

Estandarización del protocolo AgNORs en *Aloe petricola* Pole Evans (Aloaceae)

Standardization of the AgNORs protocol in *Aloe petricola* Pole Evans (Aloaceae)

Y. Sánchez García¹, J. Imery Buiza² y M.B. Raymúndez¹

¹Lab. Biosistemática y Citogenética Vegetal, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. AP 47058, Caracas-Venezuela.

²Lab. Genética Vegetal, Dpto. Biología, Universidad de Oriente. AP 245, Cumaná-Venezuela.

Resumen

Se revelaron zonas NORs activas en metafases somáticas y la organización de nucleolos en núcleos interfásicos de *Aloe petricola* empleando AgNO₃. Las principales modificaciones en la estandarización de la técnica estuvieron dirigidas a variaciones en lavados previos, tiempos de permanencia de las láminas en el buffer borato, calidad de la malla empleada como cubreobjeto y período de incubación de los preparados en la cámara húmeda. Se determinó la frecuencia de distribución del número de nucleolos en núcleos interfásicos y el número de NORs activos en las placas metafásicas. Los resultados muestran AgNORs activos en las regiones subtelo méricas del brazo largo de uno de los cromosomas L₂ y en el par L₄, coincidiendo con el número máximo (tres) de nucleolos.

Palabras clave: *Aloe petricola*, nitrato de plata, organizadores nucleolares (NORs).

Abstract

Places active NORs were revealed in somatic metaphases and the nucleolus organization during interphase cell nucleus in *Aloe petricola*, with AgNO₃. The main modifications were related with variations in previous washes, time of permanency of the sheets in borate buffer, variations in the mesh used to spread the stain and variations in the period of incubation of the preparations in a

Recibido el 9-1-2007 • Aceptado el 30-4-2007

Autor para correspondencia e-mail: ysbe1576@yahoo.es; mraymund@ciens.ucv.ve; jimery@sucre.udo.edu.ve.

moisture chamber. The frequency of distribution of nucleoli number during interphase was determined, as well as the number of active NORs in metaphase plates. Results show active AgNORs in subterminal regions of the long arm of one of the L_2 chromosomes, and in the L_4 pair, corresponding with the maximum number (three) of nucleolus in the studied interphase nucleus.

Key words: *Aloe petricola*, Silver-staining, NORs.

Introducción

Los nucleolos se forman por regiones específicas de los cromosomas denominadas organizadores nucleolares (NORs); cada nucleolo está asociado a uno o más cromosomas por la zona de organización nucleolar, donde la cromatina forma bucles dentro de la misma, y el ADN allí asociado transcribe a ARN ribosomal, el cual existe en múltiples copias repetidas (en *tandem*) agrupadas en áreas específicas en los cromosomas (2).

Aunque los NORs generalmente se reconocen por la presencia de constricciones secundarias, algunos podrían no ser detectados por tinción convencional, principalmente si son pequeños o si se encuentran en los telómeros de los cromosomas, y no se puede saber si estuvieron activos en la interfase previa (1); resultando conveniente emplear tinciones específicas para su identificación.

La técnica de tinción con plata fue desarrollada por Goodpasture y Bloom en 1975, y se emplea para detectar zonas NORs activas, ya que aparentemente reacciona con proteínas ácidas asociadas al ADNr (1). La técnica ha sido empleada en diversos estudios para hacer inferencias acerca de la actividad de la región de organización del nucleolo en metafases

somáticas y en el establecimiento de homología entre especies de *Capsicum* (5), entre otros grupos de plantas.

Si bien existen numerosas contribuciones sobre la cariología de *Aloe* con métodos de tinción clásica (2), los estudios cromosómicos con técnicas de bandeado AgNORs se limitan a *A. vera*, donde reportan la localización de NORs activos en los brazos cortos de los cromosomas 1, 4, 6 y 7 (4); sin embargo, esta es una técnica que se hace compleja de estandarizar para un grupo completo.

Aloe constituye un excelente material de trabajo debido a la aparente selección positiva hacia la uniformidad del cariotipo en el grupo y a la claridad con que pueden observarse las constricciones secundarias en muchas de las especies. En este sentido, se plantea la estandarización de AgNORs en *Aloe petricola* con la finalidad de mejorar el revelado de zonas NORs activas y explorar su potencial informativo en la realización de futuras interpretaciones sistemáticas dentro del género y el empleo como marcadores citogenéticos en estudios de mejoramiento genético en el grupo.

Materiales y métodos

Se siguió una combinación de los protocolos más empleados que generalmente proporcionan resultados positivos (1, 3, 5), con las modificaciones pertinentes de acuerdo a la estandarización de técnicas de colección, pretratamientos, fijación y montaje de láminas para la especie trabajada.

