

Determinación del proceso mitótico en células radicales de *Prosopis juliflora* DC.

Angela Matos*, Julia Molina, Délima Acosta y Mercedes Abreu

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia
Maracaibo 4001, Venezuela

Recibido: 6-10-94 Aceptado: 11-05-95

Resumen

Se llevó a cabo un estudio citogenético en células radicales de *Prosopis juliflora* DC (Cují) utilizando la técnica de aplastamiento con aceto-orceína, con el objeto de determinar el índice mitótico (IM) y observar las etapas del proceso. Se demostró que la hora mitótica estaba comprendida entre las 9:00 y 9:30 a.m. y el IM fue igual a 9,68%. Se contaron 1549 células en total. Las frecuencias de los estadios mitóticos fueron: 64 células en profase; 52 en metafase; 20 células en anafase; y 14 en telofase. Además, se contaron 1399 células en interfase. Los índices de fases (IF) obtenidos fueron: 42,66 en profase; 34,66 en metafase; 13,33 en anafase; y 9,33 en telofase. Todas las etapas de la mitosis fueron observadas y se describen las características de cada fase.

Palabras claves: Células radicales; índice mitótico; mitosis; *Prosopis juliflora* DC.

Determination of the mitotic process in root tip cells of *Prosopis juliflora* DC

Abstract

A cytogenetic study in root tip cells of *Prosopis juliflora* DC (Cují) was carried out using squash technique with acetic-orcein in order to determinate the mitotic index (MI) and to observe the stages of mitosis. It was found that the mitotic hour was between 9:00 and 9:30 a.m. and MI was 9.68%. 1,549 cells were counted. The frequencies of the mitotic stages were: 64 cells at prophase; 52 at metaphase; 20 cells at anaphase; and 14 at telophase. In addition, 1,399 cells at interphase were counted. The phase indexes (FI) obtained were: 42.66 at prophase; 34.66 at metaphase; 13.33 at anaphase; and 9.33 at telophase. All of the mitotic phases were observed and the characteristics of each phases described.

Key words: Mitosis; mitotic index; *Prosopis juliflora* DC; root tip cells.

Introducción

El cújí, *Prosopis juliflora* DC, es un árbol autóctono de la región venezolana, encontrado frecuentemente a la largo del litoral, así como en regiones netamente áridas, soportando la sequía del suelo y el intenso sol (1). Este árbol mide de 5 a 12 m,

de altura y presenta un tronco corto y muy ramificado, con hojas compuestas y bipinnadas (2). Sus flores son blanco-amari-llentas, agrupadas en espigas axilares de 5 a 10 cm de longitud (2), por lo que este árbol queda incluido en la familia Mimosaceae (Leguminosae) (1). La reproducción del cújí (*P. juliflora* DC) es por semilla (2); presentan-

* Autor para la correspondencia.

do un crecimiento un tanto lento. Su sistema radical es profundo. El cují posee gran resistencia a las sequías y es de vida larga (1).

Como se sabe, los tejidos vegetales o animales, con células en proliferación, desarrollan el ciclo de división celular. El estudio clásico de la división celular por mitosis establece un período de interfase, en donde la célula aparentemente no presenta cambios morfológicos y otro período de división en sí, que cubre las etapas de profase, metafase, anafase y telofase, mediante las cuales se obtienen dos células con igual número de cromosomas que la célula original (5).

La espectacularidad del proceso de división del núcleo, junto a la falta de técnicas para abordar el estudio de la interfase, condicionó el que los investigadores centraran su atención en la mitosis (5).

El término mitosis generalmente es usado para cubrir el proceso de división celular, aunque en un sentido estrictamente etimológico, se refiere solamente a la división nuclear de las células eucarióticas (6). El proceso de mitosis en las células eucarióticas es un asunto bastante complejo, con los estadios convencionales ya conocidos en los tejidos de las plantas (7).

