

ANÁLISIS DE PLOIDIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE ALISO ANDINO (*Alnus acuminata* H.B.K.)

RESUMEN

El aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.) es un árbol perteneciente a la familia Betulaceae, con gran potencial como fijador de nitrógeno, reforestador de cuencas hidrográficas y con variados usos de su madera. En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales se obtuvieron líneas celulares embriogénicas de esta especie, las cuales fueron analizadas para estabilidad de ploidía mediante citometría de flujo, con la colaboración del Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas en Valencia, España.

PALABRAS CLAVES: Betulaceae, embriogénesis somática, estabilidad genética, ploidía, variación somaclonal,

ABSTRACT

The alder (*Alnus acuminata* H.B.K.) belongs to Betulaceae family. This tree shows enormous potential given its rapid growth, its association with nitrogen fixers, and accordingly play an important role in protecting watersheds. At the Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Environmental Science were obtained embryogenic cellular lines of this species, which were analyzed for ploidy stability by flow cytometric with the collaboration of Cell Culture Laboratory, Institute of Plant Molecular and Cellular Biology (IBMCP), Valencia, Spain.

KEYWORDS: Betulaceae, genetic stability, ploidy, somatic embryogenesis, somaclonal variation

1. INTRODUCCIÓN

Alnus acuminata es un forestal propio de los Andes colombianos, cuyo rápido crecimiento y gran plasticidad para crecer en múltiples condiciones ambientales, al igual que la fácil descomposición de la hojarasca y producción de materia orgánica, hacen del aliso una especie recomendable para plantaciones protectoras productoras en cuencas hidrográficas (1) (2). Además, sus raíces superficiales presentan nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico por simbiosis con el hongo *Alni* o *Frankia*. Su madera es muy usada en ebanistería, en general para la producción de muebles sencillos, cajonerías, puertas y epicótilos. La micropropagación por embriogénesis indirecta (mediante formación de callo), ha sido sólo reportada en los trabajos del Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira (11) (12).

Teniendo en cuenta que en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira, se ha logrado la producción de callos embriogénicos de aliso, lo cual apunta a la propagación clonal que parte de material adulto para su propagación

LUIS GONZAGA GUTIERREZ L.

Biólogo Ph.D
Profesor asociado
Laboratorio de Biotecnología Vegetal
Grupo de Biodiversidad y
Biotecnología
Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad Tecnológica de Pereira

VICENTE MORENO FERRERO

Biólogo Ph.D
Catedrático de Genética
Laboratorio de Cultivos Celulares
Instituto de Biología Molecular y
Celular de Plantas (IBMCP)/ CSIC
Universidad Politécnica de Valencia

ventanas. Se usa en pequeña escala en las industrias de tableros, de viruta y en la fabricación de lápices, palillos para fósforos y toneles. Además se emplea ampliamente en muchos países como combustible (3) (4) (5) (6).

Debido a su importancia, el aliso ha sido estudiado biotecnológicamente mediante técnicas de micropropagación *in vitro*, es así como, se han publicado diversos trabajos sobre multiplicación de plántulas por organogénesis. (7) emplearon yemas axilares; (8) partieron de segmentos nodales; (9) lograron la multiplicación a partir de microestacas de aliso (ecotipo blanco) y (10) logró múltiples brotes a partir de (yemas axilares y limbo de hoja), y que la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática a partir de este material adulto conlleva, en nuestro caso, una etapa previa de formación de callo. Esto implica el riesgo de que se genere un cierto grado de variación somaclonal, es decir, la variabilidad genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro*. Por esta razón, el objetivo de este trabajo, consistió en estudiar la posible existencia de variación numérica en algunas líneas de callos embriogénicos de aliso, inducidas con el regulador de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D),

partiendo de la hipótesis que, probablemente los callos inducidos con 2,4-D mostrarían cambios de ploidía, teniendo en cuenta la mayor anormalidad que mostraron los embriones somáticos producidos en ellos (11), por tal motivo, se realizaron determinaciones de la cantidad de ADN por citometría de flujo, tanto en las plantas donantes como en líneas celulares.