Material vegetal: El material de *Aloe petricola* evaluado se adquirió originalmente en el año 2002 en el jardín botánico comercial «*Mesa Garden*» (Nuevo México, EE.UU.) y fue mantenido bajo condiciones de vivero en el banco de germoplasma de especies suculentas (UDO-Biología), ubicado a 10°26'32" N, 64°09'14" O, Cumaná-Venezuela .

Preparación de láminas: Se colectaron ápices radicales que fueron pretratados con colchicina (0,05%) por 2,5 h y fijados en 3:1, etanol:ácido acético glacial por 48 h a 4°C (6). Las preparaciones cromosómicas se realizaron por aplastamiento, previo lavado con buffer citrato 0,01 M y maceración con solución enzimática pectinasa-celulasa 1,9 - 2% (5), por 40 - 50 min. Las láminas cubreobjeto fueron tratadas con CO₂ en estado sólido (hielo seco) por 2 min.

Protocolo básico para la tinción argéntica: Se procedió a

embeber las láminas en buffer borato (pH 9,22, tetraborato de disodio 0,01 M, diluido 1:1 en agua destilada) entre 5-10 min (5); posteriormente se colocó una gota de solución fresca de nitrato de plata (AgNO₃ a 0,5 g.mL⁻¹, disuelto en agua destilada - desionizada) sobre el preparado (1), y se empleó como cubreobjeto una malla fina de nylon de 0,243 mm (3, 5); los preparados se llevaron a una cámara húmeda por 15 - 60 min, o hasta obtener la intensidad de coloración deseada (revelado de nucleolos o bandas AgNOR de marrones a negras, y brazos de los cromosomas y núcleos interfásicos color crema) a 60°C, monitoreando los nucleolos cada 20 min bajo un microscopio Nikon LABOPHOT-2 a 40X. Cuando las láminas estuvieron listas se lavaron con abundante agua destilada desionizada (H₂O_{odd}) hasta retirar la malla y eliminar el exceso de reactivo (1, 2). Se secaron a temperatura ambiente, colocándoles aire para acelerar el proceso, y se empleó Entellan como medio de montaje. Las micrografías se tomaron en un microscopio Nikon OPTIPHOT - 2 con cámara digital Sony-DSC-52.

Resultados y discusión

Cambios en el protocolo: Con la combinación de los protocolos sobre colección de raíces, pretratamientos, fijado, montado de láminas y tinción argéntica se lograron láminas limpias, con metafases en

buen estado para la tinción AgNORs y se revelaron nucleolos con muy buena coloración (figura 1a); sin embargo, no se observaron NORs activos. En consecuencia, se realizaron cambios progresivos hasta obtener los resul-

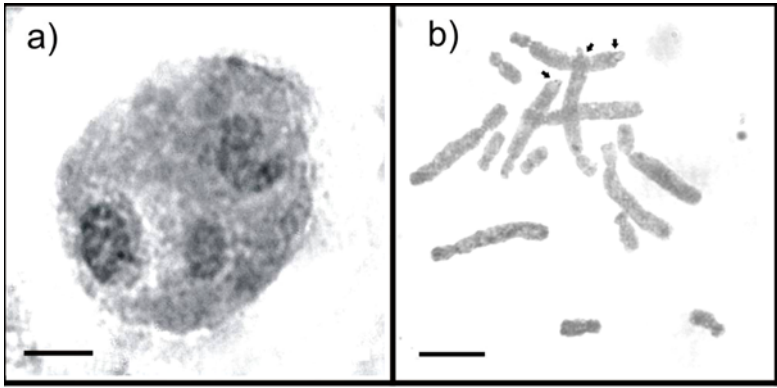


Figura 1. Tinción con nitrato de plata en metafase somática y núcleo interfásico de *Aloe petricola* 2n=14. a) núcleo con tres nucleolos Ag-positivos. b) metafase con tres NORs activos, señalados con flechas. Barra = 10 μ m.

tados deseados: buenas placas metafásicas, con cromosomas claros y zonas NORs activas fácilmente identificables.

El protocolo estandarizado fue: colecta de meristemas subapicales entre 8:00–9:00 am, lavado en agua corriente hasta limpiar completamente la superficie de las raíces, pretratamiento con colchicina (0,05%) por 2,5 h en ambiente oscuro, fijado con 3:1, etanol:ácido acético glacial por 48 h a 4°C y lavado con buffer citrato por 10 min. La digestión enzimática pectinasa–celulasa (1,5%) se realiza por 40 min, el lavado con buffer citrato por 10 min y el lavado con H₂O_d por 10 min. Luego de la disección y el macerado del tejido en ácido propiónico 45%, se procede a la selección de una mínima cantidad de tejido meristemático y disgregado del mismo. Posteriormente, se sigue con el aplastamiento de la lámina, congelación en hielo seco (CO₂ sólido) por 2

