

Optimización de una técnica para la observación de cromosomas mitóticos de especies de *Passiflora* L.

Claudia Pereira S.¹, Ana I. Honfi², Norma Deginani³, María S. Ferrucci⁴

¹Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

²Laboratorio de Citogenética Vegetal, Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal, Instituto de Biología Subtropical (IBS, UNaM CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

³Instituto de Botánica *Darwinion*, Labardén 200, Casilla de Correo 22, B1642HYD, San Isidro, Argentina.

⁴Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), C.C. 209, 3400 Corrientes, Argentina.
E mail del autor: claudinha_7@hotmail.com

Optimización de una técnica para la observación de cromosomas mitóticos de especies de *Passiflora* L. La necesidad de optimización de una técnica que permita la visualización de cromosomas mitóticos surgió de resultados poco satisfactorios de otros protocolos de coloración ensayados, tales como técnicas de tinción con ácido acético 45% para observación con microscopio de contraste de fases, hematoxilina acética, orceína acética 2% y carmín acético 2% (sin mordiente). El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica para la observación reiterada de cromosomas mitóticos en raicillas de especies del género *Passiflora*.

Palabras claves: *Passiflora* – mitosis - cromosomas

An improved technique for the observation of mitotic chromosomes in *Passiflora* L. species.

The need for the optimization a technique that allows the visualization of mitotic chromosomes emerged from unsatisfactory results with other tested staining protocols, such as staining techniques with acetic acid 45% for observation with the phase contrast microscope, acetic hematoxylin, acetorcein 2%, and acetic carmine 2% (without mordant). The purpose of this work was to develop a feasible technique for repeated observation of mitotic chromosomes in rootlets of species of the genus *Passiflora*.

Key words: *Passiflora* – mitosis - chromosomes

INTRODUCCIÓN

La familia Passifloraceae está dividida en dos tribus *Paropsieae* e *Passiflorieae*; compuesta actualmente por 18 géneros (Deginani, 1999, 2001; Pérez-Cortez et al. 2009). *Passiflora* L. es uno de los más grandes de la familia, con aproximadamente 530 especies. Las especies de *Passiflora* constituyen una parte visible de la flora neotropical, presentan una amplia distribución, desde el sur de Argentina hasta el sur de Estados Unidos (Hansen et al.

2006), sin embargo es en América del Sur donde ocurre la mayor concentración de especies, particularmente en la zona andina (Deginani, 2001).

La información cariológica de las especies de *Passiflora* es de interés para el análisis evolutivo y el mejoramiento genético, como también para caracterizar las colecciones de germoplasma y promover su conservación a largo plazo. Aproximadamente el 30% de las especies de *Passiflora* posee información sobre el número cromosómico (Soares-Scott et al.

2005), el género registra especies diploides y poliploides.

La observación de cromosomas mitóticos en la mayoría de las plantas se consigue con la aplicación de métodos y protocolos convencionales muy generalizados. De acuerdo al material a estudiar, se toman decisiones respecto del tejido que se utilizará para conseguir numerosas divisiones mitóticas y cuál será el método más adecuado para visualizar los cromosomas; se destaca que la colecta y preparación del material es fundamental. En plantas, la mayor cantidad de células mitóticas se encuentra generalmente en el tejido meristemático, tejido encontrado en diferentes órganos vegetales que se caracteriza por presentar células indiferenciadas. Para el análisis cromosómico mitótico el meristema más adecuado es el radical, debido principalmente al volumen histológico y porque absorben más fácilmente las soluciones externas, aspecto muy importante cuando se usan anti-mitóticos.

La obtención de raíces para el análisis cromosómico puede realizarse a partir de semillas, bulbos, tallos y plantas adultas cultivadas en macetas (Honfi et al. 1990; Hojsgaard et al. 2009; Daviña et al. 2009). Si no se cuenta con raíces apropiadas, pueden ser utilizados otros meristemas, como por ejemplo, la parte más joven y central de los brotes foliares en crecimiento, anteras y paredes del ovario de los botones florales menores y varios otros órganos de crecimiento activo (zarcillos, pétalos, embriones, óvulos, etc.) (Daviña com. pers. 2013). Otro aspecto a tener en cuenta es el

horario en el que se seleccionan las raicillas, dado que en la mayoría de las especies, los horarios matutinos dan buenos resultados.

