una metodología para el conteo de cromosomas es la determinación del mejor pretratamiento, para lo cual se tienen que probar diferentes inhibidores de mitosis, diferentes concentraciones, tiempos de exposición y temperaturas de tratamiento.

Fijación

Las raíces prefijadas son luego fijadas con el fin de interrumpir rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además de incrementar la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser

coloreada (Sharma y Sharma, 1991). La conservación de los componentes de la célula viva se garantiza gracias a la transformación de los coloides celulares en geles insolubles más estables (Talledo *et al.*, 1993). Al aislar parte del tejido vegetal, su estructura sufrirá cambios marcados si no se tiene ningún cuidado; por ejemplo, si se le deja al aire libre perderá agua por evaporación y se plasmolizará; puede ser atacada por hongos y bacterias y se disgregará por autodigestión ó "autolisis". Para preservar una sección del tejido se requiere un fluido que no distorsione ni disuelva la estructura celular, elimine bacterias y hongos, mantenga inactivas a las enzimas autocatalíticas, además de modificar el tejido en forma tal que llegue a ser capaz de "resistir" los tratamientos subsecuentes. Tales fluidos son conocidos como fijativos ó fijadores y pueden ser utilizados en forma individual o en mezclas.

Cada uno de los fijativos tiene virtudes y defectos. En la práctica se suele utilizar una mezcla de dos o más fijadores. Una de las mezclas más utilizadas en citología es la de Clarck, que esta formada por alcohol absoluto y ácido acético glacial en diferentes proporciones (3:1, 2:1, 1:1). Individualmente el alcohol absoluto y el ácido acético glacial no son buenos fijativos, pero cada uno compensa los defectos del otro (Baker, 1966). El efecto de contracción celular que causa el etanol, es compensado por el efecto de hinchamiento celular del ácido acético. El etanol fija el citoplasma y el jugo nuclear, mientras que el ácido acético estabiliza las nucleoproteínas.

Maceración

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 así la superposición. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos (celulasas y pectinasas). Entre los primeros, el más importante es el ácido clorhídrico 1 normal que provoca la disolución de las sales pécticas de la lámina media facilitando la separación de las células y el aclaramiento del citoplasma.

Tinción

La estructura y comportamiento de los cromosomas sólo pueden ser analizados después que son visibles bajo el microscopio óptico. Para teñir los cromosomas se utilizan tintes básicos debido a la naturaleza ácida de la cromatina. Los tintes ácidos colorean el citoplasma el cual es predominantemente básico. Las sustancias que son utilizadas como tintes se disuelven en agua en forma de iones coloreados. Estos iones se enlazan química y físicamente a las proteínas, sin perder su color (Sharma y Sharma, 1991; Baker, 1966). Dependiendo de la carga del ión, los tintes pueden ser denominados básicos (cationes) ó ácidos (aniones). Si el tinte puede producir cualquiera de los dos tipos de iones es denominado anfotérico.

Aplastado o squash

Una vez que las puntas de raíz han sido teñidas, se las ubica sobre un porta objeto. Luego de colocar el cubreobjeto sobre la punta de raíz, se dan pequeños golpes sobre éste con la punta de un lápiz con la finalidad de disgregar la punta de raíz. Seguidamente se ejerce presión uniformemente con el pulgar sobre el cubreobjeto para que los cromosomas se dispersen y al hacerse visibles se encuentren en un mismo plano.

Observación

La muestra preparada debe ser analizada bajo un microscopio óptico. Se utiliza inicialmente un aumento de 10X x 10X para buscar células contables, luego a un aumento mayor 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el objetivo de inmersión 10X x 100X para realizar el recuento.

Referencias bibliográficas

- Averett, J. 1981. Polyploidy in plant taxa. Summary. In: Walter H. Lewis (eds.). Poliploidy: Biological relevance. Plenum Press. New York.
- Baker, J. 1966. Cytological Technique. The principles underlying routine methods. Science Paperbacks and Methuen and Co. LTD London.
- Chong, S; P. Ozias-Akins. 1992. Rapid estimation of ploidy levels in vitro regenerated interespecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. *Euphytica* 64: 183-188.
- Costich, D.E.; R.Ortiz, R.; T.R. Meagler; L.P. Brederte. 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 1001-1006
- Darnell, J. 1986. Molecular Cell Biology. Scientific American Books. Inc.
- De la Sota, E.R. 1982 La taxonomía y la revolución en las ciencias biológicas. Secretaría General de la OEA. Serie de Biología, Monografía # 3.
- Grant, V. 1989. Especiación Vegetal. Editorial Limusa. Primera Edición. México D.F.
- Roth, I. 1966. Anatomía de las plantas superiores. Colección Ciencias biológicas. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Sharma, A.; A. Sharma. 1991. Chromosome Techniques. Theory and Practice. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. England.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold (publishers) Ltda. London.
- Talledo, D.; C. Escobar; V. Alleman. 1993. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima, Universidad Ricardo Palma. 141 p.
- Wet de, J.M.J. 1981. Origins of polyploids. In: Polyploidy: Biological relevance. W. Lewis (ed.). Plenum Press. New York.