En las plantas, en regiones de crecimiento de raíces, tallos y otros órganos, existen tejidos denominados "meristemáticos", cuya característica primordial es la división rápida y continua de las células. En los ápices de las raíces, las células se duplican mitóticamente cada 12 a 24 horas (7).

Las células radicales de cebolla, *Allium cepa* L. y las de habichuela, *Vicia faba* L. han sido ampliamente usadas para llevar a cabo estudios sobre el ciclo de división celular y la mitosis en sí (6), debido a su fácil disponibilidad y manejo, sencillas condiciones de crecimiento, bajo costo y otras características. El uso de este material, teñido con diferentes colorantes, ha proporcionado

una gran cantidad de datos cuantitativos así como cualitativos sobre los efectos citológicos de drogas (5), estudios citotaxómicos (8-11), mejoramiento genético de especies vegetales (e.g., trigo, *Triticum aestivum* L., (12); maíz, *Zea mays* L. (13-17); alfalfa, *Medicago sativa* L. (18)) y otros que contribuyen a enriquecer el conocimiento sobre la citología de los organismos estudiados.

Casi todas las plantas terrestres fotosintéticas y virtualmente todos los animales multicelulares han sido estudiados citológicamente (6). Esto sugiere que el significado de la división celular es fundamental para el conocimiento de la genética de un organismo.

Sin embargo, la revisión bibliográfica realizada muestra que actualmente no existen reportes científicos sobre la citología del cují (*Prosopis juliflora* DC), lo cual es motivante para realizar un estudio citogenético, aunado al hecho de que éste es un árbol muy abundante en tierras venezolanas con vegetación de bosque seco tropical.

Para realizar este estudio, existe un extenso número de procedimientos y técnicas desarrolladas para visualizar la conducta mitótica de las plantas, entre las cuales se tienen las técnicas de aplastado (squash), las cuales son fáciles, rápidas y muy convenientes.

En este trabajo se llevó a cabo un estudio citogenético en células radicales de *Prosopis juliflora* DC. Para ello, se utilizó la técnica de aplastado con aceto-orceína, con el objeto de determinar la hora mitótica y el índice mitótico (IM) así como también calcular las frecuencias de las fases de la mitosis además de realizar una descripción de los diferentes estadios mitóticos. Fue propósito de este estudio aportar información sobre el proceso mitótico de *P. juliflora* DC con el fin de que sirva como base para investigaciones posteriores sobre esta plan-

ta de tan amplia distribución en suelos venezolanos.

Materiales y Métodos

Se utilizaron semillas de *Prosopis juliflora* DC obtenidas directamente de las legumbres de las plantas. Las semillas se lavaron con agua destilada y jabón, luego se escarificaron con una lima y se imbibieron en agua destilada por 15 min. Finalmente se colocaron en placas de petri con papel filtro humedecido con agua destilada a 25°C. Cuando las raíces alcanzaron 2 a 2,5 cm de longitud, se cortaron en un lapso de tiempo comprendido desde las 6:00 hasta las 10:00 a.m. con intervalos de corte de 30 min. Una vez cortadas las raicillas, éstas se fijaron en Carnoy (etanol-ácido acético 3:1) y se colocaron en nevera por 24 h a 4°C. Después de la fijación, se lavó el material en etanol al 70% y se hidrolizó el tejido en HCl 50% durante 10 min a 60°C en baño de maría. Para la tinción de las raíces, se usó aceto-orceína 2% y el extremo apical de la raíz, calentándose levemente en mechero. Se hizo el aplastado cuidando de no romper ni deslizar el cubreobjetos.

El cálculo del número de células a estudiar o tamaño de la muestra "n", se realizó utilizando la siguiente ecuación estadística (19):

$$n = Z^2 \cdot \alpha/2 \cdot S^2n / e^2 \quad [1]$$

donde $Z \alpha/2$ es el valor de la abscisa, levantada sobre la distribución normal (delimita el 95%), representando un nivel de confianza Z de 1,96; S_n es la desviación estándar de los valores del estudio; e representa el error de muestreo, con un valor del 10% de la media de los valores del estudio.

