

## UN METODO PARA UN FACIL RECUENTO CELULAR EN MERISTEMAS RADICULARES DE *VICIA FABA L.* EN GERMINACION EXPERIMENTAL

POR

MARIO I. ALARCON A. (\*)

### RESUMEN

Se describe un método para separar las células de tejidos meristemático radicular secundario de *Vicia faba* mediante la acción de mezcla de oxalato de amonio y peróxido de hidrógeno (mezcla Ford). Se obtiene un significativo resultado lo que permite efectuar recuentos celulares y por lo tanto la determinación del índice mitótico con más exactitud y comodidad.

### ABSTRACT

A method for separating cells of secondary radicular meristematic tissue of *Vicia faba* through the action of ammonium oxalate and hydrogen peroxide is described. A significant result is obtained, leading to the establishment of cellular account and, therefore, to the determination of the Mitotic Index with more accuracy and ease.

### INTRODUCCION

Los trabajos de recuentos nucleares para determinar índices mitóticos en variadas condiciones experimentales, adolecen en general, de variables de difícil control y además errores que frecuentemente no son sistemáticos debido a las características propias de las técnicas citoquímicas en uso. El squash Feulgen crea grupos celulares que permite conteos aceptables, pero los campos observables microscópicamente revelan acúmulos de tejidos o a veces grupos aislados de células lo que hace el trabajo experimental confuso en cuanto a la homogeneidad de los squash preparados para recuento y determinación de Índice Mitótico (I.M.).

Existen sustancias y mezclas de ellas, que se han empleado para la separación de células, ya que es un factor de mucha importancia en los estudios de crecimiento y desarrollo en órganos vegetales. Sin

(\*) Dpto. de Biología Celular. Instituto de Biología "Ottmar Wilhelm Grob". Universidad de Concepción.

embargo, el empleo de ellas con fines de recuento celular hay que descartarlas, pues, como ha sido informado, adolecen de acciones colaterales que terminan alterando la composición y estructura de la célula aislada. Se ha descrito métodos como el de Brown y Rickless, 1949, en que se arriesga una destrucción significativa de células por acción de los agentes oxidantes, u otros, como los de Chayen, J., 1952, y Rijven y Wardlaw, 1966, que utilizan sistemas enzimáticos disolventes del cemento intercelular; pero que también alcanzan en su acción a la pared celular.

Los trabajos de Letham, D. S., 1960 y Ginzburg, B. Z., 1958, merecen especial consideración ya que han obtenido un eficiente resultado separatriz utilizando etilendiaminotetracético (EDTA), que como agente quelante, promueve la movilización de Calcio, integrante de los cementos intercelulares (pectatos, metoxilpectatos). Esta acción ha sido detectada controlando temperatura, pH, concentración, aditivos como tioglicolato, urea, butanol, etc. que sinergizan la acción de EDTA. La modificación de la acción del EDTA por estas sustancias se explica según Ginzburg (1958), porque con tioglicolatos hay ruptura de los puentes disulfuros, por otra parte, la urea actúa rompiendo las uniones de hidrógeno; el butanol, por su parte, promueve la ruptura de las uniones hidrofóbicas. Esto permite desorganizar el complejo proteico que, además de los pectatos de calcio y magnesio, intervienen en la estructuración molecular del cemento intercelular. Efectos similares se han obtenido mediante la acción de sistemas enzimáticos proteolíticos, sin embargo, la separación de las células propiamente tal mediante estas acciones son confusas, pues no sólo se desintegra el cemento de unión, sino la estructura celular.

El daño celular que produce el EDTA parece ser mucho menor que el que producen los otros agentes experimentados, sin embargo, su efecto macerante es muy sensible a los cambios de pH y temperatura; por otra parte, en la laminilla media de los vegetales puede encontrarse, además de pectatos de calcio y magnesio, sustancias intercelulares de naturaleza proteica que escapan a la acción del EDTA y que pueden hacer que esta sustancia no sea de aplicación general.