En *Passiflora*, los estudios de cromosomas mitóticos son relativamente pocos y diversos son los números básicos propuestos para las especies conocidas del género, desde $x = 3$ ó 6 (Storey, 1950), hasta $n = 12$ y $n = 6$ (De Melo and Guerra, 2003). Además, en el género *Passiflora*, es importante distinguir intra-específicamente el nivel de ploidía porque se han encontrado diversos citotipos dentro de un mismo taxón. Dichas series poliploides intraespecíficas expresadas en diversos citotipos, se han encontrado por ejemplo, en *P. misera* Kunth con $2n = 12, 36 (2x, 4x)$; *P. suberosa* L. con $2n = 12, 24, 36 (2x, 4x, 6x)$ (De Melo et al. 2001).

El objetivo del presente trabajo es optimizar un protocolo citogenético para la observación de cromosomas mitóticos que resulte repetible en especies del género *Passiflora*.

METODOLOGÍA

Material de estudio

Los materiales estudiados fueron raicillas de *Passiflora edulis* Sims, provenientes del Distrito de Félix Pérez Cardozo, Dpto. de Guairá - Paraguay; ubicado a $25^{\circ} 45' 00''$ S y $56^{\circ} 25' 60''$ O (Pereira 26, 32, 33, 34, 35). Los ejemplares testigo se colectaron con duplicados y quedaron depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción (FACEN).



Figura 1: *Passiflora edulis* Sims. A.- Hábito. B.- Flor. C.- Fruto inmaduro. D.- Porción de fruto con las semillas

Ensayo

Los preparados se realizaron a partir de raicillas obtenidas de semillas puestas a germinar en oscuridad durante al menos 2 semanas. Las raicillas fueron pretratadas con solución saturada de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M (2mM) (Tjio and Levan, 1950) durante 24 hs en la heladera. La finalidad del pretratamiento fue obtener la acumulación de profases tardías y metafases mitóticas, buena separación de los cromosomas, y permitir la visualización de las constricciones primarias y secundarias.

Luego fueron fijadas en etanol absoluto: ácido acético glacial en proporción 3:1 (mezcla de Farmer) a temperatura ambiente por una hora y conservadas a -20°C hasta su utilización.

Posteriormente, se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno en agua destilada, las raicillas fueron escurridas en papel de filtro, posteriormente hidrolizadas con HCl 1N por 10 minutos a 60°C y se colorearon con Reactivo de Schiff (Feulgen and Rossenbeck, 1924), durante 24hs, a oscuridad y a 4°C. El meristema coloreado fue macerado en carmín

acético 2% (Belling, 1926, 1928) y se utilizó un estilete oxidado como mordiente. Los preparados se hicieron permanentes con solución de Terpentina de Venecia y para ello se agregó una gota de dicha solución en uno de los bordes del cubreobjeto y se facilitó su difusión colocando en el lado opuesto un triángulo de papel de filtro para absorber el colorante. Se dejó secar el medio de montaje por 48 horas o más.

También se ensayaron diversos tipos de coloración, entre ellos se aplicaron tinción con hematoxilina (Saez, 1960), Giemsa (Guerra, 1986) y orceína acética, sin resultados convenientes.

Fotografías

Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM (2006), incorporada al microscopio óptico marca OLYMPUS serie CX31 con ocular de 100x.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de raicillas apropiadas, es decir que dispongan de al menos 1 cm de longitud y un meristema de buen tamaño ha sido uno de los pasos más críticos. Entre los inconvenientes que se presentaron, podemos mencionar frutos con insuficiente cantidad de semillas, la

falta de germinación de las mismas y la presencia de meristemas muy pequeños.

Los preparados mitóticos obtenidos con la técnica propuesta, permitieron la visualización nítida y esparcida de los cromosomas (Fig. 2 A–C). El número cromosómico observado para esta especie es $2n = 18$, confirmando el número cromosómico reportado por Janaki Ammal (1945), Storey (1950) y Guerra (1986).

