

CENTRO AGRONOMOICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION VEGETAL

AGRINTERAGRI

INFORME DEL ENTRENAMIENTO REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION  
EN BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
REFERENTE AL DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA EL ESTUDIO CROMOSOMA  
TICO EN Theobroma cacao L.

✓  
Orlando López Báez  
Estudiante graduado  
Convenio CATIE-UCR

Turrialba, Costa Rica

Noviembre, 1983

## INTRODUCCION

El cacao (Theobroma cacao L.) es una planta perenne de importancia económica para los países del trópico americano; por tal razón en la mayoría de las estaciones experimentales se están conduciendo trabajos de mejoramiento genético con el fin inmediato de obtener cultivares de alta producción, con resistencia a plagas y enfermedades, y de mejor calidad; sin embargo, éstos trabajos son más bien de tipo práctico dedicándose menos atención a estudios de carácter genético, por ésta razón los estudios acerca de la citogenética del cacao son muy escasos.

En trabajos previos (Muñoz, 1948; Carletto, 1948, 1964, 1971; Martison, 1975) se ha encontrado que el número de cromosomas somáticos de Th. cacao es en  $2n = 20$ , aunque también se ha informado de anormalidades en la asociación de cromosomas homólogos por lo que se ha sugerido que cacao es un tetraploide y no un diploide tal y como se le ha considerado (Opeke y Jacob, 1969; Enríquez, 1980).

Varios métodos han sido descritos para el estudio cromosomático en esta especie, estos incluyen la aplicación de agentes químicos para el pretratamiento y fijación de células en división, y se consideran útiles para estimar el número de cromosomas por células pero no permiten una mejor aproximación para estudios de carácter morfológico de estos, que puedan dar mayores esclarecimientos a los fenómenos que ocurren en la genética del cacao.

Por otra parte, el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, mantiene dentro de sus objetivos la formación y capacitación de personal científico apoyando los estudios y entrenamientos a nivel de posgrado. Aprovechando esta actividad de docencia, se planeó el entrenamiento recibido, el cual tuvo como objetivo principal conocer

la técnica de aplastado y bandeo de cromosomas y estudiar las posibilidades de ser aplicada en cacao y a que existen antecedentes de su utilización en estudios morfológicos de cromosomas de especies de plantas y animales.

## 2. REVISION DE LITERATURA

Los métodos descritos para el estudio de cromosomas en cacao pueden diferenciarse por las partes de la planta que son objeto de estudio, entre estas destacan: hojas nuevas, puntas de raíz y flores.

### 2.2 Hojas nuevas

Muñoz (1948) intentó obtener el recuento de los cromosomas somáticos en preparaciones de hojas tiernas pero no obtuvo éxito, lo cual fue atribuido a que las células no pudieron esparcirse bien debido a la gran cantidad de bellos que permanecieron sin macerarse. Posteriormente Dublin (1972) utilizó con éxito hojas jóvenes de cacao pretratadas con una solución de Alfa-Bromonaftaleno, el material fue seguidamente fijado en Carnoy (Alcohol etílico anhidro-Ac. acético glacial-cloroformo en 6:1:3 partes) y para la tinción utilizó paranosanilina. Martison (1975) utilizó como fijador una solución de alcohol-ac. acético en 1:1 partes sin pretratamiento del material vegetal, la preparación de la muestra se hizo por el aplastado y tinción con orceina acética.

### 2.2 Puntas de raíz

Según Muñoz (1948) las mejores puntas de raíz para estudiar los cromosomas de cacao son aquellas de crecimiento rápido, de color blanco y con un diámetro entre 1 y 2mm. En la investigación realizada por el citado autor, en Trinidad y Colombia el material fue fijado entre las 8 y 9 de la mañana, pero en Costa Rica fue necesario hacerlo a media noche ya que fue considerada por él como la hora de mayor actividad divisional. Como fijador utilizó el de Navashin con la modificación de Belling, posteriormente el material fue deshidratado en una mezcla de alcohol etílico-n-butirico hasta llegar al 100% que fue cuando las puntas de raíz se

incluyeron en parafina, los cortes en el micrótomó se hicieron a 10 micras y para la tinción se utilizaron los métodos de yodado de violeta de genciana y el de hematoxilina férrica obteniéndose los mejores resultados con el segundo colorante.