De los trabajos de Northcraft, R. D., 1951 y Letham, D. S. 1960, se desprende que el oxalato de amonio actúa pobremente como agente de separación de células de plantas, sin embargo, nos pareció importante utilizarlo asociado con peróxido de hidrógeno (mezcla Ford) para facilitar el recuento celular y valoración del Índice Mitótico, mediante reacción Feulgen, como lo recomienda Revell, S. H. (1959).

#### MATERIALES Y METODOS

Se hace germinar en cubetas especiales semillas de *Vicia faba* obteniéndose meristemas radiculares secundarios de 4 días, los que presentan una longitud de 10 mm. aproximadamente. Se mantienen a temperatura de  $20^{\circ} \pm 3^{\circ}$  C. Luego se cortan y fijan en Carnoy durante seis horas, Carnoy al que se ha agregado una gota de formalina.

A objeto de determinar el tiempo de acción de la mezcla Ford (peróxido de hidrógeno 20 volúmenes - solución saturada de oxalato de amonio), se somete estos meristemas a la acción de la mezcla en tiempos variables, luego se pesan y se procede a la hidrólisis y tinción con reactivo de Schiff, montaje y recuento.

### RESULTADOS

#### GRÁFICO Nº 1

CONTROL DE ACCION DE LA MEZCLA FORD SOBRE LA SEPARACION DE CELULAS EN MERISTEMAS DE *VICIA FABA* EN GERMINACION

Gráfico Nº 1

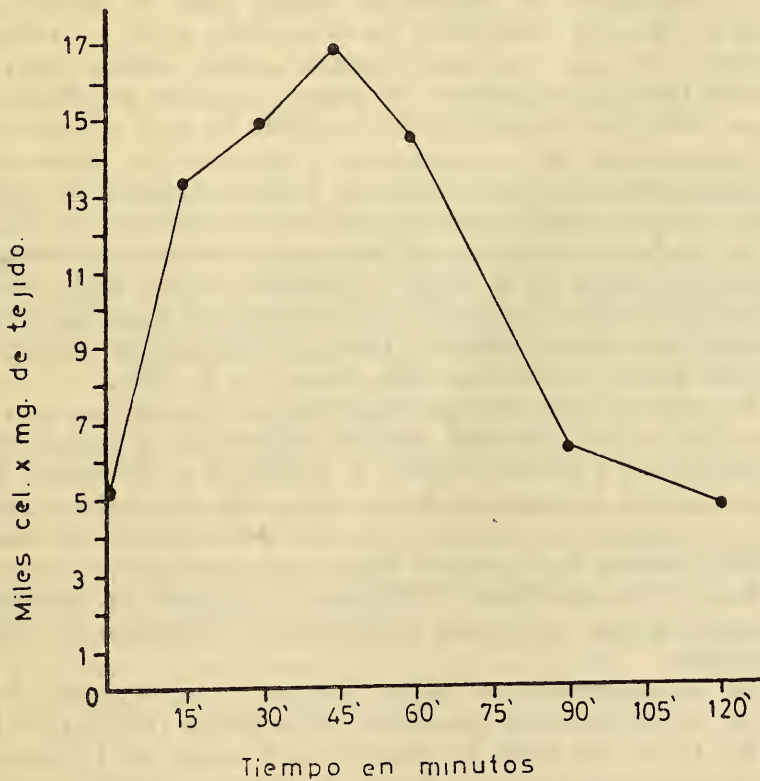


TABLA N<sup>o</sup> 1  
 RECUENTO DE CELULAS LIBRES EN MERISTEMAS RADICULARES DE  
*VICIA FABA* POR ACCION DE LA MEZCLA FORD Y EXPRESADO  
 EN NUMERO DE CELULAS POR MILIGRAMO

Slide	Tiempo de acción en minutos	Número de Cel. libres por/mg	Promedio peso me- ristemas tratados
Control	—	5105	0.55 mg
1	15	13194	0.23
2	30	14906	0.29
3	45	16946	0.45
4	60	14464	0.45
5	90	6274*	0.22
6	120	4937*	0.40

\*Tejido en parte desintegrado.

Se determina así el tiempo óptimo de acción de la mezcla Ford sobre los meristemas radiculares de *Vicia faba* en las condiciones experimentales establecidas.

