








Baja temperatura, una alternativa al uso de colchicina para análisis cromosómicos en fresa (*Fragaria* L.) y zarzamora (*Rubus* spp.)

Vélez-Torres, Marcelina¹ ; Julián-Ramírez, Fanny Lisette² ;
 Calderón-Zavala, Guillermo¹ ; Flores Hernández, Luis Antonio³ ;
 Lobato-Ortiz, Ricardo¹ ; Cruz Gutiérrez, Esmeralda Judith⁴ ; Corona-Torres, Tarsicio^{1*} 

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco Km 36.5. Montecillo, Texcoco, México. C. P. 56264.

² Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco Km 38.5. Chapingo, Texcoco, México. C. P. 56230.

³ INIFAP-CIRPAS. Campo experimental Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan Km 2.5. Iguala de la Independencia, Guerrero, México. C. P. 40000.

⁴ INIFAP-CNRG, Tepatitlán, Jalisco. Boulevard de la biodiversidad 400. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. C. P. 47600.

* Autor para correspondencia: tcoronat@colpos.mx

Cómo citar: Vélez-Torres, M., Julián-Ramírez, F.L., Calderón-Zavala, G., Flores Hernández, L.A., Lobato-Ortiz, R., Cruz Gutiérrez, E. J., Corona-Torres, T. (2024). Baja temperatura, una alternativa al uso de colchicina para análisis cromosómicos en fresa (*Fragaria* L.) y zarzamora (*Rubus* spp.). *Agro-Divulgación*, 4(1). <https://doi.org/10.54767/ad.v4i1.277>

Editores académicos: Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza y Dr. Jorge Cadena Iniguez.

Publicado en línea: Marzo, 2024.

Agro-Divulgación, 4(1). Enero-Febrero. 2024. pp: 19-23.

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International



Problema

La colchicina es un alcaloide proveniente de la especie *Colchicum autumnale*, su uso para análisis citogenéticos permite realizar observaciones en una etapa del ciclo celular donde los cromosomas se encuentren condensados. El efecto esencial de la colchicina es evitar la polimerización de la tubulina durante la formación del huso mitótico que causa el bloqueo de la “metafase” durante la cual los cromosomas están densos y pueden observarse bajo microscopio. Esta estrategia permite determinar: número cromosómico; nivel de ploidía; cariotipo; morfología y estructura cromosómicas en especies con cromosomas de tamaño grande; mantenimiento o pérdida de la estabilidad cromosómica. Sin embargo, la capacidad que tiene la colchicina para unirse a las subunidades de los microtúbulos y bloquear a la mitosis en las células de plantas, puede provocar reacciones adversas, tóxicas o mutagénicas a las células de los mamíferos, lo cual significa un riesgo latente a los usuarios que utilizan este compuesto. Por lo tanto, es conveniente proponer alternativas más seguras a fin de realizar análisis citogenéticos sobre las plantas, sin efecto dañino al personal que lo efectúa.

Solución planteada

Una alternativa para realizar estos análisis citogenéticos en plantas es mediante el uso de baja temperatura, este método no presenta riesgos para el ser humano y permite obtener resultados similares a los proporcionados por la colchicina. Con la exposición de las células vegetales en agua fría de 0 a 4 °C durante un período determinado de tiempo, se afecta el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos, que provoca su despolimerización, de esta manera se inhibe la formación del huso mitótico y se interrumpe el proceso de mitosis deteniendo las células en metafase. En este trabajo se presentan las evidencias de aplicar el tratamiento de baja temperatura para realizar análisis citogenéticos en fresa (*Fragaria* L.) y zarzamora (*Rubus* sp.). Ambos cultivos poseen número cromosómico básico siete, pero en sus distintas especies existen genotipos con diferente ploidía. En fresa hay niveles como los diploides ($2x=14$), tetraploides ($4x=28$), pentaploides ($5x=35$), hexaploides ($6x=42$), eneaploides ($9x=63$), y decaploides ($10x=70$). En zarzamora también se encuentra una gran diversidad de ploidía con niveles desde $2x$ a $14x$ y hasta $18x$.