El método descrito por Carletto (1948, 1954, 1964, 1971) consiste en tomar puntas de raíz de semillas germinadas, sin mucílago y sin testa en cajas de petri forradas con papel humedecido. Las puntas de raíz obtenidas son fijadas en solución de Craft e inmersas en parafina por el método de alcohol butílico, los cortes practicados en el micrótomó varían entre 3 y 6 micras y para la tinción se usa hematoxilina férrica de Heidénhain. Opeke y Jacob (1969) para estudiar células mitóticas de puntas de raíz practicaron un pretratamiento a éstas con hidroxiquinolina al 0.002 M por 3 h después del cual fueron fijadas con fluido de Allen modificado, posteriormente el material fue hidrolizado en NHCE por 20 min., la preparación se hizo por el aplastado en ac. acético al 45% y tinción con Feulgen por 1 h.

Martison (1975) sin practicar pretratamiento fijó directamente las puntas de raíz en una solución 1:1 de alcohol-ac. acético, la preparación para la observación fue hecha por el aplastado y tinción con orceina acética.

### 2.3 Flores

Para estudiar la microsporogénesis en flores de cacao, Shimoya (1965) tomó flores de cacao, las cuales fueron fijadas en CAA (Cloroformo-alcohol absoluto-ac. acético glacial en 4:3:1 partes) y Bouin-Hollande (100ml de agua destilada + 2,5 gr de acetato neutro de cobre + 4 gr de ac. pícrico + 10 ml de formol 40%), las mejores figuras profásicas se obtuvieron con material fijado en CAA por 10 a 14 hs, pasando luego este a Bouin-

Hollande por 48 h para las demás figuras con utilizar este último fue suficiente, para obtener buenas figuras metafásicas recomienda fijar el material en la noche (2 h), para las profásicas de 24 a 2 h y para las anafásicas en horas de 2 a 7 de la mañana. Las preparaciones fueron realizadas por el método de inmersión en parafina, con cortes entre 5 y 10 micrones, y coloreando con hematoxilina férrica de Heidenhain, hematoxilina de Delafield y Feulgen.

Opeke y Jacob (1969) describen una técnica a base de botones florales los cuales son fijados en Carnoy entre las 7 de la mañana y las 12 medio día, después son aplastados y coloreados con acetocarmin al 0.5%. Carletto (1974) colectó botones florales entre las 7 y 12 hs de la mañana, estos fueron fijados en Carnoy por 36 hs en baja temperatura, después se prepararon láminas por el aplastado y teñido con acetocarmin, un método similar es descrito por Martison (1975), aunque este autor utiliza una solución fijadora a base de ac. acético-alcohol en 1:3 partes por un período de más de 24 hs, después del cual las anteras son disecadas y teñidas con orceina acética y finalmente aplastadas.

### 3. MATERIALES Y PROCEDIMIENTO DESARROLLADO

#### 3.1 Material vegetal

Se utilizaron puntas de raíz de semillas de cacao a las que se les desprendió el mucílago por lavado con agua y fueron germinadas en bolsas de plástico con aserrín de madera, estas se tomaron a tres diferentes etapas de crecimiento:

- 6-7 semanas
- 4 semanas
- 2 semanas

#### 3.2 Pretratamientos

Los pretratamientos y el tiempo a que se sometieron las raíces fueron los siguientes:

- Colchicina al 0.025% por 2, 4, 8 y 24 hs
- 8-Hidroxiquinolina 0.002 M por 30 min., 1 h, 1y1/2 h y 2 hs
- Baja temperatura: a 5°C por 24 hs

#### 3.3 Fijación

El procedimiento de fijación fue el siguiente: las raíces son sacadas de la solución de pretratamiento, se lavan con agua destilada y se colocan en una solución fijadora de 3:1 partes de etanol absoluto y ac. acético glacial, la cual debe ser preparada poco antes de usarse con la finalidad de evitar precipitados, y debe estar además fría. El material es conservado en fijación por 2 hs a bajas temperaturas (-20°C), la fijación del material se hizo durante las primeras horas de la mañana, entre las 8 y 12 medio día.

