

Observaciones Citogenéticas sobre Girasol (*Helianthus Annuus*)

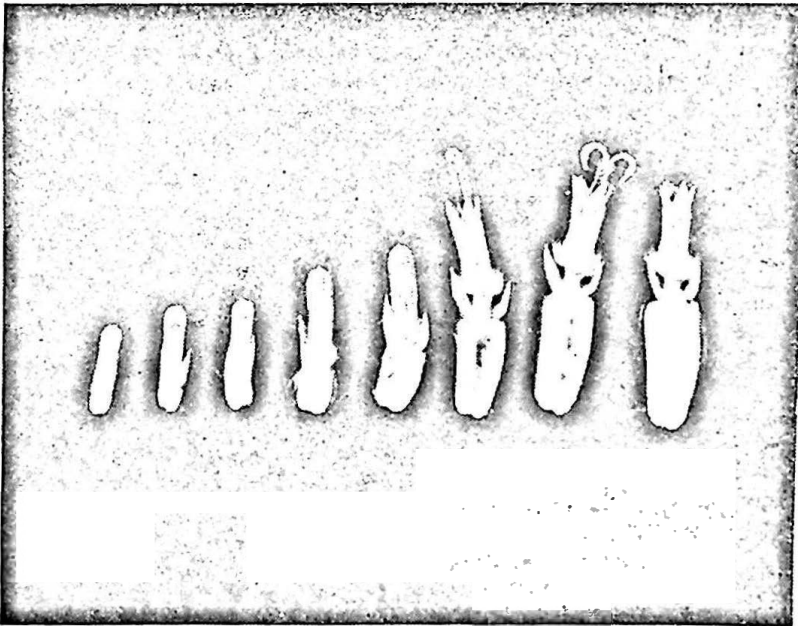
Ing. Agr. R. CONSTANCIO LÁZARO

Trabajo realizado en
la Cátedra de Genética.

Características botánicas.

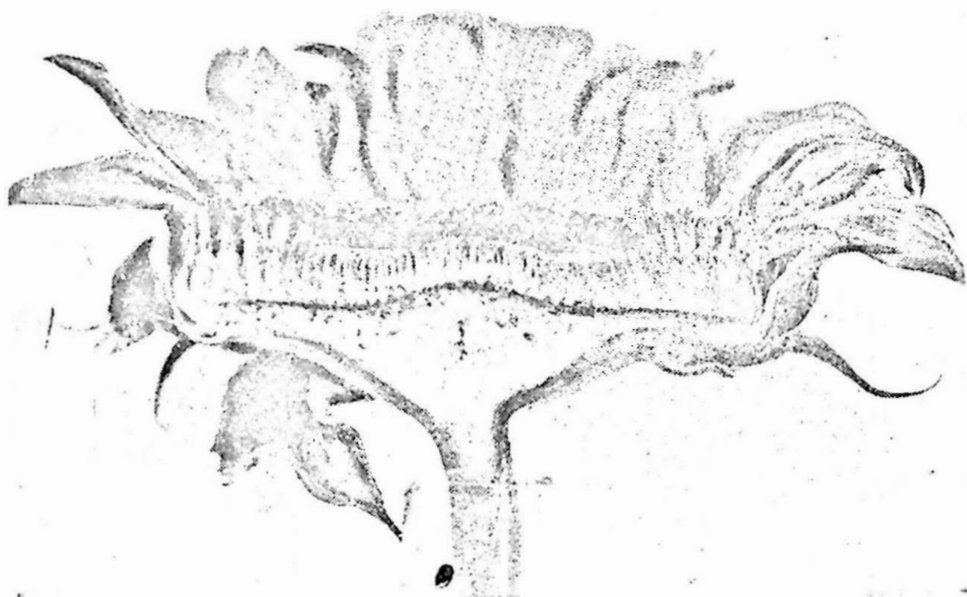
El girasol pertenece al orden de las Campanulares, familia de las Compositaceas, sub familia Diversiflora.

Sus flores en capítulo tienen un receptáculo común envuelto en un involucre. Existen dos tipos de flores, unas estériles en la periferia, verdadero rudimento floral, con un gran pétalo amarillo, estas flores son llamadas semiflósculos; las demás, llamadas flósculos, son flores hermafroditas de simetría radiada, cinco pétalos soldados y sesiles, cinco estambres soldados al tubo de la corola, formando un tubo que envuelve al estilo. El estilo es bifido. Sus flores protandras, de dehiscencia introrsa. El estilo al salir arrastra el



Fot. N.º 1 — Flores centrales de girasol (flósculos) en distintos estados de su desarrollo.

polen con sus pelos colectores, hacia el exterior. El ovario es ínfero, unilocular y uniseminado. El fruto es un aquenio. (Fotografías 1 y 2).



