

Determinación de una Metodología a Nivel Citogenético Aplicada a *Brugmansia Sanguínea*

CECILIA ALVARADO DE CORAL¹, BERTHA COBA DE GUTIERREZ²

RESUMEN. Teniendo en cuenta diferentes factores ambientales tales como: Temperatura, humedad, hora, así como el tamaño de los meristemos radicales y botones florales se logró establecer una metodología a nivel citogenético aplicable, con pequeñas variaciones, a cualquier tipo de planta. Se obtuvieron preparaciones de células en estado metafásico cuyos cromosomas presentaron una buena diferenciación permitiendo evidenciar la posición del centrómero y así lograr un cariotipo e ideograma real en *Brugmansia sanguínea*.

ABSTRACT. Working with *Brugmansia sanguinea* and bearing in mind environmental factors such as: Temperature, humidity time and the size of radical meristemes and floral buds, a cytogenetical methodology was set up, usable with small variations in any kind of plants in order to get clear cut metaphasic stages with well differentiated chromosomes where centromeres are easily located making easier to elaborate caryotyphen and ideograms.

INTRODUCCION

Brugmansia sanguinea es un arbusto que alcanza una altura hasta 3,50 metros muy ramificado desde la base. Se reproduce vegetativamente formando clones, de inflorescencia monocacial, con flores péndulas, abiertas durante el día con antesis de cuatro a seis días. Cálz en forma de espátula rodeando la parte basal de la corola, que puede faltar o estar completo o formando una estructura persistente, como una cáscara

alrededor del fruto maduro. Este es péndulo largo nacido sobre pedicelos elongados, bicarpelado y bilocular debido a la carencia de un septo, indehiscente con pericarpio liso y desprotegido. Semillas grandes cubiertas por una envoltura seca y gruesa desprovistas de carúncula, (Lockwood, 1971). Es una planta de importancia farmacológica en la preparación de sustancias medicinales psicotrópicas.

Mediante el estudio cariológico de un organismo se logra determinar el número, tamaño y morfología de los cromosomas. En células animales los cromosomas en estado metafásico son grandes y no presentan dificultades de manejo con las técnicas usuales de tinción; en cambio en plantas que tienen cromosomas pequeños, se hace más difícil la obtención de buenas preparaciones para conteo y elaboración de cariotipos (Nai Chaw y Sun Sadanaga, 1986). La presencia de pared celular es otro obstáculo que limita la obtención de células con cromosomas lo suficientemente separados, que permitan un conteo fácil e identificación de la morfología de los pares de cromosomas para elaborar el cariotipo (Murata, 1983).

En el presente trabajo se desarrolló una metodología mediante la cual se obtuvieron preparaciones con células en metafase cuyos cromosomas muestran la posición de los centrómeros, forma y longitud de cromátidas para poderlos distinguir y diferenciar morfológicamente. Se tuvo en cuenta los diferentes factores meteorológicos de control del medio ambiente: Temperatura, humedad y hora. Además del tamaño de los meristemos radicales y botones florales.

MATERIALES Y METODOS

El material de *Brugmansia sanguinea* fue recolectado en los jardines del Instituto de

¹ Profesor Asistente, Bacteriología y Ciencias Naturales - Facultad de Ciencias - Depto. de Biología, Universidad Nacional.

² Bacterióloga - Facultad de Ciencias - Depto. de Biología, Universidad Nacional.

Ciencias Naturales de la Universidad Nacional. Se tomaron frutos maduros y botones florales de los cuales se obtuvieron meristemas radicales y anteras que se procesaron en el laboratorio de Investigación de Morfología Vegetal del Departamento de Biología.

Los meristemas radicales se obtuvieron de semillas, germinadas en cámara húmeda sobre papel de filtro, previa esterilización con hipoclorito de Sodio al 5% por tres minutos y lavado con agua destilada esterilizada.

La temperatura se midió con termómetro de Mercurio corriente (°C).

Se colectaron las muestras a las 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 horas, en diversas oportunidades, con el fin de seleccionar la hora más apropiada para obtener mejores preparaciones.

Los botones florales y raíces obtenidas en cada muestreo se midieron con una regla graduada en cm. para elegir las dimensiones óptimas.

Por simple observación se calculó el grado de insolación en el momento de cada colecta.

A todo este material se le aplicó la siguiente metodología:

1. Se usaron pretratamientos con el fin de obtener células en metafase utilizando sustancias químicas para la inhibición del huso acromático, tales como:

a. Para diclorobenceno en solución saturada, 1 hora.

b. 8 hidroxil - quinolina 0.002 M durante 1 hora.