### 3.4 Hidrolizado

Después del período de fijación, las raíces son tratados con HCL 1 N por 10 min. a 60°C, para lo cual resulta práctico un recipiente para baño maría; posteriormente el material es lavado con agua destilada y se coloca de nuevo en solución fijadora fresca y se almacena a baja temperatura.

### 3.5 Preparaciones por la técnica de aplastado y tinción con orceina acética

Las preparaciones por la técnica de aplastado se hicieron de la siguiente manera:

- Se sacan las puntas de raíz de la solución fijadora, con una navaja delgada se cortan las puntas y se colocan sobre un portaobjetos.
- Agregar ac. acético glacial al 45%
- Con la ayuda de una pinza macerar el material hasta dejarlo bien molido, extrayendo los pedazos que no se maceren.
- Agregar una gota del colorante orceina acética al 2%, diluida en ac. acético glacial
- Cubrir la preparación con un cubreobjetos (N°1 ó 1y1/2), cubrir con un papel filtro y presionar fuertemente con la yema del dedo pulgar evitando los movimientos laterales
- Observación al microscopio, si la placa preparada es buena puede procederse a prepararla permanentemente de la siguiente manera:
  - . Colocar la preparación sobre hielo seco (CO<sub>2</sub>) por 2 a 5 min. hasta que el material esté bien congelado, después se saca la preparación de congelamiento y se desprende el cubreobjetos lo más



rápido posible con la ayuda de un objeto punzocortante, paso seguido, se sumerge la placa en alcohol al 95% por 1 a 2 min. y después se deja secar al ambiente sobre papel filtro; es necesario señalar que para poder efectuar placas permanentes por esta técnica, tanto el cobre como el portaobjetos deben ser siliconizados previamente lo cual se logra frotando suavemente ambos lados de cada uno con papel siliconizado.

### 3.6 Técnica de bandeado por tinción con Giemsa y Leishman

La preparación ya seca (permanente) es colocada en una solución buffer fosfato (PH = 6,8) a la cual se le agrega el colorante giemsa agitando suavemente hasta que la solución toma un color azul fuerte, se deja reposar por 15 min., después de éste tiempo sobre la superficie de la solución se forma una placa metálica que es necesario remover con cuidado ya que puede dañar la preparación, para removerla se usa agua corriente, llenando el recipiente por una esquina hasta que el agua se desborda y arrastra consigo a la placa.

Posteriormente la preparación es lavada con agua destilada y es cambiada a solución buffer fosfato, se saca rápidamente y se deja secar al ambiente.

Leishman: El punto de partida para esta técnica es el mismo que para la tinción con giemsa; la preparación se somete a una solución saturada de hidróxido de bario por 6 min. a temperatura ambiente, la muestra es sacada y lavada con agua destilada hasta eliminar todo el excedente de hidroxido y se transfiere a una solución 2X SSC por dos veces consecutivas durando 10 min. en cada una y seguido de dos cambios a una solución 0.3X SSC dando tiempo de 30 min. en cada una. Posteriormente, la preparación se transfiere a una nueva solución 0.3X SSC donde permanece 1y1/2 h

a una temperatura de 60°C, después del cual se procede a teñir con el colorante Leishman diluido en proporción 1:20 de buffer fosfato, por 20 a 30 min. Finalmente la placa es lavada en solución buffer fosfato muy diluido (10 veces de lo utilizado para teñir), secada a temperatura ambiente y observada al microscopio.

Una variante a esta práctica y que induce también la formación de bandas en los cromosomas es la siguiente: después del tratamiento en hidróxido de bario, la preparación sin lavar es transferida directamente a una solución de 0.1 N de NaOH por 30 seg. a temperatura ambiente, después se efectúa el tratamiento en 2X SSC y a partir de este paso se continúa el proceso.