#### DISCUSION

La utilización del oxalato de amonio como un agente que remueve el cemento intercelular ha sido citado desde los trabajos de comienzos de siglo que han intentado obtener células libres en estructuras biológicas superiores. El método sugerido por Prigheim, E. G. en 1926 (fide Northraft, R. D., 1951), ha sido utilizado por varios investigadores de la organización y desarrollo de tejidos vegetales (Northraft, R. D., 1951, Kopac, M. J., 1955, Revell, S. H., 1959). Este método ha permitido obtener significativos resultados en la separación de células en cultivo de tejidos y aún mantener un potencial divisional importante en el medio (Northraft, R. D., 1951). Resultados similares se han conseguido con el empleo de otros agentes de separación de naturaleza enzimática como los señalados por Chayen, J., 1949, 1952, Rijven y Wardlaw, 1966, Kopac, M. J., 1955.

El objetivo de nuestra investigación, por el momento, no va a la determinación del potencial mitótico después de la acción de la mezcla Ford, sino a obtener después de la fijación y tratamiento mediante la reacción Feulgen una buena separación de células meristemáticas que permita un eficiente recuento. Desconociendo el tiempo de acción necesaria de la mezcla Ford se ha estudiado su efecto a partir desde 15 minutos hasta 120 minutos y expresado los resultados en consonancia con las células separadas por miligramo de tejido meristemático.

De las experiencias se colige claramente que la mezcla Ford ejerce un notorio efecto de separación de las células (Gráfico N<sup>o</sup> 1 y Tabla N<sup>o</sup> 1), ya que desde los controles a la acción en 15 minutos hay un ascenso marcado en el número de células separadas. Se determinó, y así se indica en el gráfico y la tabla, que el tiempo de acción de la mezcla Ford es de 45 minutos y este será el tiempo de acción que



se aplicará en experiencias posteriores ante su clara ventaja de conteo y homogenización del campo. En tiempos de exposición mayores de 45 minutos no es posible controlar la acción pues se produce destrucción de los tejidos y el recuento se hace difícil y confuso, tal cual se indica en la Tabla N° 1.

Por otra parte y según lo señalado por Kihlman, B. A., 1975, la pared celular y los cementos intercelulares constituyen un obstáculo tanto para estudios bioquímicos como citológicos en los meristemas, por lo tanto se recomienda para obtener una separación de las células de los meristemas radiculares el empleo de hidrólisis o acciones enzimáticas que permitan disolver las sustancias pécticas en la laminilla media de la pared celular, tratando de obtener acciones que no dañen la constitución estructural de la célula.

Por lo tanto se concluye que la modificación propuesta es óptima, pues la mezcla Ford permite una efectiva separación de células lo que facilita los recuentos con comodidad en campos homogéneos y facilita la determinación del Índice Mitótico y el estudio de placas metafásicas en los trabajos de inducciones mutagénicas en tejidos meristemáticos vegetales.

#### BIBLIOGRAFIA

- Brown, R. and Rickless, P. 1949. "A new method for the study of cell division and cell extension with some preliminary observations on the effect of temperature and of nutrients". Proc. Roy. Soc. B. 136 : 110.
- Chayen, J. 1949. "Squash preparations of living root type cells". Nature 164 : 930.
- Chayen, J. 1952. "Pectinase technique for isolating plant cell". Nature 170 : 1070.
- Ginzburg, B. Z. 1958. "Evidence for protein component in the middle lamella of plant tissue: A possible site for EDTA action". Nature 181 : 398.
- Kihlman, B. A. 1975. "Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations". Mutation Research, 31 : 401.
- Kopac, M. J. 1955. "Citochemical Micrurgy", Int. Rev. Cytol. 4 : 1.
- Letham, D. S. 1960. "The separation of plant cells with EDTA". Exptl. Cell Res. 21 : 353.
- Northeraft, R. D. 1951. "The use of oxalate to produce free-living cells from carrot tissue cultures". Science 113 : 407.
- Revell, S. H. 1959. "The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations". Proc. Roy. Soc. B. 150 : 563.
- Rijven, A. H. G. C. and Wardlaw, I. F. 1966. "A Method for the determination of cell number in plant tissues". Exptl. Cell Res. 41 : 324.