PN. ABW-372

RESEARCH GUIDE
GUIA DE INVESTIGACION
GUIDE DE RECHERCHE

CIP

Guía de Investigación CIP 10

TECNICAS CITOLOGICAS PARA DETERMINAR EL NUMERO CROMOSOMICO Y LA FERTILIDAD DE LAS PAPAS

1995

Zósimo Huamán

INTERNATIONAL POTATO CENTER (CIP)
CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
CENTRE INTERNATIONAL DE LA POMME DE TERRE (CIP)

Guía de Investigación CIP 10

TECNICAS CITOLOGICAS PARA DETERMINAR EL NUMERO CROMOSOMICO Y LA FERTILIDAD DE LAS PAPAS

1995

Zósimo Huamán

CIP
Apartado 1558
Lima 100, Perú

Ubicación
Av. La Universidad s/n
La Molina, Lima

Fax 435-1570
Tel. 436-6920
Correo-E: cip@cgnet.com

Guias de Investigación CIP

Estas guías describen tecnologías que han sido desarrolladas y usadas por el CIP y los programas nacionales para promover la investigación y el intercambio de información entre científicos. Se actualizan regularmente de acuerdo con los avances científicos.

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 (CIP), Lima, Perú. 18 p.

TECNICAS CITOLOGICAS PARA DETERMINAR EL NUMERO CROMOSOMICO Y LA FERTILIDAD DE LAS PAPAS

1 Introducción
2 Conteo Cromosómico en Células Somáticas
3 Conteo Cromosómico en Células Sexuales
4 Conteo del Número de Cloroplastos en los Estomas de las Hojas
5 Determinación de la Fertilidad del Polen
6 Referencias

1 INTRODUCCION

Las papas cultivadas y silvestres conforman una serie poliploide con el número básico de cromosomas x = 12 con 2n = 2x, 3x, 4x, 5x y 6x. El nivel de ploidía se determina contando el número de cromosomas en las células somáticas y/o sexuales. Sin embargo, en algunos casos se puede tener un estimado rápido del número cromosómico del material en estudio mediante la determinación del número de cloroplastos en los estomas de las hojas.

A continuación se describen algunas técnicas que permiten obtener esa información en forma fácil y rápida. Estas son las técnicas que han dado mejores resultados a través de varios años de aplicación. Esta publicación es una versión actualizada de la primera edición mimeografiada (Huamán, 1974).

2 CONTEO CROMOSOMICO EN CELULAS SOMATICAS

En la actualidad se usan varias técnicas para estudiar los cromosomas en los tejidos de las plantas, pero no todas son apropiadas para plantas que tienen cromosomas pequeños como la papa.

La determinación del número cromosómico en células somáticas de papa se hace más frecuentemente en las puntas de las raíces que son tejidos meristemáticos en crecimiento activo. Sin embargo, se han descrito técnicas para el uso de tejidos de la corola con el mismo propósito (Kessel y Marks, 1970). Esta última técnica presenta algunas dificultades; resulta más fácil el conteo de cromosomas en las puntas de las raíces.

La técnica del aplastamiento ("squash") es la más usada por su simplicidad y rapidez. Sin embargo, las etapas de pretratamiento, fijación y tinción de las células son variables, especialmente en lo que se refiere a los reactivos químicos y tintes que se usan. Estas etapas dependen del estudio que se va a realizar y fundamentalmente del citólogo que las emplea, ya que cada persona tiene sus técnicas preferidas o usa alguna variación de una técnica de aplicación general.

A continuación se describen los principios básicos para la aplicación de estas técnicas.

A. Recolección de las puntas de raíces

Es muy difícil recolectar las puntas de las raíces de plantas extraídas directamente del campo, por lo tanto es recomendable sembrar tubérculos o hacer germinar semillas de las plantas cuyo número cromosómico se desea conocer.