### 3.7 Elaboración de preparaciones permanentes por la técnica de deshidratado en flama

Las puntas de raíz se extraen de la solución fijadora, se maceran en un recipiente al cual se agrega metanol-ac. acético glacial en 3:1 partes hasta lograr una completa desintegración del material en la mezcla, con la ayuda de un gotero se dejan caer sobre un portaobjetos gotas de la mezcla, inmediatamente se coloca el portaobjetos sobre un mechero y se pasa sobre la flama procurando que el líquido arda, a partir de este paso la preparación puede teñirse con giemsa o leishman mediante los procedimientos descritos anteriormente.

### 3.8 Reactivos

Colchicina al 0,025%

Etanol absoluto

Ac. acético glacial

Ac. acético glacial al 45%

Ac. clorhídrico 1 N

Orceina acética: 2 gr de reactivo en 100 ml de ac. acético glacial al 45%

Alcohol al 95%

Hidróxido de bario

Solución buffer fosfato PH = 6,8, 10 milimolar dibásico

Leishman: 0.15 gr de reactivo en 100 ml de metanol absoluto

SSC = 0,15 M NaCl + 0.015 M de citrato de sodio

8-Hidroxiquinolina 0.002 M: 0.145 gr en 50 ml de agua destilada

CO<sub>2</sub> (hielo seco)

Giemsa

Metanol

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1 Material vegetal

Las preparaciones de puntas de raíz de diferentes edades no difirieron al observarse las células al microscopio; aunque desde el punto de vista práctico, las puntas de raíz con edades mayores a las 4 semanas se consideran más adecuadas ya que en esta etapa de crecimiento las raíces secundarias y por tanto puntos de mayor intensidad divisional fueron más abundantes. El aserrín de madera utilizado como medio de germinación se considera apropiado ya que resulta fácil desprenderlo de las raíces a base de lavado con agua sin causar ningún daño a las puntas de éstas.

##### 4.2 Pretratamientos

El tratamiento a base de colchicina al 0,025% por una duración de 2 a 4 hs fue el que permitió observar mejor los cromosomas, en tratamientos a una mayor duración se observaron células con cromosomas más pequeños dando la apariencia de estar encogidos y en algunas fue notoria la inducción de poliploidia ya que el número básico de cromosomas (20) fue duplicado; lo anterior concuerda con los resultados de Knight (1957) quien utilizó colchicina al 0.6% por 24 hs para inducir poliploidia en cacao y García (1972) que señala que tratamientos prolongados de colchicina producen un acortamiento de los cromosomas; de lo anterior se desprende la necesidad de estudiar pretratamientos a tiempos cortos con la finalidad de obtener preparaciones con cromosomas extendidos.

Los tratamientos a base de hidroxiquinolina y baja temperatura permitieron observar los cromosomas en las células, aunque con menor nitidez que el mejor tratamiento a base de colchicina.

#### 4.3 Fijación del material

El procedimiento de fijación desarrollado no permite hacer inferencias acerca de su eficiencia; sin embargo, es necesario señalar que la técnica de fijación es una parte muy importante del proceso ya que las observaciones acerca de la morfología, número y asociaciones de cromosomas dependen del proceso de fijación utilizado.

Existen algunas técnicas específicas para cromosomas pequeños, tal como es el caso de Th. cacao, que deben ser estudiadas en detalle, García (1972) sugiere fijar el material en una solución compuesta de 60 ml de metanol, 20 ml de agua destilada, 30 ml de cloroformo y un gramo de cada uno de los siguientes reactivos: ac. pícrico, 2,4 dinitrofenol y cloruro de mercurio. Otros factores que afectan la fijación del material y que deben ser estudiados en mayor detalle son la hora de inicio y el período de duración ya que de acuerdo a Muñoz (1948) y Shimoya (1965) tienen un efecto marcado sobre las figuras que se obtienen en las preparaciones.