Claramente se identificaron la presencia de constricciones secundarias o satélite en el par de cromosomas más pequeño (Fig. 2 A). En especies de *Passiflora*, existen variaciones en la localización y en el número de constricciones secundarias. Por ejemplo, en *P. edulis* f. *flavicarpa*, Oliveira e Coleman (1996) encontraron una constricción secundaria en el cromosoma 8; Mayeda (1997) y Cuco et al. (2003) registraron dos pares de cromosomas satelitados localizados en los pares 8 y 9; Soares-Scott (1998) en los cromosomas 4 y 7; Praça et al. (2008) en los cromosomas 1, 2, 7 y 8; y Penha (2012) un par de constricciones secundarias en los cromosomas 7 y 8.

Se observa poca coincidencia respecto de la nomenclatura cromosómica utilizada para describir los cariotipos, por lo tanto, es posible que se trate de los mismos cromosomas en más de uno de los casos citados.

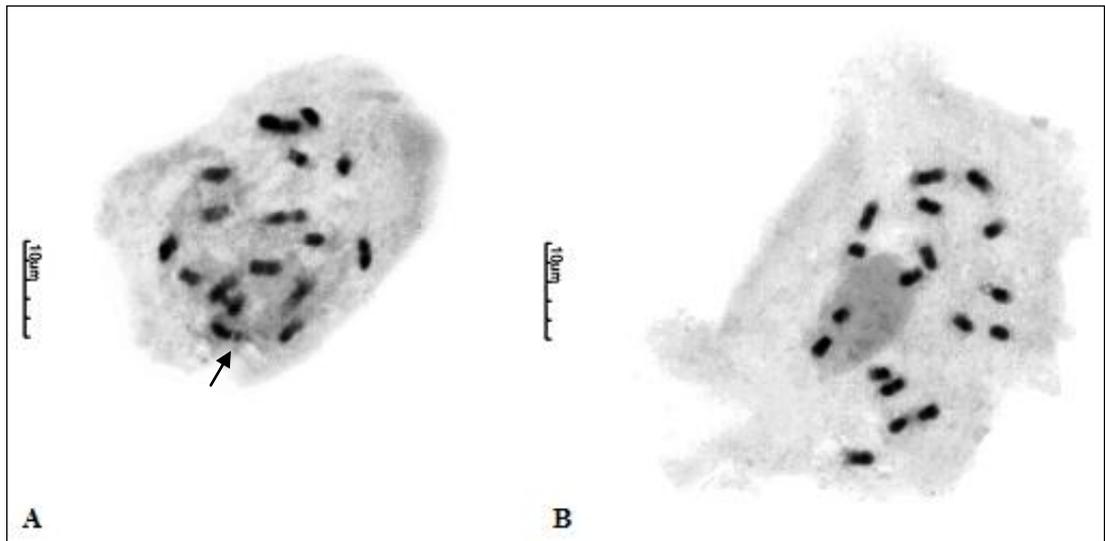


Figura 2: Cromosomas en mitosis de *Passiflora edulis* Sims. A.- B.- Metafase, $2n = 18$. La flecha indica la constricción secundaria y el satélite. La barra indica 10 μ m.

CONCLUSIONES

El protocolo ensayado permitió la visualización clara de los cromosomas mitóticos, este ha sido probado en reiteradas ocasiones y es recomendable su aplicación para otras especies del género. Su aplicación ayudará a disponer información citológica integral de *Passiflora*, contribuirá a comprender la biología evolutiva del género, especialmente, respecto a la evolución cromosómica que han tenido sus especies. Las procedencias analizadas en el presente trabajo no presentaron variaciones en el número cromosómico, $2n = 18$. La existencia de diversos números básicos ha sido una herramienta que algunos autores han usado para agrupar especies y caracterizar secciones del género, sin embargo, aun los datos son insuficientes para proponer la direccionalidad de los cambios cromosómicos disploides que han tenido lugar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belling, J. 1926. The iron-acetocarmine method of fixing and staining chromosomes. *Biol. Bull.* 50: 160-162.
- Belling, J. 1928. A method for the study of chromosomes in pollen mother cells. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 14: 293.
- Cuco, S.M.; Mondin, M.; Vieira, M.L.; Aguiar Perecin, M.L. 2003. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metafases mitóticas em plantas: *Passiflora* (*Passifloraceae*) e *Crotalaria* (*Leguminosae*). *Acta Bot. Bras. (BR)*. 17: 363-370.
- Daviña, J. R.; Grabielle, M.; Cerutti, J. C.; Hojsgaard, D. H.; Almada, R. D.; Insaurralde, I. S.; Honfi, A. I. 2009. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genet. Mol. Biol.* 32, 4: 811-821.