Siembre tubérculos con brotes en macetas pequeñas que contienen vermiculita, compost liviano o musgo; mantenga las macetas con buena humedad. En una o dos semanas se podrán obtener raíces en desarrollo activo, las cuales deben recolectarse cuando las plantas han alcanzado unos 5 cm de altura. A medida que la planta crece,

las preparaciones que se obtienen de sus raíces son cada vez menos apropiadas para un fácil y rápido conteo de los cromosomas.

Riegue las macetas unas horas antes de recolectar las raíces; esto puede hacerse alrededor de las 10 a.m. La hora de recolección de la muestra es particularmente crítica en días calurosos. Corte aproximadamente 5 mm de la parte terminal o puntas de las raíces que tienen un color blanco hialino (Figura 1) y luego colóquelas en la solución que se usa como prefijador.

Figura 1

B. Prefijación

El pretratamiento mediante el uso de ciertos productos químicos como el alfa-bromonaftaleno, 8-hidroxiquinolina, o el uso de agua a 0°C, permite la contracción de los cromosomas durante la profase, facilitando así el conteo

cromosómico. Es importante tener en cuenta que tanto los recipientes de vidrio como las soluciones que se usan en el laboratorio deben estar libres de detergentes y otros productos químicos nocivos.

C. Fijación

Para obtener una buena fijación del núcleo y de los cromosomas, así como para mantener la integridad estructural del citoplasma y de las células en general, se emplean fijadores deshidratantes. Los más usados son mezclas de alcohol etílico con ácido acético, propiónico o láctico.

Es muy importante que el fijador sea preparado cada vez que se usa, debido a que éste reacciona rápidamente a temperatura ambiental, formando un éster, y por lo tanto no tiene el mismo efecto fijador.

D. Hidrólisis

El objeto de la hidrólisis es romper las peptinas que unen las células y facilitar el aplastamiento.

Generalmente se usa HCl 1 N a una temperatura de 60°C. Una práctica que da buenos resultados es calentar el ácido a 60°C antes de colocar las raíces que se van a hidrolizar.

E. Aplastamiento

Según la técnica que se use, las raíces se tiñen por un determinado tiempo antes de hacer la preparación citológica; por ejemplo, cuando se usa el colorante lacto-propiónico-orceína. En otros casos la raíz es teñida al momento de hacer la preparación citológica; por ejemplo, cuando se usa carmín-propiónico.

Para el aplastamiento, coloque de una a tres raíces sobre un portaobjeto y corte la punta (aproximadamente 1 mm) que tendrá un color más oscuro. Agregue una gota de colorante fresco y descarte el resto de las raíces (Figura 2). Coloque un cubreobjeto limpio sobre la gota de líquido en la que se encuentra el tejido, sujételo

cuidadosamente y golpee suavemente con un lápiz para extender el tejido (Figura 3). Caliente el portaobjeto pasándolo 2 ó 3 veces sobre la llama de un mechero de alcohol e inmediatamente inviértalo sobre un papel filtro, de tal manera

