ALTERACIONES INDUCIDAS POR LOS RAYOS X EN LOS CROMOSOMAS DE LAS CELULAS MERISTEMATICAS DE LA RAIZ DE *VICIA FABA*

I. ASPECTOS TECNICOS

por

Rafael Villalobos-Pietrini *

INTRODUCCION

Uno de los fenómenos más importantes en el estudio de la radiosensibilidad de las plantas es la inducción de aberraciones en los cromosomas de las células irradiadas (Figs. 1, 2 y 3). Las porciones separadas por la acción directa o indirecta de las radiaciones ionizantes (Giles⁵, Lea⁷, Revell⁸, Thoday y Read⁹), pueden permanecer abiertas (Fig. 2), reunirse ilegítimamente (Fig. 3) o restituirse a su posición inicial, originando una diversidad de aberraciones¹⁰ que son clasificadas en dos grupos según el momento en que se han producido: las cromosómicas, inducidas antes de la síntesis del DNA, o sea en el período G₁ y las cromatídicas, producidas después de la síntesis del DNA, correspondiendo al período G₂.

El material seleccionado para éste estudio fué el meristemo de la raíz de *Vicia faba*, debido a que el gran tamaño de sus cromosomas y su reducido número (2N = 12) son características que permiten considerarlo como una de las especies más favorables para el análisis citogenético de los efectos producidos por las radiaciones ionizantes. Las condiciones que deben presentar estos cromosomas para ser observados en forma precisa son las siguientes: a) Contraídos, lo cual se logra cuando se encuentran en metafase, b) Dispersos, para facilitar su identificación y claro análisis, y c) Colocados en un solo plano óptico.

Con objeto de obtener un aumento marcado en los conteos de metafases se usó la colchicina, que es uno de los inhibidores del huso acromático más eficientes (Evans, Neary and Tonkinson⁴).

El contraste sobre el citoplasma se logró por medio del verde Janus B, el que añadido a la aceto-orceína permitió cromosomas perfectamente individualizados y muy teñidos, mejores que los obtenidos con el sólo método de la aceto-orceína (LaCour⁶).

Magníficas preparaciones de cromosomas de glándulas salivales y ganglios cerebrales de *Drosophila melanogaster* han sido logradas usando la aceto-orceína-verde Janus B (Cordeiro²).

La extensión y distribución de los cromosomas en un solo plano óptico fué posible mediante el método de presión (squash) con la goma de un lápiz y cuidando la inmovilidad del cubreobjetos.

* Laboratorio de Genética Vegetal. Programa de Genética. Comisión Nacional de Energía Nuclear. Plateros 7-104, México 19, D.F.

La germinación de las semillas de *Vicia faba* var. mayor se efectuó en recipientes de unisel (poliestireno expandible) con vermiculita o entre dos capas de algodón húmeda, a 20° más o menos 1°C. Tres o cuatro días después se pasaron a agua corriente. A los diez días las raíces principales presentaron de cinco a diez raíces laterales que fueron las empleadas en la técnica citológica.

El proceso de irradiación se realizó mediante una fuente de rayos X Müller RT 250 que operó a 250 KV y 10 mA, con un filtro de 0.5 mm. de Cu. Como resultado de numerosos experimentos, la dosis que permitió el mejor y más claro registro de las aberraciones fué de 150 roentgens con una intensidad de 100 r/min.

Las semillas en germinación fueron colocadas sobre una delgada capa de algodón húmedo en cajas de Petri e irradiadas en grupos de dos, controlando el proceso de un dosímetro (Phillips, tipo 37470) y una cámara de ionización (Phillips, número 3748/00).

Posteriormente a la irradiación se aplicaron tratamientos con diversas temperaturas, proceso descrito en otra publicación¹⁰.

Después de estos tratamientos las raíces fueron fijadas a varios tiempos de recuperación, en los que permanecieron en agua corriente a 20°C. (temperatura usada como control) y en la obscuridad.

PROCEDIMIENTO DE FIJACION-TINCION

Solución No. 1 Disolver 3 gm. de orceína sintética (G.T. Gurr) en 100 cc. de ácido acético al 70%, calentar y filtrar.

Solución No. 2 Disolver 2 gm. de orceína sintética (G. T. Gurr) en 100 cc. de ácido acético al 60% y agregar 2.5 gm. de verde Janus B (Mathe-son, Coleman and Bell), calentar y filtrar.

1.—Cortar 2 mm. de las puntas de las raíces laterales cuya longitud sea menor de 3.5 mm.

2.—Sumergir las raíces en 0.1% de colchicina por cuatro horas.

3.—Hidrolizar con HCl N a la temperatura ambiente, 8 minutos.

4.—Colocar en la solución No. 1, 18 minutos.

5.—Pasar a la solución No. 2, 4 minutos.