Según esta ecuación estadística, 1188 es el número mínimo de células que deben analizarse para obtener resultados confiables. En este trabajo se estudió un total de 1.549 células, discriminadas en células en interfase y células en mitosis. Los cálculos del Índice Mitótico (IM) y de los Índices de

Fases (IF) en *P. juliflora* DC se llevaron a cabo usando las ecuaciones utilizadas por Del campo (5) en trabajos realizados con *Zephyranthes* sp. (cebollín). De esta manera, el Índice Mitótico (IM) se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$IM = (\text{No. de células en mitosis} / \text{No. total de células}) \times 100 \quad [2]$$

El cálculo del Índice de Fase (IF) se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación para los conteos de células realizados en cada una de las fases de la mitosis:

$$IF = (\text{N. de células en fase} / \text{No. total de células en mitosis}) \times 100 \quad [3]$$

Por último, se llevó a cabo el análisis microscópico de las preparaciones. Las microfotografías se ampliaron 1000X en un microscopio ZEISS con cámara incorporada, usando películas a color KODAK 135 mm asa 100/21°.

Resultados

El estudio microscópico de las poblaciones meristemáticas en mitosis y en interfase permitió conocer cuantitativamente estos periodos en *P. juliflora* DC. En este trabajo se observó un mayor número de células en mitosis a las 9:30 a.m. Los datos que se presentan en las Tablas 1 y 2, que son discutidos en este estudio, corresponden a los conteos realizados a dicha hora. Las frecuencias de las diferentes fases de la mitosis en *P. juliflora* DC se muestran en la Tabla 1. Para tal efecto se analizaron 1549 células y se obtuvieron los siguientes resultados: se contaron 64 células en profase, 52 en metafase, 20 células en anafase y 14 en telofase, para un subtotal de 150 células en mitosis y 1399 células en interfase.

De acuerdo con la Tabla 2 y la Figura 1, todas las fases de la mitosis fueron observadas. Los índices de fases obtenidos para células de meristemas radicales de *P. juliflora* DC son: 42,66 para la profase, 34,66 para

Tabla 1
Frecuencias de la mitosis y de la interfase en
Prosopis juliflora DC

Fase	Frecuencia (No. de células)
Profase	64
Metafase	52
Anafase	20
Telofase	14
Total Mitosis	150
Interfase	1399
Total General ^a	1549

a Total General = No. total de células en mitosis más número total de células en interfase.

Tabla 2
Indices de fases mitóticas en
Prosopis juliflora DC

Fases	Profase	Metafase	Anafase	Telofase
Indices	42,66	34,66	13,33	9,33

metafase, 13,33 en anafase y 9,33 en telofase. Es necesario recalcar que el IF señala el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases de la mitosis al realizar el estudio.

La Figura 2 muestra los porcentajes de células que se encontraban en mitosis y en interfase a la hora del corte (9:30 a.m.). Cuando se calcula el IM, éste indica el porcentaje de células que se encontraban en mitosis. Si se supone que todo el ciclo celular dura 100% y el IM 9,68, entonces el porcentaje de células en interfase será igual a 90,32.

Discusión

Las raicillas son un excelente material para estudios celulares y cromosomales en plantas. Es por ello que este estudio se llevó

a cabo utilizando células del tejido meristemático de raíces de *Prosopis juliflora* DC.

Hasta donde nos fue posible conocer, el estudio de la mitosis en *P. juliflora* DC no ha sido reportado en la literatura científica. Por ello, los resultados obtenidos en este trabajo se relacionaron con aquéllos descritos en estudios similares realizados con otras especies vegetales.