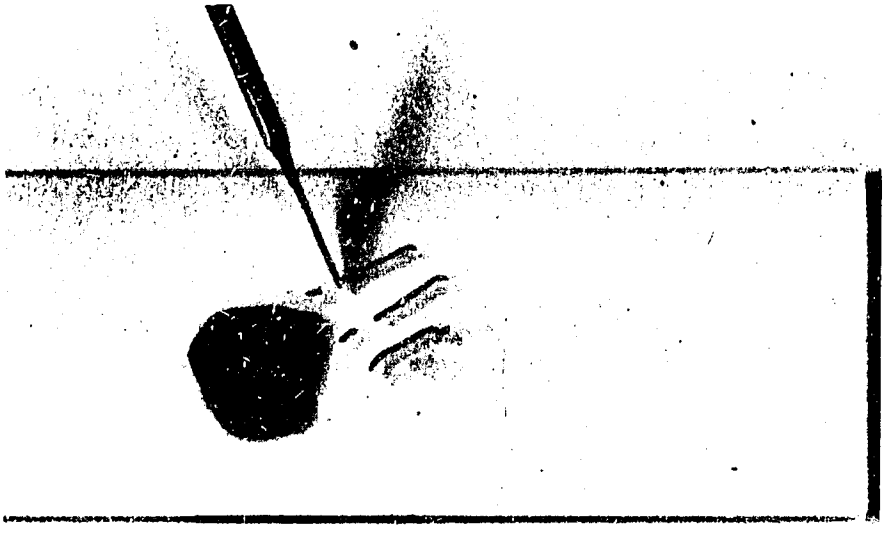

Figura 2

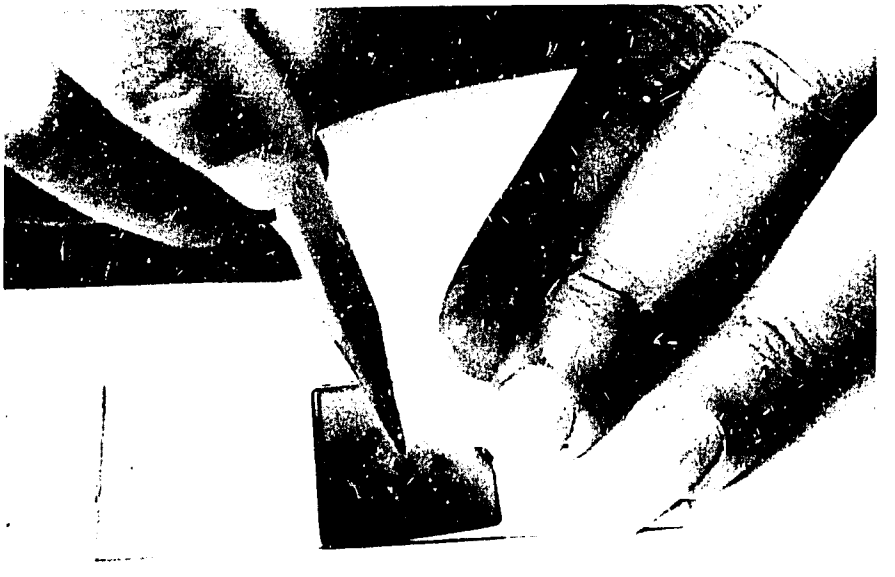

Figura 3

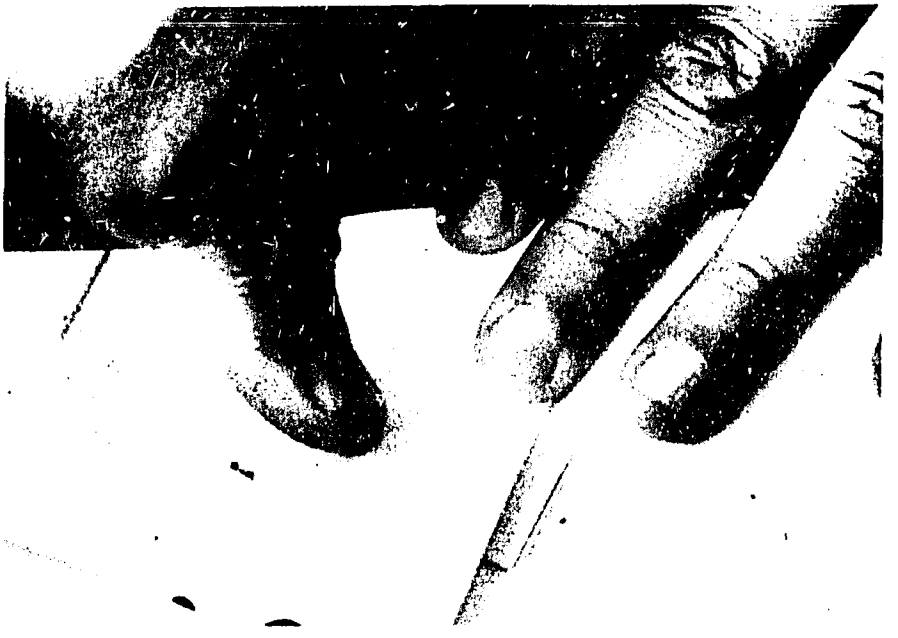

Figura 4

que el cubreobjeto quede en contacto con el papel. Coloque otro papel de filtro sobre el portaobjeto y presiónelo fuertemente con el pulgar para aplanar las células (Figura 4). Evite cualquier movimiento lateral del portaobjeto. Finalmente, vuelva a pasar la preparación por la llama del mechero y obsérvela bajo el microscopio.