2. Fijación con formol, ácido acético, alcohol (FAA).

3. Hidrólisis con HCl 1 N, durante 15 a 30 minutos.

4. Lavado con agua destilada.

5. Tinción con orceína lactopropiónica.

6. Aplastamiento entre porta y cubre objeto, previo calentamiento suave con mechero de alcohol.

Para la identificación de la morfología de los cromosomas, se siguieron las normas propuestas por Akerman (1971).

Del total de preparaciones obtenidas fueron seleccionadas las que se consideraron mejores, debido a su claridad para distinguir los cromosomas y diferenciar su morfología. Este material fue fotografiado con fotomi-

croscopio Laboval Carl Zeiss Jena ocular 10 x objetivo 100 x 1.25 película Kodalitte Asa 8 con papel de alto contraste.

RESULTADOS

Las mediciones de temperatura arrojaron valores entre 7°C y 18°C. Al procesar el material obtenido a las diferentes temperaturas, se encontró que las mejores preparaciones se lograron con 18°C.

En cuanto a la hora del día, más apropiada para realizar la colecta, se determinó que los resultados óptimos provinieron del material obtenido entre las 12 1/2 y 2 P.M.

La medición de raíces dio valores entre 0.2 y 3 cm, evidenciándose que los tamaños muy pequeños, inferiores a 0.5 cm como así mismo los muy grandes, superiores a 2 cm, no son los más apropiados para obtener buenas preparaciones.

Los capullos florales midieron desde 0.5 a 4 cm de longitud; los resultados óptimos se lograron con tamaños entre 2 y 3 cm.

Se observó que las colectas realizadas en días grises, fríos y lluviosos, proporcionan material de bajo rendimiento. En cambio las muestras obtenidas en horas de alta insolación, brindaron los mejores resultados.

Se obtuvieron preparaciones que contenían células en metafase, lo que permitió el conteo de cromosomas, a la vez diferenciar la forma y el tamaño de los mismos.

La metodología usada ofrece una diferenciación de color entre el citoplasma y el cromosoma, permitiendo observar claramente la posición del centrómero, así como las constricciones (Figura 1).

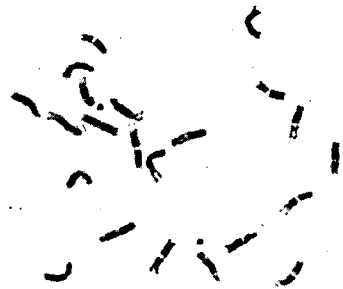


Figura 1. Cariotipo de *Brugmansia sanguinea* de meristemo de raíz en estado metafásico en el que $2n = 24$.

Cuadro 1. Mediciones cromosómicas, valor r y posición del centrómero en *Brugmansia sanguinea*.

	L. Total	B. Largo	B. Corto	Valor r Lar/corto	Posición centrómero
1	1-0480	0260	0210	1,23	S M*
	2-0470	0260	0200	1,30	S M
2	3-0400	0200	0180	1,11	M
	4-0400	0200	0180	1,11	M
3	5-0400	0200	0180	1,11	M
	6-0400	0200	0180	1,11	M
4	7-0400	0200	0180	1,11	M
	8-0400	0200	0180	1,11	M
5	9-0400	0200	0180	1,11	M
	10-0400	0200	0180	1,11	M
6	11-0400	0200	0180	1,11	M
	12-0400	0200	0170	1,17	M
7	13-0400	0200	0180	1,11	M
	14-0380	0190	0180	1,05	M
8	15-0400	0200	0180	1,11	M
	16-0400	0200	0180	1,11	M
9	17-0380	0220	0140	1,57	S M
	18-0400	0220	0160	1,37	S M
10	19-0400	0200	0180	1,11	M
	20-0390	0200	0180	1,1*	M
11	21-0380	0200	0170	1,17	M
	22-0390	0200	0180	1,11	M
12	23-0400	0200	0170	1,11	M
	24-0400	0200	0180	1,11	M

* Metacéntrico = M - r Valores 1,0 a 1,20; Submetacéntrico = SM - r Valores 1,21 a 2,40; Acrocéntrico = A - r Valores 2,41 o más (basados en Ackerman 1971).

Se comprobó que *Brugmansia sanguinea* tiene 24 cromosomas en sus células somáticas, como lo citan Darlington y Lacour (1960).