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en 2023. El material vegetal utilizado fueron ápices de raíces de híbridos intervarietales de fresa y de zarzamora la variedad Choctaw, propagadas bajo condiciones de invernadero. La hora de colecta se realizó entre las 10:00 a. m. y 12:00 p. m., se procuró que las raíces presentaran una coloración blanquecina, buen grosor y turgencia, características indicativas del crecimiento activo y división celular del meristemo apical radical que declinan conforme la raíz cambia a una coloración café (Figura 1). Los ápices se depositaron en frascos con agua destilada y se introdujeron dentro de un termo con hielo para mantener la baja temperatura (0 a 4 °C aproximadamente), el tratamiento en frío se conservó de esta manera durante 24 horas con el objetivo de acumular células en metafase para realizar los análisis citogenéticos.

Una vez cumplidas las 24 horas de tratamiento con baja temperatura, se realizó el fijado utilizando la solución Farmer (alcohol 96°: ácido acético glacial 3:1) por al menos 30 minutos. A continuación, se realizó la hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl: 1N) a 60 °C durante 15 minutos. Para la tinción se utilizó el reactivo de Schiff (60 °C, 15 minutos). Se mantuvo bajo reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se aplastó el tejido y se coloca una gota de carmín 1% sobre el tejido y se realizaron las observaciones bajo microscopio (Marca ZEISS, Alemania) para lo cual se usó el objetivo 63X (Figura 2).

El tratamiento con temperatura baja durante 24 horas en combinación con los protocolos de: fijación mínima de 30 minutos; temperatura y tiempo de hidrólisis usados; temperatura y tiempo de tinción aplicados; tiempo de reposo mínimo de 20 minutos antes de usar las preparaciones, fueron factores importantes para lograr que las observaciones citológicas mostraran resultados similares a los que se consiguen utilizando la colchicina (Figura 3).

Fue posible obtener células en metafase y hacer el conteo de cromosomas tanto en fresa como en zarzamora a pesar de que estas especies de cultivos poseen cromosomas



Figura 1. Colecta de ápices de raíces y tratamiento con baja temperatura en fresa y zarzamora. A: lavado de sustrato para extraer ápices de raíces de fresa; B: ápice de raíz de fresa apto para colectar; C-D: raíces de zarzamora; E: corte de ápice; F: ápices colectados; G-I: tratamiento en frío.

muy pequeños (Figura 4). Asimismo, en fresa se observó aneuploidía con respecto al pentaploide ($5x+1=36$) y en zarzamora aneuploidía con respecto al tetraploide ($4x-2=26$) resultados que muestran alteración en la estabilidad cromosómica de ambos cultivos.

Una temperatura de aproximadamente de 0 a 4 °C durante 24 horas y los protocolos seguidos en el presente estudio permitieron la obtención de células metafásicas adecuadas para estudios cromosómicos en fresa y zarzamora, con lo cual, se plantea la sustitución de agentes tóxicos como la colchicina. Se muestra una buena efectividad de los procedimientos de la presente metodología y su aplicación podría extenderse a diversos recursos genéticos vegetales.



Figura 2. Procedimientos después del tratamiento con baja temperatura en fresa y zarzamora para análisis cromosómicos. A: fijado; B: hidrólisis; C: tinción; D: reposo; E-G: aplastado; H: observaciones; I: células en metafase vistas a través de microscopio.