La técnica de la citometría de flujo es, básicamente, un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que desfilan, de una en una y arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente, de acuerdo a las propiedades exhibidas (13).

La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas (13).

Existen diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN celular, de ellos el yoduro de propidio y el bromuro de etidio son los más utilizados en citometría de flujo. Ambos se excitan a una longitud de onda de 488 nm y se une de forma estequiométrica a la doble cadena de ADN.

La cuantificación de ADN nos informa sobre la existencia o no de anomalías clonales de ADN (aneuploidías de ADN) y, por otra parte nos permite conocer la distribución de una población celular determinada a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (14).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Embriogénesis somática en *Alnus acuminata*

A partir de explantes de limbo foliar de plantas adultas de *Alnus acuminata* se logra la inducción de callos embriogénicos utilizando el medio de cultivo base que consiste en la formulación de sales MS (15) a la mitad de la concentración, sacarosa al 3%, 400 mg/l de L-cisteína como antioxidante y las vitaminas MS. El pH del medio se ajustó a 5.7 y la gelificación se realizó con agar al 0.6%. Dicho medio de cultivo es suplementado

con las siguientes combinaciones de reguladores: 1 mg/l de NAA + 3 mg/l de 6-BAP y 1 mg/l de 2,4-D + 3 mg/l de 6-BAP. En estos medios no sólo se produce la inducción, sino también el desarrollo inicial de los embriones somáticos (11) (12).

2.2 Análisis de Ploidía de ADN y Fases del Ciclo Celular por Citometría de Flujo

Se realizaron determinaciones de la cantidad de ADN por citometría de flujo, en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas en Valencia, según el método de (16) tanto en las plantas donantes como en líneas celulares de callos embriogénicos inducidos con 2,4-D (línea C1L10 y C1L11), utilizando el siguiente procedimiento:

Para romper mecánicamente el tejido vegetal se trocea finamente, con una cuchilla, el fragmento a analizar en una placa Petri de 50 mm de diámetro, con 200 µl de tampón de extracción de núcleos (Nuclei extraction solution, Partec, Münster, Germany). Una vez está disgregado el tejido, se le añaden 800 µl de una solución con 1 mg/l de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole), (DAPI staining solution, Partec) que tiñe el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm.

La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser) equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm de longitud de onda. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), mientras es iluminada por la luz ultravioleta; en respuesta, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN en el núcleo, que es reconocida y captada por un fotoreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla, situado en distintas posiciones, de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas, y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

El sistema se calibra previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor 100 de la escala de abscisas. El patrón de mixoploidía se determina según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares (2C, 4C, 8C, etc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los picos de la figura 1 indican que los tejidos de limbo de hoja (apicales y basales) de las plantas de *Alnus acuminata*, que fueron donadoras para la inducción de

callos embriogénicos, no son mixoploides y que la tasa de división mitótica en este tejido es prácticamente muy escasa. En cambio, como era de esperar, los callos de las líneas embriogénicas sí muestran una alta actividad mitótica y los perfiles dependen de las líneas en cuestión. Así, la línea C1L11 (inducida con 2,4-D) muestra un perfil mixoploide (figura 2), lo que alude a la presencia de un cierto grado de endopoliploidía (endomitosis o endorreduplicación) en el material celular. Sin embargo,

C1L10 (igualmente inducida con 2,4-D) no muestra mixoploidía ya que sólo aparecen los picos correspondientes a las células en fase G1 y a las células en fase G2 (figura 2). Esto implica que al menos una de las líneas celulares callogénicas inducidas con el regulador de crecimiento 2,4-D muestran variabilidad en el número de ploidía, en comparación con las células del limbo de hoja de donde se originaron.