Procedimiento 1: Método con Lacto-Propiónico-Orceína

Este método ha sido desarrollado por Tarn (1967). Su ventaja es que no requiere muchos reactivos químicos y, además, las muestras de raíces se pueden almacenar en el fijador por varias semanas en refrigeración sin que haya deterioro de los tejidos.

1. Coloque las puntas de las raíces en agua a 0°C y manténgalas a esta temperatura hasta el día siguiente. Esto se consigue usando una botella térmica con agua y abundante hielo, en la cual se colocan los frasquitos con las raíces.

   Una alternativa que ha dado muy buenos resultados es el uso de una solución del insecticida piretroide Ambush 50EC (carboxilato ciclopropano -3-fenoxibencilo (+-) cis trans-2,2-dimetilo 3-(2,2-diclorovinilo)) a una concentración de 100 ppm a pH 5.8 ajustado con HCl 1N. Coloque las muestras

en un refrigerador a 4°C por 24 horas. Se ha informado que este pretratamiento produce una mejor visibilidad de los cromosomas que el agua helada o la 8-hidroxiquinolina 0.02M (Watanabe y Orrillo, 1993).

2. Pase los tejidos a la solución fijadora también a 0°C y mantenga las muestras en refrigeración (4°C) por un mínimo de 24 horas. A mayor tiempo en refrigeración, mejores serán los resultados.

   La solución fijadora se prepara con 99 partes de alcohol etílico al 30% y una parte de ácido láctico. Es recomendable guardar el alcohol en el congelador por unas horas antes de preparar el fijador. La mezcla del alcohol y el ácido se hace minutos antes de usarla.

3. Hidrolice las muestras con HCl 1N en una estufa a 60°C por 6 a 8 minutos. El volumen de ácido necesario es aproximadamente 2 ml por muestra y es recomendable calentarlo a 60°C por 8-10 minutos antes de colocar las raíces y proceder con la hidrólisis.

4. Lave con agua destilada.

5. Tiña con el colorante lacto-propiónico-orceína por un mínimo de dos horas.

   Este tinte se prepara de la siguiente manera: Disuelva 1 g de orceína natural en una mezcla de 23 ml de ácido láctico y 23 ml de ácido propiónico a temperatura ambiental. Complete a 100 ml con agua destilada. Mezcle bien y filtre (Haskell y Wills, 1968).

6. Aplaste la punta de la raíz en una gota de ácido acético o propiónico al 45%. También se puede usar una gota de lacto-propiónico-orceína. Si se quiere abreviar este método, se puede omitir el paso 2. Sin embargo, la hidrólisis debe durar 8 a 10 minutos.

Procedimiento 2: Método con Carmín-Propiónico

Esta es otra técnica ampliamente usada en tejidos de papa.

1. Recolecte las puntas de las raíces en una solución de 8-hidroxiquinolina 0.002 M (0.29 g/l de agua destilada). Mantenga las muestras a temperatura ambiental por 5 a 6 horas.

2. Coloque la muestra en la solución fijadora por un mínimo de 12 horas a temperatura ambiental. Las muestras pueden mantenerse en esta solución por varias semanas.

   El fijador se prepara mezclando tres partes de alcohol etílico de 95% y una parte de ácido propiónico al 45%.