Determinación de la hora mitótica y del Índice Mitótico (IM)

El número de células que se encuentran en mitosis en las especies vegetales varía de una a otra. Más aún, en la misma planta el número de células en mitosis no es igual a todas horas (6). Por lo general, en células de meristemas radicales la hora mitótica se encuentra en horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 a.m. (6). Otros autores han investigado la hora mitótica en células radicales de diferentes plantas. Zabala y Molina (20) demostraron que la hora mitótica de la lechoza, *Carica papaya*, var. Thailandia red, estaba entre las 7:00 y 7:15 a.m. En el material de estudio y a través de la metodología utilizada se encontró que la hora mitótica estaba comprendida entre las 9:00 y 9:30 a.m.; es decir, durante este período de tiempo ocurrió la mayor actividad mitótica en las células radicales de *Prosopis juliflora* DC.

El índice mitótico se refiere al porcentaje de células que se encuentran en mitosis. Diversos autores han realizado estudios sobre índice mitótico con distintos propósitos y con diferentes especies, entre ellos Del Campo (5), utilizando *Zephyrantes sp.* (cebollín) con el fin de estudiar los cambios citológicos al aplicar distintas drogas a los meristemas radicales. De igual manera, Rickards (21) estudió el comportamiento mitótico en inflorescencias de *Allium triquetrum* (Liliaceae).

De acuerdo con lo que se conoce, la mitosis ocupa sólo del 5% al 10% del total del ciclo celular (21). Los resultados conse-