Fot. N.º 2. — Corte central-ventral de un capítulo de girasol.

Observación de la Meiosis.

Para la observación del proceso de la formación de polen, es necesario trabajar con flores que estén al principio de su desarrollo, obtenidas a distintas horas del día, dado que cada planta tiene dentro de ciertos límites, un momento en el día en que se producen los fenómenos de reproducción de las células madres de polen.

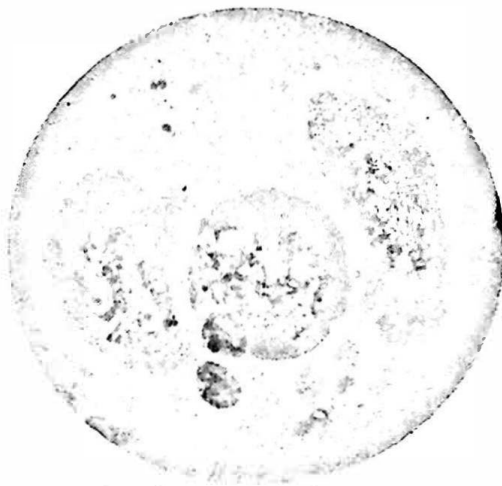
Para el caso del girasol fué necesario recolectar capítulos con un diámetro aproximado de un centímetro a un centímetro y medio, en las primeras horas de la mañana.

Debido al número relativamente elevado de preparaciones, con flores de tamaños muy próximos, que se hubieron de efectuar para poder observar todo el proceso citomeiótico de esta planta, cabe suponer que éste sea muy rápido.

Dentro de los distintos estados meióticos, los más comunes de ver son los correspondientes a los primeros estados de profase (fot. 3) y tetradas polen, (fot. 8) que profases avanzadas, (fot. 4) metafase (fot. 6), anafase (fot. 7) y te-

lofase. El estado más difícil de encontrar es la anafase, lo que concordante a la hipótesis ya formulada, parece ser la fase de más rápida evolución.

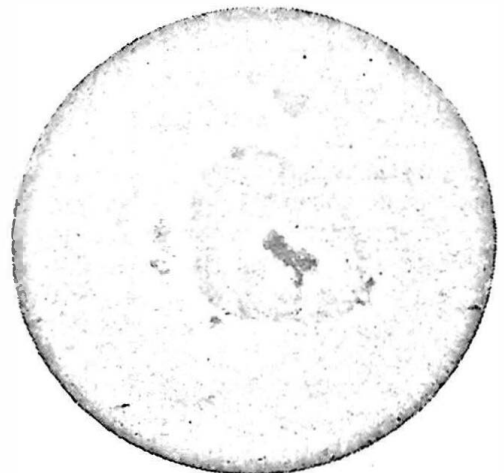
En una anafase conté con notable claridad, 17 cromosomas en cada extremo de la figura, no siéndome posible conservar la preparación por falta de material adecuado en aquella época. Dicho número concuerda con el observado por el investigador Ishikawa para "Helianthus" (17 cromosomas haploides).



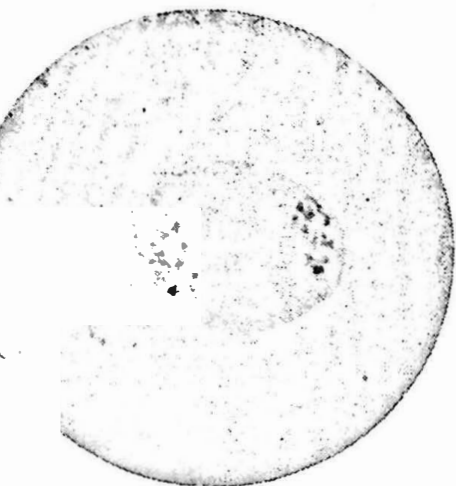
Fot. 3 — Profase



Fot. 4 — Profase



Fot. 6 — Metafase



Fot. 7 — Anafase



Fot. 8 — Tetrada de polen.

Mitosis y recuento de cromosomas.

Se trabajó con puntas de raíces de plantitas de 15 a 20 días, obtenidas en macetas, utilizando tierra muy arenosa. Más tarde se obtuvieron raíces, de semillas germinadas en solución nutritiva, consiguiendo en esta forma raíces limpias y derechas, que facilitan mucho los trabajos posteriores.

En la reproducción somática es interesante examinar que en la metafase, la disposición de los cromosomas, guarda una forma característica, que se puede comparar a un triángulo de puntas truncadas. Observóse esta disposición en numerosos cariotipos, notándose éstos, deformados en algunos casos en los que la membrana celular presionaba al núcleo.