3. Hidrolice en HCl 1N por 6 a 8 minutos a 60°C.

4. Lave con agua destilada.

5. Aplaste la punta de la raíz sobre una gota de carmín-propiónico al 1%.

   El tinte carmín-propiónico se prepara con 45 ml de ácido propiónico y 55 ml de agua destilada. Caliente hasta que hierva y añada 1 g de carmín. Mezcle, filtre y añada 5 gotas de una solución saturada de acetato férrico en 45% de ácido propiónico. Déjelo reposar una semana antes de volverlo a filtrar. Es importante no usar acetato férrico en exceso porque puede producir precipitación del carmín.

3 CONTEO CROMOSOMICO EN CELULAS SEXUALES

Para este propósito se usan células madres de polen que se obtienen de los botones florales.

El método que a continuación se describe ha sido proporcionado por el Dr. F. Haynes de la Universidad del Estado de Carolina del Norte (EE.UU.).

Procedimiento

1. Recolecte botones florales en diferentes estados de desarrollo. Esto se logra recolectando la mayoría de los botones florales de una inflorescencia. Con la práctica se determinará el tamaño apropiado del botón floral que se debe recolectar.

2. Abra suavemente la punta del botón de tal manera que el fijador penetre. Colóquelo dentro de frasquitos de vidrio que contienen el fijador de Carnoy modificado por 24 a 48 horas a temperatura ambiental. Puede mantenerse en refrigeración por varias semanas.

   El fijador de Carnoy modificado se prepara mezclando tres partes de alcohol absoluto y una parte de una solución saturada de acetato férrico en ácido propiónico. Para preparar esta última solución, se añaden 10 g de acetato férrico a 100 ml de ácido propiónico puro. Mezcle bien y deje sedimentar hasta el día siguiente. Decante cuidadosamente la solución, dejando todo el precipitado en el recipiente.

   Es preferible preparar el fijador una vez por semana.

3. Coloque un botón floral en un vidrio de reloj que contiene el fijador y diseccione cuidadosamente las anteras. Use agujas de disección viejas y nunca use la misma aguja en el tinte.

4. Enjuague con ácido propiónico al 45%. Esta es una etapa esencial para obtener los mejores resultados. Coloque las anteras en otro vidrio de reloj que contiene ácido propiónico al 45% por varios minutos.

5. Con una pinza de plástico transfiera la antera a un portaobjeto limpio. Seque con papel filtro los residuos de ácido propiónico y añada rápidamente una gota de carmín propiónico.

6. Corte los extremos de la antera y presiónela con una aguja de disección limpia. Remueva luego todos los restos de la antera. Es esencial usar agujas de disección relativamente nuevas para evitar que el tinte se oscurezca. Limpie las agujas frecuentemente y no las deje con restos de tinte. Esto previene la corrosión.

7. Coloque un cubreobjeto limpio sobre la gota de tinte y golpéelo suavemente con el borrador de un lápiz.

8. Pase el portaobjeto dos o tres veces a través de la llama de un mechero de alcohol e inmediatamente inviértala sobre un papel filtro y presione fuertemente con el pulgar.

9. Examine la preparación al microscopio.

   Para determinaciones rápidas se pueden omitir los pasos 2 y 3. Una vez obtenida la epidermis de los folíolos, colóquela en el portaobjeto sobre una gota de la solución KI-I. Tape con el cubreobjeto y observe al microscopio.

4 CONTEO DEL NUMERO DE CLOROPLASTOS EN LOS ESTOMAS DE LAS HOJAS

Procedimiento

1. Recolecte folíolos terminales de varias hojas de la misma planta.

2. Sumérjalos en alcohol etílico al 70% por un hora.

3. Seque un folíolo con papel filtro.

4. Coloque una parte del folíolo en un vidrio de reloj y añada una o dos gotas de una solución de yoduro de potasio y yodo (KI-I) por cinco minutos. Luego corte con los dedos el folíolo por el envés en las zonas próximas a las nervaduras para obtener tejidos epidérmicos.

   La solución KI-I se prepara mezclando 1 g de yoduro de potasio, 1 g de yodo y 100 ml de alcohol al 80%.

5. Corte la epidermis sobre un portaobjeto y añada una gota de glicerina. Coloque el cubreobjeto y observe al microscopio.