#### 4.4 Técnica de aplastado y teñido con orceina acética, Giemsa y Leishman

Las preparaciones cromosomáticas realizadas mediante el aplastado y tinción con orceina acética permitieron separar las células individualmente, de manera que pudieron ser aplastadas sin reventarse esparciendo los cromosomas en el citoplasma tal como se observa en la Figura 1, resultando fácil contar su número por célula. Los colorantes Giemsa y Leishman actúan con el ADN del cromosoma formando bandas que ayudan a diferenciarlos y agruparlos lo cual ha sido utilizado con éxito en cromosomas humanos (Hsu, 1973) y plantas cultivadas (Ostergreen and Hennen, 1962; Sisodia, 1968; Chow and Larter, 1981), al teñir las células de cacao con estos colorantes, los cromosomas fueron distinguibles pero no se observó la

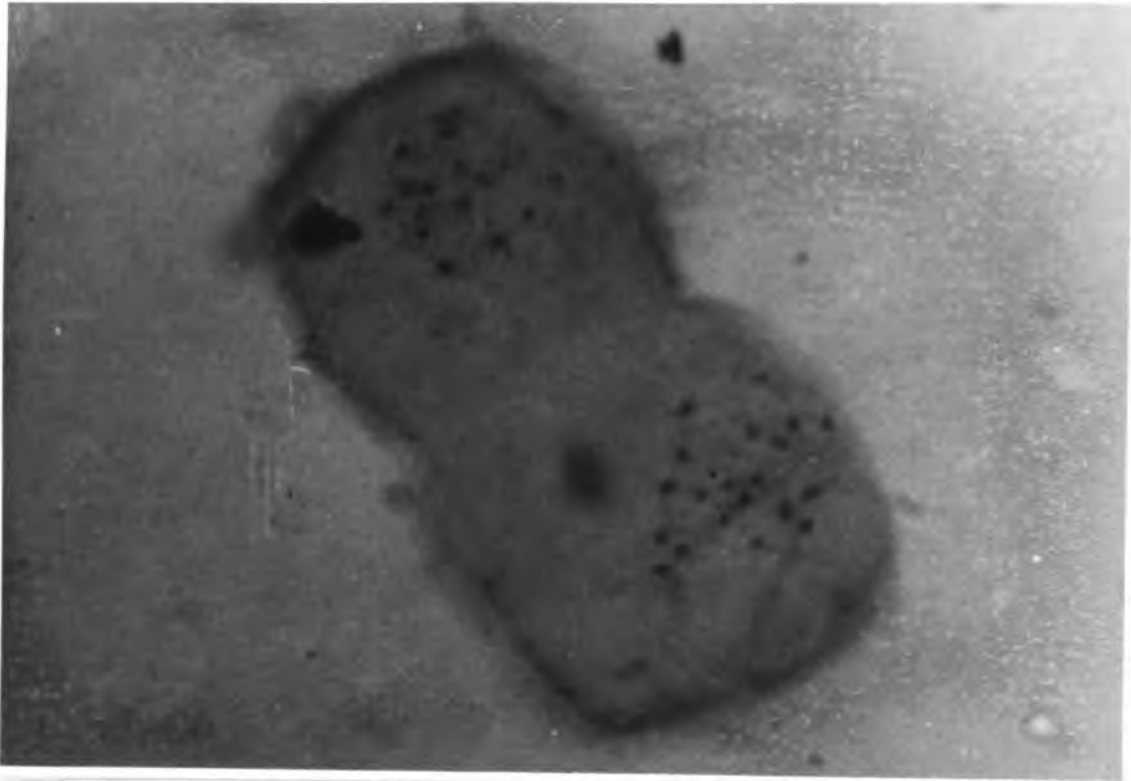


Figura 1. Microfotografía de cromosomas de células de puntas de raíz de cacao aplastadas y teñidas con orceína acética.

formación de bandas, es muy posible que esto se deba al reducido tamaño de los cromosomas de esta especie, lo cual también ha sido señalado en investigaciones anteriores (Carletto, 1964, 1971; Martison, 1975). Como hay muy poca información al respecto, se considera conveniente estudiar a mayor profundidad las técnicas de bandeado de cromosomas combinando pretratamientos y fijación del material.