Para el recuento de cromosomas comparé varios dibujos de metafases, realizados con cámara clara, a fin de delimitar con exactitud cada cromosoma, pudiendo al mismo tiempo observar la posición relativa de cada uno de ellos. En dichos recuentos, efectuados en dibujos procedentes de cortes en serie, me fué posible constatar el número de 34 cromosomas (número diploide). (Ver dibujo correspondiente).

TECNICA OBSERVADA.

Meiosis. — Método del carmín acético.

1.º Fijación del material (capullos florales) en alcohol absoluto 3 partes, y ácido acético glacial 1 parte, durante 24



Fot. 9. — Metafase somática. Dibujo con cámara clara.

horas, siendo necesario mezclarlos en el momento de efectuar la fijación.

2.° Conservación del material. Para esto se pasa el material fijado a un frasco con alcohol a 70°, quedando pronto para su utilización ulterior.

3.° Forma de efectuar la preparación. Se coloca la flor a examinar sobre un porta objeto, en el cual se procede a la eliminación de los pétalos y ruptura de las anteras, a fin de extraer las células madres de polen, con la ayuda de agujas histológicas de acero, en una gota de carmín acético (carmín en exceso, en ácido acético glacial y agua destilada en partes iguales). Luego se eliminan cuidadosamente los restos de los tejidos de las anteras, tapando con un cubre objeto al que previamente se le agrega una gota de car-

mín acético, del lado que ha de apoyarse sobre el portaobjeto, ejerciendo una suave presión. Después se pasa la preparación, ligeramente, por la llama de un mechero. En estas condiciones ya está pronta para ser observada al microscopio. Dicha preparación efectuada según la técnica expuesta, se conserva 5 a 7 días y aún más, si se toma la precaución de bordearla con una mezcla de parafina y cera.

Mitosis. — Método de la hematoxilina.

1.° Para observar la mitosis se procede a fijar el material (puntas de raíces) en una solución de 1,5 gramos de ácido crómico, 10 cc. de ácido acético glacial en 90 cc. de agua destilada, mezclada en el momento de la fijación, con formalina en solución al 40 %.

A la hora se elimina la solución fijadora, agregando una nueva cantidad de la misma en el tubo que contiene las raicillas, donde se mantienen 24 horas.

2.° Al cabo de este tiempo se procede a un lavado en una corriente de agua durante 12 horas.

3.° **Deshidratación.** — Para realizarla, se las pasa a tubos conteniendo alcoholes de 5°, 10°, 20°, 35°, 50°, 70° y 80° en forma de efectuar tres pasajes diarios por alcoholes de sucesivas graduaciones.

4.° Después de esta deshidratación parcial se procede a pegar las raicillas de a tres, en cartulinas de 1 centímetro por 1 centímetro aproximadamente, teniendo la precaución de dejar las puntas fuera de la cartulina.

5.° Se continúa luego con la deshidratación, en alcohol de 80°, 95° y absoluto, permaneciendo en cada uno durante 24 horas. Repitiéndose el pasaje en alcohol absoluto, por el término de otras 24 horas más. Luego se pasan los cartoncitos conteniendo las raicillas a mezclas de: tres partes de alcohol absoluto y una de xilol, tres partes de xilol y una de alcohol y por último a xilol puro, efectuando tres pasajes en cada una de estas soluciones, de un cuarto de hora de duración.

6.° **Inclusión.** — Este proceso tiene por objeto, hacer posibles los cortes al micrótopo y se realiza en la siguiente forma: agrégase parafina de 42° fundida al frasquito que contiene las raicillas con xilol, colocándolo luego en la estufa a 40° - 42° durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se elimina gran parte del xilol con parafina y se agrega nueva cantidad de ésta, volviendo el frasco a la estufa otras 24 ho-

ras. Se procede luego a dos nuevas eliminaciones parciales de la parafina de 42° y del resto del xilol, seguidas de agregados correspondientes de parafina de 46° de punto de fusión, en igual forma que la anterior.

Estas operaciones se realizan también cada 24 horas, manteniendo el frasco con las raicillas, todo el tiempo que media entre agregado y agregado, en la estufa a 46°.

Se repite luego la operación anterior con parafina de 52°, manteniendo la estufa a 52° aproximadamente.

Pasadas las últimas 24 horas en parafina de 52°, se vuelca el contenido total del frasco en cajitas de cartulina de 4 centímetros de ancho por 6 centímetros de largo y un centímetro de profundidad, enfriando rápidamente en agua a fin de que la parafina no cristalice y forme una masa homogénea. Se corta después este pan, en pancitos perfectamente rectangulares, de manera que cada uno contenga un cartoncito con tres puntas de raíces, quedando así terminada la inclusión.