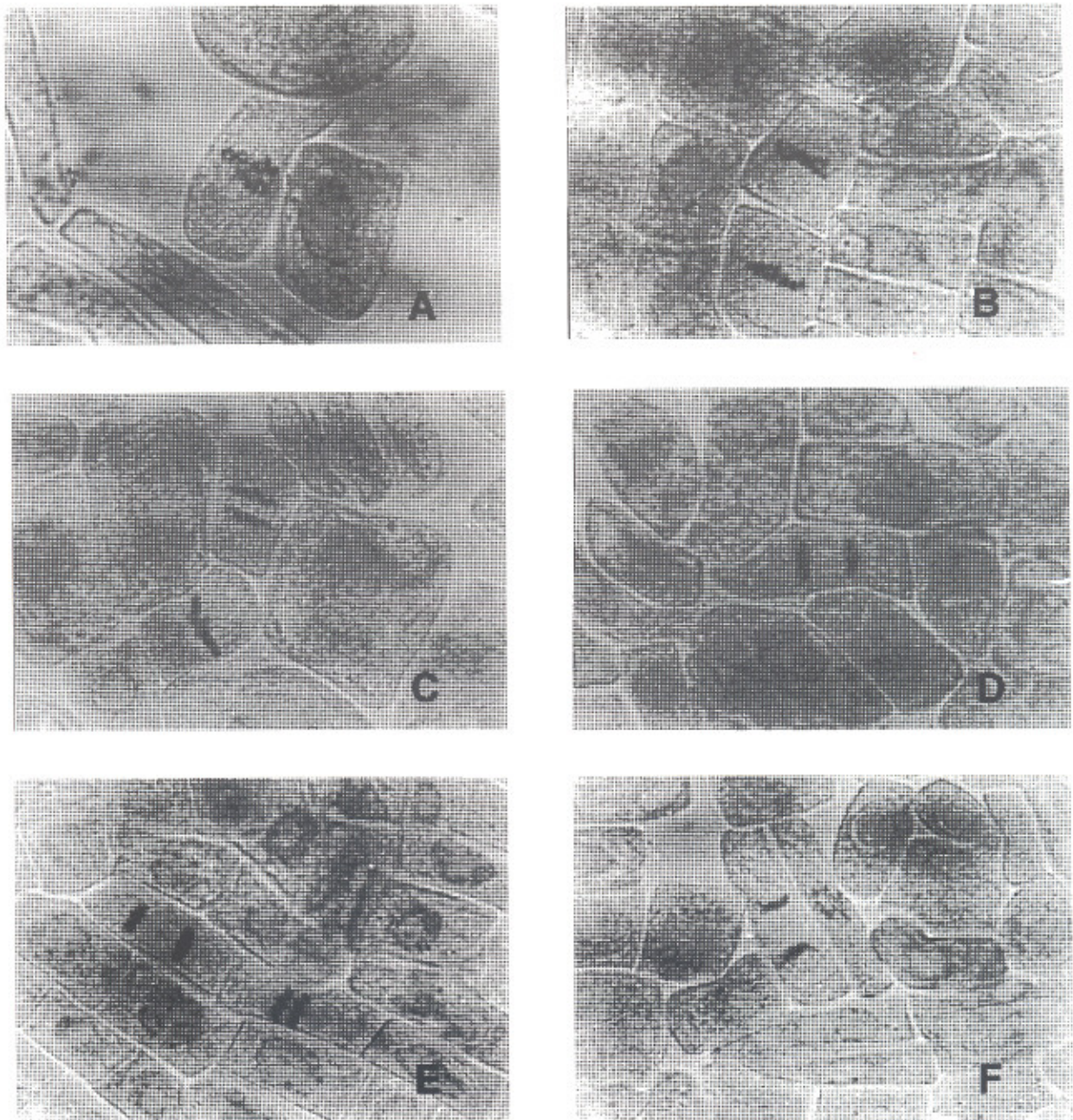


Figura 1: Microfotografías de células en mitosis del meristema radical de *Prosopis juliflora* DC X 1000. A) Célula en profase. Se observa también una célula en interfase. B) Dos células en metafase. Se observan también células en interfase. C) Se observa una célula en anafase temprana. Puede notarse también una célula en metafase y varias en interfase. D) Célula en anafase, las restantes células se encuentran en interfase. E) Se observa una célula en anafase temprana y otra célula en telofase. F) Célula en telofase tardía en la cual puede notarse levemente la placa celular formándose. Puede verse también una célula en profase y otras en interfase.

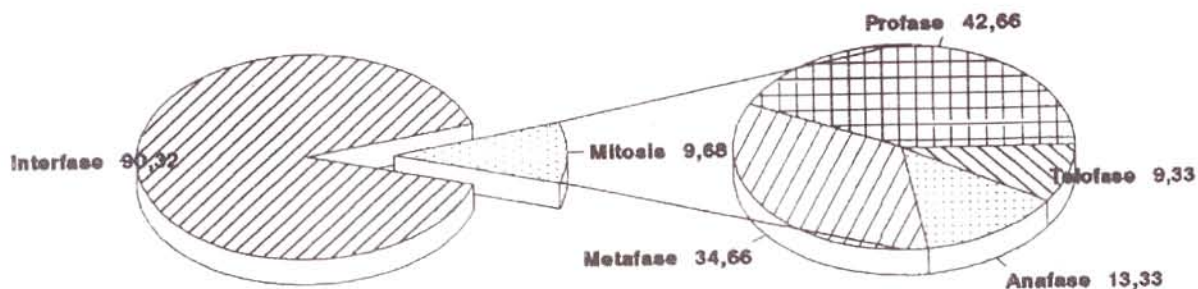


Figura 2: Períodos de mitosis e interfase en meristemas radicales de *Prosopis juliflora* DC. El período de interfase ocupa un 90,32% del ciclo celular mientras que la mitosis alcanza un 9,68%. En la figura también se muestran los índices de fases (IF) correspondientes a cada una de las fases de la mitosis.

guidos en este trabajo de investigación confirman lo reportado anteriormente ya que el índice mitótico obtenido fue 9,68, lo cual significa que el ciclo mitótico de *Prosopis juliflora* DC en este estudio tiene un 9,68% del total del ciclo celular, quedando un 90,32% que corresponde al período de interfase (Figura 2).

Descripción del proceso mitótico en *Prosopis juliflora* DC.

En el ciclo de división celular pueden distinguirse dos períodos principales: 1) la interfase y 2) las etapas de división de la mitosis. La interfase es el período entre las divisiones mitóticas, en el cual el material genético de la célula se prepara para la mitosis (22). En general muestra pocos cambios morfológicos de fácil observación microscópica (7) y los cromosomas comúnmente no son visibles porque se encuentran en un estado de dispersión muy intenso (23).