- Deginani, N. 1999. Passifloraceae L. *Aportes Botánicos de Salta-Ser. Flora* (AR). 6 (2): 1-20.
- Deginani, N. 2001. Las especies Argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* (AR). 39 (1-2): 43-129.
- De Melo, N.F.; Cervi, A.C.; Guerra, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora L.* (Passifloraceae). *Pl. Syst. Evol.* (AT). 226: 69-84.
- De Melo, N.F.; Guerra, M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora L.* species with distinct base chromosome numbers. *Ann. Bot.* (UK). 92: 309-316.
- Feulgen, R. and Rossenbeck, H. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure. *Hoppe-Seyl, Z.* 135: 203-248.
- Guerra, M. 1986. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. *Rev. Bras. Gen.* (BR). 9: 21-40.
- Hansen, A.; Gilbert, L.; Simpson, B.; Downie, S.; Cervi, A.; Jansen, R. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst. Bot.* (USA). 31 (1): 138-150.
- Honfi, A.I.; Quarín, C.L.; Valls, J.F.M. 1990. Estudios cariológicos en Gramíneas Sudamericanas. *Darwiniana* 30 (1-4): 87-94..
- Hojsgaard, D.H.; Honfi, A.I.; Rua, G.H. and Daviña, J.R.. 2009. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from Subtropical South America (Poaceae). *Gen. Res. Crop Evol.* 56: 533-545.
- Janaki Ammal, E.K. 1945. Chromosome atlas of cultivated plants. In: Darlington, C.D.; Janaki Ammal, E.K. (Eds.). Londres, US: George Allen and Unwin Ltd. p. 114.
- Mayeda, L. Y. 1997. *Estudo citogenético em dez taxons do gênero Passiflora L. (Passifloraceae)*. Tesis (M. Sc.). São Paulo, BR: Universidade de São Paulo. 89 pp.
- Oliveira, A.M. e Coleman, J.R. 1996. Estudos citogenéticos de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). *Rev. Bras. Gen.* (BR). 19 (Suplemento): 134.
- Penha, H. 2012. Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis f. flavicarpa* inserida em BACs (Bacterial Artificial Chromosome) e mapeamento cromossômico usando hibridação in situ fluorescente. Tesis (Ph. D.). Sao Paulo, BR: Universidad de Sao Paulo. 127 pp.
- Praça, M.M.; Carvalho, R.C.; Marcelino, F.C.; Mendoca, M.A.C. 2008. Morphological aspects of *Passiflora edulis f. flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and rDNA FISH tools. *Caryologia* (IT). 61 (2): 154–159.
- Pérez-Cortez, S.; Escala, M.; Tillet, S. 2009. Morfoanatomía de la cubierta seminal de siete especies de *Passiflora L.*, subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). *Hoehnea* (BR). 36 (1): 131-137.
- Saez, F.A. 1960. El empleo de la hematoxilina acética o propiónica para el estudio de los cromosomas con la técnica de aplastamiento. *Com. Soc. Biol. Montevideo* (Mimeografiado).
- Soares-Scott, M.D. 1998. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. Tesis (M. Sc.). Campinas, BR: Universidade Estadual de Campinas. 89 pp.
- Soares-Scott, M.D.; Meletti, L.M.; Bernacci, L.C.; Passos, I.R. 2005. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In:

- Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina. Pp. 213-240.
- Storey, W.B. 1950. Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. *Pacific Sci.* (US). 4: 7-42.
- Tjio, J.H. and Levan, A. 1950. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anal. Estac. Exp. Aula*, 2: 21-64.