7.° **Cortes al micrótopo.** — Los cortes deben ser hechos en serie y el micrótopo estar regulado según la calidad del material a cortar; el espesor de los cortes para el caso del girasol fué de 7 micras.

8.° Se llevan después las tiras de parafina conteniendo las secciones de raíces a porta objetos, a los que se ha puesto una ligera película de la fórmula Mayer's (50 cc. de clara de huevo, 50 cc. de glicerina y un poco de ácido fénico) colocando los porta objetos así preparados, en la estufa a 42° durante 24 horas.

9.° **Eliminación de la parafina.** — Para esto se disponen los porta objetos en frascos de coloración con xilol, manteniéndolos en éstos, por espacio de 20 minutos. Se renueva el xilol y se dejan en éste, otros 20 minutos. Después se pasan a frascos de coloración con alcoholes de las siguientes graduaciones: absoluto, de 95°, 80°, 70°, 50°, 35°, 20°, 10°, 5° y agua, dejándolos por el término de 5 minutos en cada uno.

10.° **Coloración.** — Se colocan los porta objetos en solución de sulfato amónico férrico al 4 % durante dos horas aproximadamente, se lavan con una piseta con agua destilada, llevándolos luego a un frasco de coloración con la solución de hematoxilina.

Esta solución se prepara disolviendo un gramo de hematoxilina en 50 cc. de alcohol absoluto y después de un proceso de envejecimiento que dura alrededor de dos meses, se diluye en agua destilada hasta llevarla a 1/2 %.

Los porta objetos permanecen en la hematoxilina así preparada durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo se procede a eliminar el exceso de colorante, mediante la inmersión de los porta objetos en solución de sulfato amónico férrico, a concentraciones variables entre el 2 y 4 %. Esta operación se efectúa en cápsulas de Petri, a fin de poder observar al microscopio, hasta notar una neta separación entre cromosomas.

11.° **Deshidratación.** — Previo un lavado de los porta-objetos con agua corriente durante 2 horas, se comienza esta deshidratación en alcohol de 5°, 10°, 20°, 35°, 50°, 70°, 80°, 95° y absoluto y en xilol puro, efectuando pases de 5 minutos de duración en cada una de estas soluciones.

12.° **Cierre de las preparaciones.** — Para ello se coloca Bálsamo del Canadá en exceso, sobre la parte del porta objeto que lleva adheridos los cortes de las raíces, tapando luego con un cubre objeto y ejerciendo sobre éste, una presión suave mediante un vidrio, presión que deberá ser mantenida durante un día.

Después se dejan las preparaciones sin tocar durante varios días, a fin de que el bálsamo seque bien. Recién entonces la preparación está terminada y en condiciones de conservación.

Mitosis. — Método de Heitz.

Se fijan las puntas de raíces en una solución en caliente de alcohol, tres partes, y una de ácido acético, durante dos minutos, colocándolas de inmediato para su coloración en la solución de carmín acético, preparada en la misma forma que fué detallada anteriormente.

Esta coloración se realiza en caliente, en forma tal que transcurridos dos minutos, comience a hervir el colorante, con las raicillas contenidas en un vasito de Bohemia.

Se procede después a efectuar un frotis con el extremo inferior de las raíces, en la forma corriente.

Estas preparaciones solo duran 6 o 7 días.

Este método rápido es recomendable para las raicillas de girasol, debido en parte al tamaño muy reducido de las células de esta planta.

SOLUCION NUTRITIVA EMPLEADA EN LA GERMINACION DE SEMILLAS Y OBTENCION DE RAICES

Soluciones madres.

Se preparan soluciones normales con las siguientes sales:

cc. en un Lt. de H₂O.

NH ⁴ H ² PO ⁴	1
KNO ³	6
Ca(NO ³) ²	4
MgSO ⁴	2

Se agregan luego los cc. indicados para estas soluciones, a un litro de agua, el que, en momentos de emplearse se completará con 1 cc. de la siguiente solución suplementaria:

Grs. disueltos en 1 Lt. de H₂O

H ³ BO ³	2.86
MnCl ² .4H ² O	1.81
ZnSO ⁴ .7H ² O	0.22
CuSO ⁴ .5H ² O	0.08
H ² MoO ⁴ .H ² O	0.09

BIBLIOGRAFIA

- Sharp. — Introduction to Cytology. Fourth Edition 1934.
 C. D. Darlington. — Recent Advances in Cytology. Second Edition 1937.
 Charles J. Chamberlain. — Methods in Plant Histology. Fifth Edition 1932.
 Hoagland and Arnon. — The Water Culture Method For Growing Plants Without Soil. Circular 347. University of California, 1938.

FE DE ERRATAS

Página 65, línea 35. Donde dice "es recomendable" debe decir "no es recomendable".