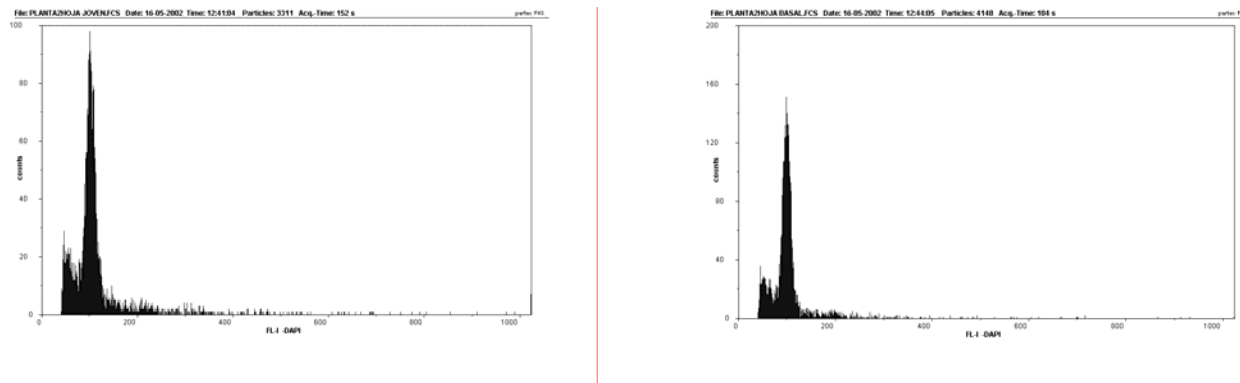


Figura 1. Análisis por citometría de flujo del nivel de ploidía de hojas de plantas de *Alnus acuminata*. Hoja apical (izquierda) y hoja basal (derecha).

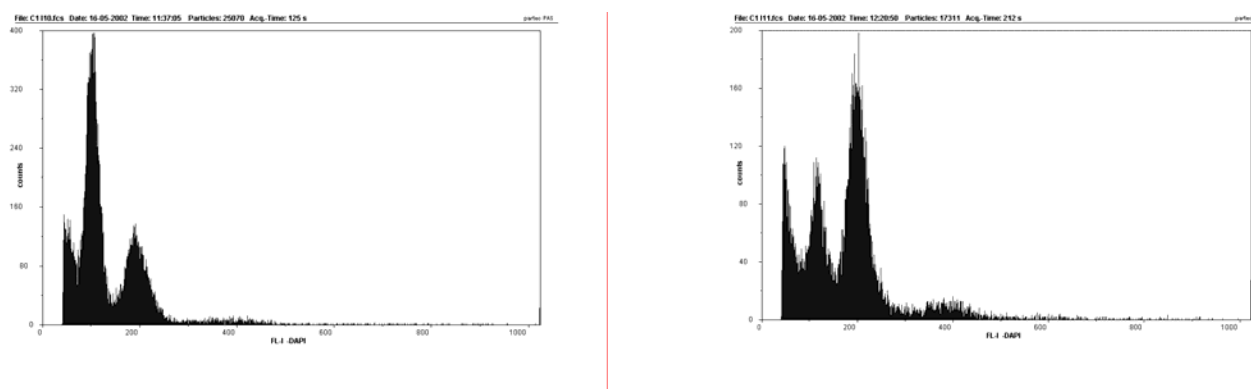


Figura 2. Análisis por citometría de flujo del nivel de ploidía de dos líneas de callos embriogénicos inducidos en medio con 2,4-D. Líneas celulares C1L10 (izquierda) y C1L11 (derecha).

Si se comparan los resultados que hemos obtenido en aliso con los descritos por otros autores, es posible hasta cierto punto relacionar el grado de variación observado con la metilación presumiblemente causada por las auxinas (2,4-D y NAA) y/o por la citoquinina (BAP). (17) encontraron una alta correlación entre el nivel de los polimorfismos de ADN (debido principalmente a reordenaciones del ADN) y el nivel de metilación en el arroz. (18) indicaron que los niveles de auxinas estaban muy relacionados con el nivel de metilación del ADN de cultivos de zanahoria. Para estos autores, son mayores los porcentajes de metilación cuando se emplea 2,4-D que cuando se emplea NAA. Y, en general, el grado de