min y saltado rápido del cubreobjeto. Incubación de la lámina por 48 h a temperatura ambiente en un sitio hermético para evitar el polvo, lavado con H₂O_d y secado rápido. Incubación en buffer borato 0,01 M, pH 9 por 2 min y colocado de papel absorbente de algodón fino o de una malla de Nylon – Lycra (24 x 24 mm), bien embebidos de solución AgNO₃ 0,05 g.mL⁻¹. Luego se agrega una gota de la solución de AgNO₃ 0,05 g.mL⁻¹ sobre el preparado, con posterior incubación en cámara húmeda (con H₂O_d 15 min antes de ser empleada) a 60°C, monitoreo cada 10 min bajo el microscopio a 40X, lavado del preparado con lámina de papel absorbente de algodón fino a los 50 min (cuando el papel haya tomado una coloración marrón clara) o lavado del preparado con lámina de Nylon – Lycra a los 75 min de incubación (el lavado debe hacerse con abundante agua destilada), y secado rápido. Se coloca el

cubreobjeto con Entellan como medio de montaje, se incubaba por 24 h, y se procede al estudio microscópico.

No es recomendable incubar por más de 120 min a 60°C, ya que precipitan materiales que afectan la visibilidad de los cromosomas. También puede ocurrir que éstos se oscurezcan y no se diferencien de los NORs activos, pues la tinción con nitrato de plata es preferencial de sitios NORs, pero no específica, debido a que también reacciona con los cinetocoros (figura 1b), y finalmente, con los mismos cromosomas (2).

Los NORs observados coinciden con la ubicación y número de constricciones secundarias observadas en estudios previos (6), revelándose en los subtelómeros del brazo largo del par cromosómico gran-

de L_4 y en uno de los complementos del par L_2 (figura 1b). La cantidad de sitios activos siempre se presenta en número de tres, en todas las metafases examinadas, indicio de que todas las zonas de organización del nucleolo se encuentran activas al mismo tiempo. La heteromorfía señalada en el par L_2 , por ausencia de constricción secundaria y de tinción argéntica positiva, coincide con reportes anteriores (6), donde se observan bandas CMA+ DAPI- (zonas ricas en G - C) en el par cromosómico L_4 y en uno sólo de los cromosomas del par L_2 . El total de zonas NORs activas es igual al número máximo de nucleolos revelados en los núcleos interfásicos (figura 1a); un elemento más que corrobora la confiabilidad de la técnica en *Aloe petricola*.

Conclusiones

El protocolo estandarizado consistió en una combinación del protocolo señalado en la metodología (1, 3, 5), y variaciones en los lavados previos de las láminas, los tiempos de permanencia de las mismas en el buffer borato, la malla empleada como cubreobjeto (adaptación de la técnica

a las condiciones del laboratorio) y en el tiempo de permanencia de los preparados en la cámara húmeda. Los resultados muestran AgNORs activos en las regiones subteloméricas del brazo largo de uno de los cromosomas L_2 y en el par L_4 , coincidiendo con el número máximo de tres nucleolos.

Agradecimientos

Los autores desean manifestar su agradecimiento: a) al FONACIT, por la beca otorgada a Ysbelia Sánchez para una estadía en el Laboratorio de Citogenética del IMBIV (Córdoba, Argentina); b) al Dr. E. A. Moscone, por facilitar el Laboratorio de Citogenética del IMBIV para el aprendizaje básico de la técnica; c) a las Licenciadas C.

Acosta, y M. Scaldaferrro, por la colaboración facilitada durante la pasantía y d) al postgrado en Botánica de la UCV y al Instituto de Biología Experimental por facilitar las instalaciones y materiales para la estandarización de la técnica y completar el financiamiento para el desarrollo de la pasantía de estudios antes mencionada.

Literatura citada

1. Goodpasture, C. y S.E. Bloom. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalia chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37–50.
2. Hubbell, H. 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Tech.* 60:285–294.
3. Kodama, Y., M. Yoshida y M. Sasaki. 1980. An improved silver staining technique for nucleolar organizer regions by using nylon cloth. *Jno. J. Human Genet.* 25:229–233.
4. Matos, A., J. Molina y D. Acosta. 1998. Localización de NORs en cromosomas de *Aloe vera* L. (Aloaceae). *Acta. Bot. Venez.* 21:1–9.
5. Moscone, E., J. Loidl, F. Ehrendorfer y A. Hunziker. 1995. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer. J. Bot.* 82:276–287.
6. Sánchez, Y., A.C. Acosta, M. Raymúndez, J. Imery y E.A. Moscone. 2005. Bando Cromosómico de Fluorescencia en *Aloe* L. (Aloacea). *SABER.* 17: 105–107.