6. El conteo de cloroplastos se realiza en las células guardia de los estomas. Su número nos dará una indicación del nivel de ploidía, según la siguiente escala:

Ploidía	Número de cloroplastos por célula guardia
2X	7 - 8
3X*	9 - 11
4X	12 - 14
5X**	15 - 16

* Determinaciones hechas en *S. juzepczukii* (2n = 36)

** Determinaciones hechas en *S. curtilobum* (2n = 60)

Para determinaciones rápidas se pueden omitir los pasos 2 y 3. Una vez obtenida la epidermis de los folíolos, colóquela en el portaobjeto sobre una gota de la solución KI-I. Tape con el cubreobjeto y observe al microscopio.

Procedimiento

1. Recolecte flores recientemente abiertas.

2. Coloque dos anteras sobre un portaobjetos. Añada una gota de gelatina de aceto-carmín glicerol. Corte los dos extremos de las anteras y presiónelos con una aguja de disección. Remueva los restos de las anteras. Coloque el cubreobjeto y déjelo por unas horas para que la gelatina solidifique y los granos de polen se tiñan.

   Otra forma de obtener el polen es golpeando varias veces las anteras con una aguja de disección sobre un portaobjeto. Coloque una gota de la gelatina sobre el polen. Tape con el cubreobjeto.

   La gelatina de aceto-carmín glicerol se prepara en dos etapas (Marks, 1954).

   a. Gelatina carmín glicerol: Añada 0.25 g de carmín finamente molido a 50 ml de gelatina glicerol de Brandt derretida. Mezcle completamente hasta obtener una suspensión homogénea de las partículas de carmín en la gelatina cuando enfríe. Esta gelatina concentrada es apropiada para almacenamiento.

   La gelatina glicerol de Brandt se prepara humedeciendo 5 g de gelatina en aproximadamente 75 a 100 ml de agua por tres horas. Decante el exceso de agua y caliente la gelatina hasta que se derrita. Mezcle en la proporción de 100 ml de gelatina derretida con 150 ml de glicerol. Añada unas gotas de ácido carbólico y mientras esté todavía caliente filtre a través de fibra de vidrio (Haskell y Wills, 1968).

   b. Gelatina aceto-carmín: Añada 40 ml de ácido acético al 45% a 20 ml de gelatina carmín glicerol. Hierva lentamente hasta que la solución esté clara y todo el carmín esté disuelto. Esto puede ser verificado examinando una gota en el microscopio. Finalmente, añada 4 ml de una solución saturada de acetato férrico en ácido acético al 45%.

3. Observe bajo el microscopio. Dos clases de polen serán claramente evidentes: granos redondos y teñidos que se clasifican como granos viables o fértiles; y granos pequeños, encogidos, deformes y poco teñidos que se clasifican como granos no viables o estériles. Determine el porcentaje de granos fértiles.

6 REFERENCIAS

HASKELL, G y A.B. WILLS. 1968. Primer of chromosome practice. Oliver and Boyd. Londres. 150 p.

HUAMAN, Z. 1974. Algunas técnicas citológicas para determinar el número cromosómico de las papas. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 10 p. (Edición mimeografiada).

KESSEL, R. y G.E. MARKS. 1970. Making chromosome counts in *Solanum* using corolla tissue. Potato Res. 13:151-153.

MARKS, G.E. 1954. An aceto-carmine glycerol jelly for use in pollen-fertility counts. Stain Technology 29(5):277.

TARN, R. 1967. The origin of the polyploid species of *Solanum* Sect. Tuberarium. Ph.D. Thesis. Birmingham University.

WATANABE, K.N. y M. ORRILLO. 1993. An alternative pretreatment method for mitotic chromosome observation in potatoes. Am. Potato J. 70:543-548.

Impreso en la Unidad de Comunicación, Centro Internacional de la Papa (CIP), marzo 1995
Tirada: 600 ejemplares
Fotos: Raymundo Medina y Matilde Orrillo