6.—Presionar (squash), en una gota de ácido acético al 45%, sobre el cubreobjetos por medio de la goma de un lápiz.

Se pueden hacer dos tipos de preparaciones: a) Transitorias, sellando los bordes del cubreobjetos con cemento Kronig (G.T. Gurr) o con parafina, y b) Permanentes, colocando la preparación, sellada o no, unos minutos en hielo seco (Conger

y Fairchild¹), separando después el cubreobjetos con un bisturí y sumergiéndola en alcohol de 96%, alcohol absoluto, xilol y finalmente montándola en bálsamo de Canadá. En lugar de emplear alguna substancia adhesiva, como la albúmina, en el porta o cubreobjetos, para impedir pérdidas de material se usaron cubreobjetos siliconizados que provocaron la adhesión al portaobjetos.

Al sacar las raíces de la colchicina fueron colocadas en portaobjetos siliconizados a los que se agregaron dos gotas de HCl N. Este tipo de portaobjetos fué muy fácil manipular las raíces y secarlas perfectamente.

Todos los pasos de la técnica hasta el número 5 fueron realizados en los mismos portaobjetos, de los cuales se pasaron las raíces con agujas de disección a portaobjetos sin tratar, añadiéronse dos gotas de ácido acético al 45% y finalmente se hizo presión (squash) sobre los cubreobjetos siliconizados (Silicon General Electric Sc-87).

La colchicina (Merck) resultó muy eficiente a una concentración de 0.1% aplicada durante cuatro horas, al no inhibir la entrada de las células en mitosis y bloquear un elevado número de ellas en metafase.

En lo referente a la fijación-tinción, éstas se verificaron simultáneamente con las soluciones descritas anteriormente (Darlington y LaCour²).

Para llevar a cabo la presión (squash) se usó también agua corriente en vez del ácido acético, lográndose buenos resultados cuando se hizo con rapidez.

RESUMEN

Se describe la aplicación de un nuevo método de fijación-tinción a base de verde Janus B agregado a una solución de aceto-orceína y el empleo de material siliconizado, lográndose preparaciones permanentes con cromosomas muy contrastados y bien extendidos, lo que facilita el análisis de los rompimientos y rearrreglos inducidos por las radiaciones ionizantes.

SUMMARY

The use of a new method of fixation-staining by adding Janus green B to an aceto-orcein solution and the employment of siliconized material have permitted the attainment of permanent slides with well contrasted and scattered chromosomes, thus facilitating the analysis of ruptures and rearrangements produced by ionizing radiations.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Conger, A. D. and Fairchild, L. M., 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology* 28: 281-283.
- 2.—Cordeiro, A. R., 1957. Orcein with Janus green B for better salivary gland chromosomes staining. *D.I.S.* 31: 174.
- 3.—Darlington, C. D. and LaCour, L. F., 1960. The handling of chromosomes. Edit. G. Allen and Unwin Ltd.
- 4.—Evans, H. J., Neary, G. H. and Tonkinson, S. M. 1957. The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristem. *J. Genetics* 55: 487-502.
- 5.—Giles, N. H. 1954. Radiation induced chromosome aberrations in *Tradescantia*. In *Radiation biology*. Edit. A. Hollaender. Vol. 1 pp. 713-761. McGraw-Hill, New York.
- 6.—LaCour, L. F., 1941. Acetic-orcein: A new stain-fixative for chromosomes. *Stain Technology* 16:169-174.
- 7.—Lea, D. E., 1955. Actions of radiations on living cells. Cambridge Univ. Press. Cambridge, England.
- 8.—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: 563-589.
- 9.—Thoday, J. M. and Read, J., 1947. Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by X-rays. *Nature* 160: 608-610.
- 10.—Villalobos-Pietrini, R., Cruz Teresa y Almanza, F., 1964. Alteraciones inducidas por los rayos X en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. II. Influencia de la temperatura en la frecuencia de las aberraciones cromatídicas. *Memorias del V Simposio Interamericano de Energía Nuclear para fines pacíficos* (Valparaíso, Chile). En prensa.

Fig. 1.—Complemento cromosómico 2N de una célula del meristemo terminal de la raíz de **Vicia faba** en metafase. Fijación y tinción por el método del verde Janus B-aceto-orceína.

Fig. 2.—Cromosomas en metafase de una raíz de **Vicia faba** irradiados con 150 roentgens de rayos X. Fijación y tinción por el método del verde Janus B-acetato-orceína. La flecha muestra un rompimiento del centrómero.

Fig. 3.—Cromosomas de **Vicia faba** irradiados con rayos X (150 r). Las flechas muestran dos anillos producidos por rompimientos isocromatídicos con la reunión asimétrica subsecuente de las porciones proximales así como de las distales.