Los estadios de la mitosis son relativamente cortos comparados con la larga duración de la interfase, pero todas las fases pueden ser variables en longitud, dependiendo del organismo o la especie, tipo de célula, temperatura y otras variables externas (6, 22).

Los índices de fases (e.g., los porcentajes de células presentes en cada uno de los estadios de la mitosis) encontrados en este estudio se muestran en la Tabla 2. Comparando con los datos aportados por Del Campo (5), los índices de fases no sufren alteraciones, manteniéndose dentro de los límites normales, excepto para la telofase cuyo valor fue menor. Según Raven *et al.* (22), las fases de la mitosis son variables, sin embargo la profase es la más larga y la anafase es la más corta. Esto último contradice lo encontrado en este trabajo donde la telofase fue el estadio que se halló con menor porcentaje en el ciclo mitótico de *P. juliflora* DC. Esta situación podría explicarse por efecto de la temperatura, tipo de célula, tipo de organismo o especie, longitud de la raíz al ser cortada y otras variables (5, 6, 22).

El proceso mitótico de *P. juliflora* DC aparece como una serie de acontecimientos morfológicos que incluyen la condensación de la cromatina y la desorganización y nueva organización del núcleo en dos células hijas.

La Figura 1 muestra las diferentes etapas de la mitosis en *P. juliflora* DC observadas en este estudio. Nuestras observaciones, que fueron eminentemente descriptivas, confirman lo que se conoce hasta hoy

día sobre el proceso mitótico en células vegetales.

En este sentido, las frecuencias de las fases mitóticas (Tabla 1) permanecen dentro de los rangos normales reportados en la literatura (22, 23) con excepción de la telofase cuya frecuencia fue menor, lo cual puede explicarse tomando en cuenta las variables antes mencionadas para los IF, tales como temperatura, longitud de la raíz al ser cortada y otras más (5, 6, 22).

La profase es la fase donde los cromosomas sufren una fuerte contracción y comienzan a hacerse visibles (6, 22) mediante un proceso de enrollamiento o plegamiento (23). En la Figura 1A puede observarse que la célula aumenta de tamaño y de igual manera el núcleo se hace más grande. La profase es el estadio dominante en la mitosis de *P. juliflora* DC con un índice de fase de 42,66 (Tabla 2).

La metafase es el período que sigue a la profase y es un estado de equilibrio momentáneo (6). En este estadio, los cromosomas están unidos por los centrómeros y se disponen en el centro de la célula en lo que se conoce como plano ecuatorial (Figura 1B). El huso acromático que comienza a formarse desde la profase y está presente en metafase y anafase (22) no es visible en nuestras preparaciones. El índice de fase (IF) obtenido para esta división según el presente estudio fue 34,66 (Tabla 2).

La anafase es un período de movimiento del ciclo mitótico en el cual las cromátidas hermanas de los cromosomas se mueven hacia los polos opuestos de la célula (Figuras 1C, 1D, 1E). Este estadio tuvo un índice de fase (IF) igual a 13,33.

En la telofase se constituyen dos núcleos a partir de cada uno de los grupos polares de cromosomas para formar lo que serán las próximas células hijas (Figuras 1E, 1F). Comienza a formarse de nuevo la membrana nuclear y los cromosomas pierden su estructura compacta para pasar

otra vez al estadio de interfase y entonces la citocinesis divide la célula en dos con igual carga genética (6, 7). El índice de fase (IF) obtenido para la telofase en el ciclo mitótico de *P. juliflora* DC fue 9,33.

El presente trabajo es un aporte para lograr el pleno conocimiento de la citogenética del cují. Sin embargo, se hace indispensable realizar estudios cariotípicos adicionales que permitan la apreciación cuantitativa de los cromosomas y de la morfología de éstos.