De acuerdo con Akerman (1971) se encontraron 10 pares de cromosomas metacéntricos y solamente 2 pares de cromosomas submetacéntricos, 1 par de ellos con satélite en el brazo corto. La mayoría de los pares de cromosomas presentan bifurcaciones en uno de los extremos de los brazos (Cuadro 1 y Figura 2).



Figura 2. Ideograma de *Brugmansia sanguinea* elaborado de los cromosomas en metafase de la figura 1.

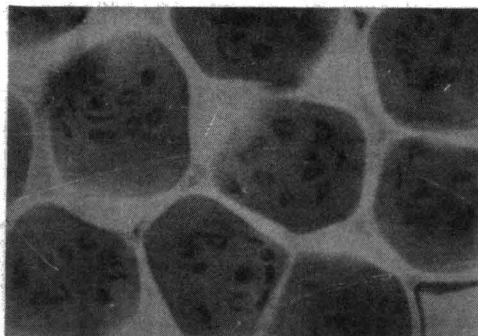


Figura 3. Meiosis de *Brugmansia sanguinea* en anteras mostrando n = 12 cromosomas.



Figura 4. Meiosis en estado de diacinesis en anteras de *Brugmansia sanguinea*.

Los mejores resultados de meiosis en anteras, se obtuvieron a partir de botones florales los que permitieron observar anteras con células haploides en metafase 1 n = 12 (Figura 3). Además se observaron células en estado de diacinesis (Figura 4).

CONCLUSIONES

La mejor hora para coleccionar los meristemas radicales, así como los botones florales de *Brugmansia sanguinea* está entre las 12 1/2 a 2 p.m. Con relación al tamaño de las raíces para procesarlas deben tener de 0.5 a 2.0 centímetros de longitud. Los botones florales, de 2.0 a 3.0 centímetros de longitud.

La recolección debe hacerse preferiblemente en días soleados.

El obtener cromosomas diferenciados y separados es definitivo para lograr el cariotipo con mediciones exactas, diferenciar la morfología y característica de cada uno de los pares, lo mismo que la posición del centrómero.

Esta metodología sería aplicable a todo tipo de plantas, con pequeñas variaciones de tiempo para cada uno de ellos, logrando resultados similares a los obtenidos en *Brugmansia sanguinea*.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al CINDEC por el apoyo económico que hizo posible esta investigación y a los profesores MARTHA BUENO y JORGE COGUA por su colaboración en las fotografías.

LITERATURA CITADA

1. Ackerman, W.L. 1971. Genetic and cytological studies with *Camellia* and related genera. Technical Bulletin No. 1427, Agricultural Research Service, U.S.D.A.
2. Darlington, C.D.; Wille, A.P. 1961. Chromosome Atlas of Flowering plants 2da. ed. Londres, University Press, Aberddden, p. 303.
3. Darlington, C.D.; Lacour, L.F. 1960. The Handling of Chromosomes, Londres Unwin Brothers, Limited.
4. Hancock, B.L. 1942. A schedule for chromosome counts in some plants with small chromosomes, Staintech, v. 17 p. 79-83.
5. Lockwood, T.E. 1973. Renerie Recognition of *Brugmansia*. Botanical Museum leaflets, v. 23, (6):245-281.
6. Johansen, D.A. 1940. Plan Microtechnique, Mc Graw Hill, New York and London.
7. Kurata, N. and Omura T. 1978. Karyotype analysis in rice. I. A new method for identifying all chromosome pairs Japan J. Genet 53: 251-255.
8. Mouras, A. Salesses G. and Lutez, 1978. Sur l' utilisation des protoplastes en cytologie: a melioration d'une methode recente en vue de l'identification des chromosomes mitotiques generes *Nicotiana* et *Prunus*, Caryologie 31: 117-127.
9. Murata, M. 1983. Staining Air Dried Protoplasts for study of plant chromosomes, Stain technology 58:(2):101-106.
10. Nai Chaw, Sun Sadanaga, K. 1968. Handling of oat chromosomes. Crop Science 8:767-769.
11. Ortega, V.A. 1974. Estudio Biosistemático de cinco especies de *Datura* existentes en el Ecuador. Ciencia y Naturaleza. Revista del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Central. Quito, Ecuador. 15(1):20-27.
12. Sass, J.E. 1966. Botanical Microtechnique.
13. Snow, R. 1963. Alcoholic Hydrochloric Acid-Carmine as a Stain for chromosomes in squash preparation. Stain technology 38:9-13.
14. Williams, M. and T.R. Dudley 1984. Chromosome count for *Hippeastrum Iguazuianum*, Taxon 33(2):271-275.