#### 4.5 Preparaciones permanentes por deshidratado en flama

Esta es una técnica para elaborar placas permanentes con material de interés, a diferencia del método convencional resulta mucho más rápida y se requieren menos reactivos, su aplicación en material de cacao permitió realizar preparaciones en las que se observaron cromosomas en células en un solo plano, lo cual puede ser importante en estudios morfológicos; ya que con el procedimiento de aplastado es común observar agrupamientos de células sin esparcirse.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica de aplastado y tinción con orceína acética aplicada a puntas de raíz de 4 a 7 semanas de edad pretratadas con colchicina al 0,025% por 2 a 4 hs, permitió observar células con cromosomas esparcidos por el citoplasma resultando fácil cuantificarlos.

El método de bandeo por tinción con Giemsa y Leishman se aplicó a células de cacao, pero no se observó la formación de bandas posiblemente debido al reducido tamaño observado en los cromosomas.

Es necesario estudiar con mayor profundidad pretratamientos cortos o que induzcan alargamientos de cromosomas, procedimientos y medios de fijación del material dando especial énfasis en técnicas para cromosomas pequeños, y combinar estos con técnicas de bandeo.

La técnica de deshidratado en flama se considera adecuada para la elaboración de preparaciones permanentes de células somáticas de cacao.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mis agradecimientos al Dr. Pedro León por su orientación y facilidades brindadas durante mi estancia en el centro.



6. REFERENCIAS

1. CARLETTO, G. M. Morfología dos cromosomas de Theobroma leiocarpa. Boletín do Museu Nacional (Brasil), Nova Serie Botânica N°9. 1948. 5p.
2. \_\_\_\_\_. Duplicação do numero de cromossomas em cacauzeiros. In Conferencia Interamericana del Cacao, 5a., Turrialba, Costa Rica, 1954. Vol. II. s.p.
3. \_\_\_\_\_. Estudo do numero, dimensões e forma dos cromossomas de algunos cultivares de Theobroma cacao L. In Centro de Pesquisas de Cacau, Relatorio Annual, 1964. Bahía, Brasil. 1964. pp:7-8.
4. \_\_\_\_\_. Morfología dos cromossomas de cacauzeiro "Catongo". Theobroma (Brasil) 1 (3): 11-14. 1971.
5. \_\_\_\_\_. Observações citológicas em células mães de polen de cacauzeiro. Theobroma (Brasil) 4 (2):34-40. 1974.
6. CHOW, C. and Later, E.N. Centromeric banding in maize. Canadian Journal of Cytology 23:255-258. 1981.
7. DUBLIN, P. Polyembryonie et haploide chez Theobroma cacao. Café Cacao Thé 16(4): 295-311. 1972.
8. ENRIQUEZ, G.A. Revisión de literatura de citogenética en cacao. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1964. 9.p.
9. \_\_\_\_\_. Mejoramiento en cacao (Theobroma cacao). In Mesa redonda sobre cacao, Guayaquil, Ecuador, 1980. 17 p.
10. HSU, T.C. Longitudinal differentiation of cromosomes. American Review of Genetics 73: 153-176. 1973.
11. GARCIA, V. A. Manual de técnicas de citogenética. Colegio de Posgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Mexico. 1972. 41 p.
12. KNIGHT, R. Induced polyploidy in Theobroma cacao L. and related species. Journal of Horticultural Science 32(1): 1-8. 1957.
13. MARTISON, V. A. Cytological studies of diploid and tetraploid Theobroma cacao. Genética 45: 341-348. 1975.
14. MUÑOZ, O. J. M. Estudios cromosómicos en el género Theobroma L. Tesis Mag. Agr., IICA, Turrialba, Costa Rica. 1948. 43 p.
15. OPEKE, L.K. and JACOB, V.J. Cytological irregularities in Theobroma cacao L. Cacao (Costa Rica) 14(2):9-11. 1969.

16. OSTERGREEN, G. and HENNEN, W.K. A squash technique for chromosome morphological studies. *Hereditas* 48: 332-341. 1962.
17. SHIMOYA, C. Microsporogénesis em cacauero "Catongo" (Theobroma cacao L.). *Experiantiae (Brasil)* 5(1): 1-16. 1965.
18. SISODIA, N. S. A root squash technique for counting somatic cromosomes in sugar cane. *Stain Technology* 43(3):129-134. 1968.