Referencias Bibliográficas

1. HOYOS J.: Guía de árboles de Venezuela. Segunda Edición, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas (Venezuela), 1987, pp. 186.
2. HOYOS J.: Los árboles de Caracas. Tercera Edición, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas (Venezuela), 1990, pp. 241.
3. SCHNEE L.: **Plantas comunes de Venezuela**. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Caracas (Venezuela), 1973, pp. 249.
4. ARISTIGUIETA L.: **Familias y géneros de los árboles de Venezuela**. Edición Especial Instituto Botánico. Dirección de Recursos Naturales Renovables. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas (Venezuela), 1973, pp. 388.
5. DEL CAMPO A.: **Biología del ciclo de división celular**. Ediciones Astro Data S.A. Maracalbo (Venezuela), 1988, pp. 37-38.
6. SWANSON C., MERZ T., YOUNG W.J.: Cytogenetics. **The chromosome in division, inheritance, and evolution**. Second Edition, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (U.S.A.), 1981, pp. 138-140, 184-195.
7. NOVIKOFF A.B., HOLTZMAN E.: **Estructura y dinámica celular**. Segunda Edición.

- ción, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, 1978, pp. 289-299.
8. CAI Q., LU S., CHINNAPPA C.C.: Analysis of karyotypes and Giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. *Genome* 29:187-194, 1987.
 9. LINDE-LAURSEN I., BOTHMER R., JACOBSEN N.: Giemsa and C-banded karyotypes of *Hordeum marinum* and *H. murinum*. *Genome* 32:629-639, 1989.
 10. LEE M., PHILLIPS R.L.: Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome* 29:122-128, 1987.
 11. TORABINEJAD J., CARMAN J.G., CRANE C.F.: Morphology and genome analyses of interspecific hybrids of *Elymus scabrus*. *Genome* 29:150-155, 1987.
 12. YOUSSEF S.S., MORRIS R., BAENZIGER P.S., PAPA C.M.: Cytogenetic studies of progenies from crosses between 'Centurk' wheat and its doubled haploids derived from anther culture. *Genome* 32:622-628, 1989.
 13. BEJARANO A., SEGOVIA V., ROSALES N., MORENO A., ANDRADE L.: Impacto del desarrollo de híbridos en la producción maicera. *FONAIAP Divulga* 9 (37):14, 1993.
 14. SIERRA M., PRECIADO R.E., ALCAZAR J.J., RODRIGUEZ F.A.: Selección familiar de progenies de hermanos completos en poblaciones de maíz para el trópico mexicano. *Turrialba* 41 (2):202-210, 1991.
 15. ARBOLEDA F., DIAZ C., RIVERA J., MORENO J.: Programa nacional de maíz: objetivos, resultados y proyecciones. *ICA Actualidades* 2 (23):1-2, 1988.
 16. DIAZ C., BOTERO M.E., ARBOLEDA F., RIVERA J.: Banco colombiano de germoplasma de maíz I. Adaptación de las colecciones colombianas. *ICA Actualidades* 2 (23):3-4, 1988.
 17. LEE M., PHILLIPS R.L.: Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. *Genome* 29:834-838, 1987.
 18. DENTON C.R., McCOY T.J.: Cytogenetic analysis of interspecific hybrids between alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *M. rhodopea* Velen. *Genome* 29:853-858, 1987.
 19. WAYNE D.: *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Primera Edición, Editorial Limusa. México, 1985, pp. 485.
 20. ZABALA D., MOLINA J.: Determinación del proceso mitótico en *Carica papaya* var. Thailandia red. pp. 230. *XI Congreso Venezolano de Botánica*, Mérida (Venezuela), 1993.
 21. RICKARDS G.K.: Differential mitotic behaviour of genetically balanced and unbalanced microspores of an interchange heterozygote of *Allium triquetrum*. *Can J Genet Cytol* 28:926-931, 1986.
 22. RAVEN P., EVERT R.F., CURTIS H.: *Biology of plants*. Second Edition, Worth Publishers, INC. New York (U.S.A), 1976, pp. 39-46.
 23. DE ROBERTIS E.D.P., SAEZ F.A., DE ROBERTIS E.M.F.: *Biología celular*. Novena Edición, Editorial El Ateneo. Buenos Aires (Argentina), 1978, pp. 19-24, 240-255.