

METODO RAPIDO PARA OBSERVACION DE MITOSIS EN ALAMO (POPULUS sp.)

VILMA G. DE SOLANES y ALBERTO LOTTI¹

En el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo se está trabajando en la actualidad, y entre otras cosas, en mejoramiento de álamo. Por este motivo, se ha tratado de adaptar un método citológico lo más rápido y eficiente posible que sirva para realizar recuentos y observaciones de cromosomas, dado que los métodos comunes, tanto de preparaciones rápidas como el clásico FEULGEN, no han dado, para este material, los resultados esperados.

En nuestra cátedra se han experimentado prácticamente todos los métodos de coloración, rutinarios en estos tipos de investigaciones, en muy diversos materiales, y con muy pocas excepciones se ha comprobado que la orceína en ácido acético al 45% se comporta como uno de los colorantes más efectivos para la coloración de cromosomas en mitosis. Es por este motivo que resulta sorprendente constatar que en álamo este colorante no llegue siquiera a colorear el núcleo en forma realmente diferenciada.

Material y método

Se utilizaron estacas de los siguientes clones: C.V. "Carolino", C.V. "Amuy" y el híbrido euroamericano C.V. I 455.

Se efectuó el enraizamiento en frascos con agua corriente y a temperatura ambiente, agregándosele un 5% aproximadamente de solución nutritiva mineral sin oligoelementos, dos días antes del comienzo de la toma de muestras.

Para los preparados se tomaron extremos sanos, tanto de raíces principales como de secundarias, no notándose diferencias significativas entre ellas en cuanto a la eficiencia de las preparaciones.

¹ Investigador y profesor respectivamente de la cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo.

Se realizaron diversas pruebas con las siguientes variantes:

- 1) *Colorantes:*
 - a) Orceína al 1% en ácido acético al 45%
 - b) " " " " " " 70%
 - c) Carmín " " " " " " 45%
 - d) " " " " " propiónico al 45%
 - e) Fucsina básica decolorada (método de FEULGENO)
 - f) Orceína al 1% en ácido láctico y propiónico (50 y 50%)¹
- 2) *Pretratamientos:*
 - a) 8—hidroxiquinoleína 0,003 M con aceite castor, 6 horas (5 ml/1 gota)^{2 3}
 - b) 8—hidroxiquinoleína 0,003 M 6 horas.
 - c) Para dicloro benceno en solución saturada 1 hora.
 - d) Testigo sin pretratamiento.
- 3) *Fijadores:*
 - a) Carnoy 3—2—1 (alcohol etílico— cloroformo— ácido acético)
 - b) Carnoy modificado (alcohol 3 — ácido acético 1)
- 4) *Condiciones de fijación:*
 - a) Fijación rápida a 60°C durante 1 hora
 - b) " " lenta: I) 16 horas a temperatura ambiente
II) 24 " " " "
- 5) *Hidrólisis:*
 - a) A la llama con 10% de HCl N en:
 - I) Orceína al 45%
 - II) " " 70%
 - III) Carmín acético al 45%
 - IV) " propiónico al 45%
 - V) orceína lacto — propiónica
 - b) En estufa a 60°C durante 5 minutos en HCl N
 - c) " " " " " 8 " " " "
 - d) " " " " " 12 " " " "
 - e) " " " " " 20 " " " "
 - f) " " " " " 30 " " " "
 - g) " " " " " 45 " " " "
- 6) *Toma de muestra:*
 - a) Por la mañana (entre 10 y 12 horas)
 - b) " " tarde (" 15 y 17 ")
 - c) Con enfriamiento, 3 a 4°C aproximadamente
 - I) 2 horas y 2 horas a temperatura ambiente
 - II) 2 " " 4 " " " "

RESULTADOS

Se hicieron todas las combinaciones posibles entre las diferentes variantes, obteniéndose excelentes resultados con la siguiente combinación: 1d-2d-3a-4a-5c, d, e-6a (ver Fig. 1 y 2). En este caso la muestra fue tomada por la mañana (10 horas aproximadamente). Se cortaron las raíces de 5 mm de largo y una vez lavadas, primero en agua

corriente y luego en agua destilada, se pusieron en fijador Carnoy 3-2-1 durante 1 hora a 60° C. Inmediatamente después se pasaron a HCl N para realizar la hidrólisis a 60° C durante 8, 12 ó 20 minutos, con muy buenos resultados en los tres casos, según el diámetro de las raíces. Luego se levaron con agua destilada y se colocaron sobre una gota de armín propiónico al 45% sobre el porta objetos. Se trabajó con agujas de hierro para lacerar y a la vez incorporar hierro a la coloración.

Los pretratamientos experimentados (2a-b y c) no dieron buenos resultados ya que contrajeron demasiado los cromosomas, los que de por sí en álamo son pequeños, notándose además cierto deterioro en el material nuclear. Con enfriamiento (6c) se pudo observar un efecto similar ya que con el tratamiento I, si bien la concentración de mitosis era mayor, los cromosomas se presentaban alterados y difíciles de contar.