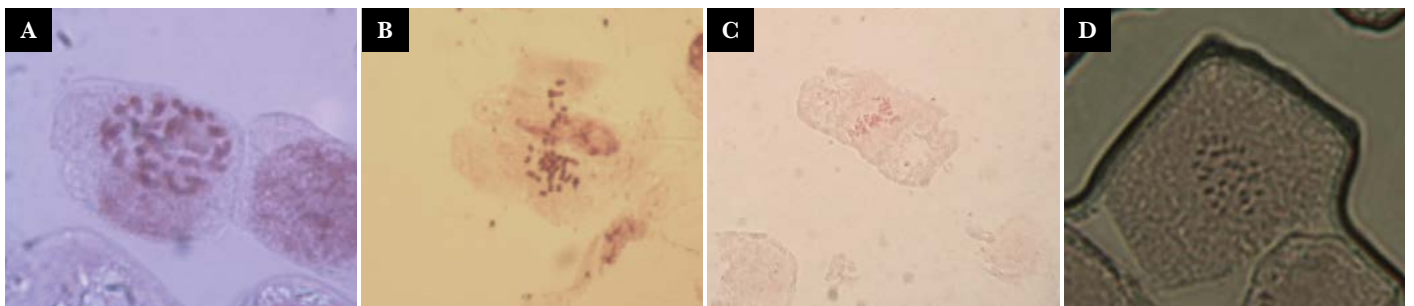


Figura 3. Preparaciones citológicas utilizando tratamientos con colchicina o baja temperatura: A-B=observaciones en células tratadas con colchicina; C-D=observaciones en células tratadas con baja temperatura.

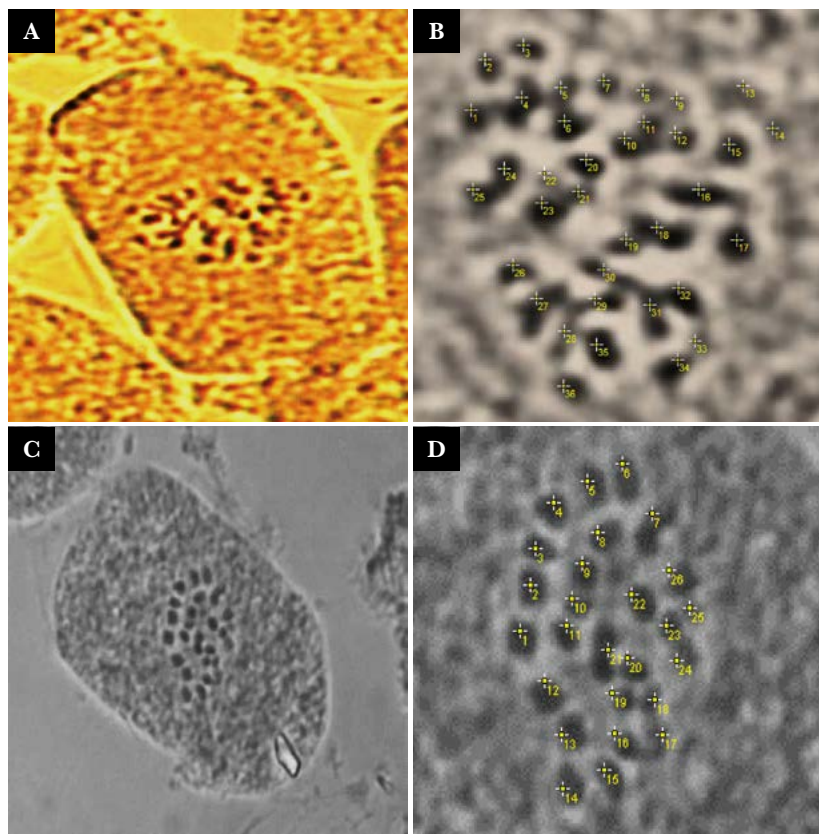


Figura 4. Observaciones citológicas en fresa y zarzamora a través de microscopio electrónico mediante el empleo de baja temperatura. A: célula de fresa en metafase; B: conteo de cromosomas de fresa; C: célula de zarzamora en metafase; D: conteo de cromosomas de zarzamora.

Innovación, impactos e indicadores

Nivel de innovación	Descripción	Transferido	Impacto		Indicador General de Políticas Públicas	Indicadores Específicos	Subindicador
			Sector	Ámbito			
Procesos	Implementación de una significativa mejora de un método de investigación.	Estudiantes de licenciatura y Posgrado mediante cursos, asesorías y tesis	Cuaternario: Procesos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i)	Económico	Ciencia y Tecnología	Competitividad Capacitación	Capacitación a estudiantes de Licenciatura y Posgrado. Aplicación de técnicas y conocimientos tecnológicos
Innovación de código abierto	Filosofía o metodología pragmática que promueve la redistribución libre y el acceso al diseño final de un producto y los detalles de su implementación			Salud			