Los distintos métodos de fijación experimentados no se tradujeron en diferencias apreciables aunque la fijación rápida a 60° C demostró una leve ventaja tanto por sus resultados como por el ahorro de tiempo que una fijación de sólo una hora significa.

En cuanto al horario de la toma de muestra, se han obtenido en general mejores preparaciones sacando el material en horas de la mañana ya que el descenso de temperatura nocturno parece frenar las mitosis para luego, al aumentar la temperatura, producirse en mayor cantidad y en forma más pareja, es así como se ha obtenido una gran proporción de metafases, estado ideal para el recuento cromosómico.

RESUMEN

Se ha logrado un buen método, rápido y efectivo, para la observación de mitosis en raicillas de estacas de álamo. Consta de los siguientes pasos:

1) Se toman extremos de raíces de estacas que se han hecho enraizar previamente en agua corriente a la que se le ha agregado solución nutritiva simple, aproximadamente dos días antes de la toma de muestra.

2) Se fijan en Carnoy 3-2-1 durante 1 hora en estufa a 60° C.

3) Se hidrolizan en HCl N a 60° C durante un período de tiempo que puede ir desde los 8 minutos para raíces muy finas, hasta los 20 minutos para las de mayor diámetro.

4) Se realiza la coloración con carmín propiónico al 45%, incorporando hierro con las agujas de laceración.

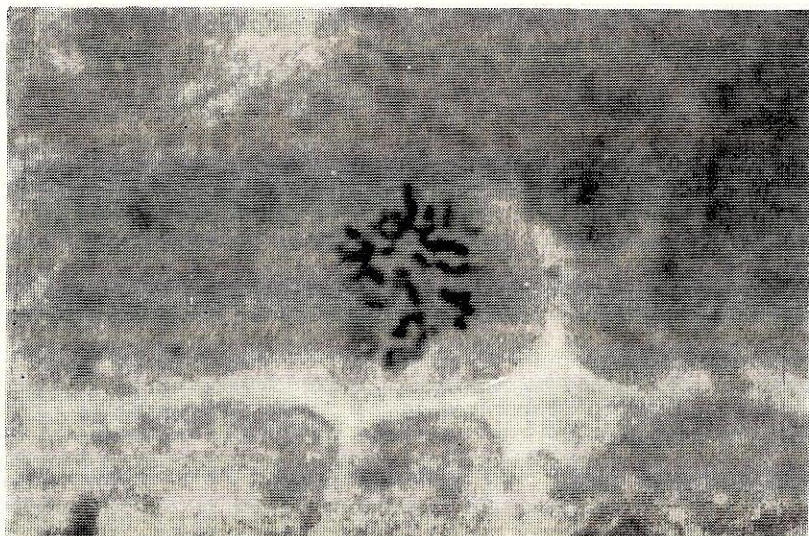


Fig. 1 Cromosomas del híbrido euroamericano C.V. I 455.

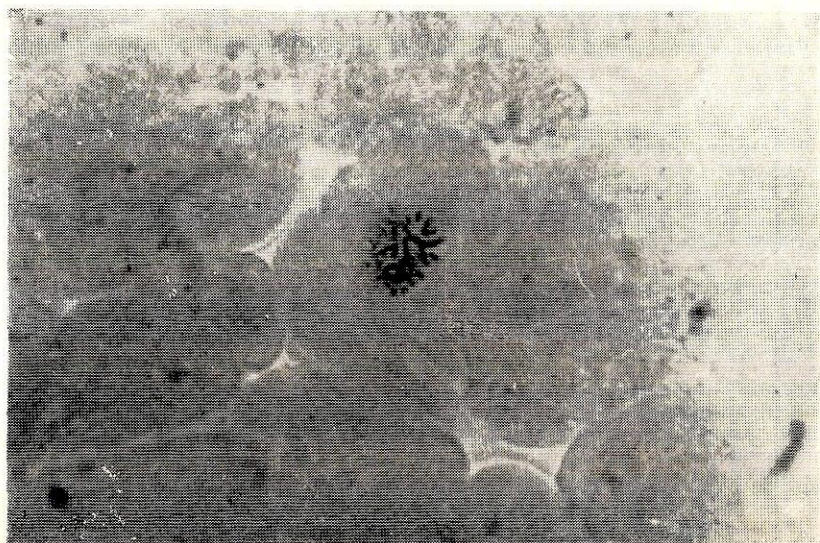


Fig. 2 Cromosomas del C.V. "Carolino".

BIBLIOGRAFIA

- (1) DYER, A. F. - 1963, The use of lacto propionic orcein in rapid squash method for chromosome preparations - *Stain Technology* 38 (2): 85.
- (2) FOZDAR, B. S. and W. J. LIBBY - 1968, Chromosomes of *Sequoia sempervirens*, 8-hidroxiquinoleine- castor oil pretreatment for improving preparation - *Stain Technology* 43 (2): 97.
- (3) SWAMINATHAN, M. S. and NATARAJAN, A. T. - 1957, Chromosome spreading induced by vegetable oils - *Stain Technology* 32 (1): 43.