metilación aumenta, a medida que aumenta la concentración de los reguladores en el medio. Sin embargo, para (17) el efecto de auxinas como el 2,4-D podrían tener más que ver con la aceleración de la división celular, lo que de forma indirecta podría afectar a la tasa de cambios genéticos y/o el grado de metilación. Sus opiniones coinciden con las de (19), en cuanto a que los componentes del medio de cultivo afectan a la tasa de variación, pero lo hacen de forma indirecta, influyendo sobre el grado de desorganización celular, la asimetría de la mitosis, la velocidad de la división celular u otros factores.

Hay otros aspectos que conviene considerar en la variación encontrada en los callos de aliso. Por ejemplo, el nivel de ploidía, ya que *Alnus acuminata* es, al parecer, un diploide funcional de origen tetraploide ($2n=28$) (20). La variación somaclonal podría ser mayor en especies de origen poliploide (auto o alopoloide) ya que, por su origen evolutivo, estas especies tienen mayor capacidad de tamponamiento y soportan mejor ciertos desequilibrios genéticos que no son admisibles en otras especies (13) (21) (19).

Otro factor a tener en cuenta es la fuente del explante. En *Alnus acuminata* se ha empleado tejido foliar, y se sabe que las células de los tejidos altamente diferenciados (como raíces, hojas y tallos) pueden acumular un gran número de mutaciones somáticas que pueden explicar, al menos en parte, la variación encontrada (22) (6).

El protocolo de embriogénesis somática que hemos desarrollado en aliso implica una morfogénesis indirecta y esto puede ser uno de los factores más determinantes de la variación somaclonal, pues el crecimiento inicialmente desorganizado (con la subsiguiente formación de callo) genera toda una gama de desórdenes de tipo metabólico y estructural que se pueden traducir en variación, tanto epigenética como genética. Evidentemente, la tasa de variación va a ser muy dependiente de la longitud de la fase de crecimiento desorganizado, del periodo de cultivo y del número de subcultivos (19).

4. CONCLUSIONES

Mediante la técnica de citometría de flujo se logró analizar los perfiles de ploidía de los tejidos de limbo de hoja y de líneas celulares embriogénicas del forestal *Alnus acuminata* inducidos con el regulador de crecimiento 2,4-D.

Los callos de las líneas embriogénicas de aliso andino inducidas con 2,4-D muestran una alta actividad mitótica y al menos una de las líneas muestran un perfil mixoploide, lo que implica la presencia de un cierto grado de endopoliploidía (endomitosis o endorreduplicación) en el material celular.

Estos cambios en la ploidía de las células de los callos (mixoploidía) parecen explicar, al menos en parte, las anomalías reportadas en los embriones somáticos de aliso, obtenidos por embriogénesis indirecta.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Alejandro Atarés Huerta por la colaboración prestada con el citómetro de flujo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. CORPORACION NACIONAL DE INVESTIGACION Y FOMENTO FORESTAL. C.O.N.I.F., 1996. Latifoliadas Zona Alta: Aliso. Servicios Técnicos. Santafé de Bogotá. P. 22-36
- [2]. MURCIA, C. 1997. Evaluation of Andean alder as a catalyst for recovery of tropical cloud forest in Colombia. **Forestry Ecology and Management** 99, 163-170.
- [3]. ROJAS, C. 1983. Maderas tropicales en la industria fosforera. **Tecnología en Marcha**. Costa Rica. 6: 3, 9-14.
- [4]. MARTÍNEZ, H. y ZANOTTI, J. 1985. Comportamiento de algunas especies para leña en Guatemala. **Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, C.A.T.I.E.** p. 21
- [5]. CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA, C.A.T.I.E. 1986. Silvicultura de especies promisorias para producción de leñas en América Central. p. 228
- [6]. DUNCAN, R.R. 1997. Tissue culture-induced variation in crop improvement. **Adv. Agron.** 58: 201-240.
- [7]. HODSON, E., RODRIGUEZ, C.A. & CHEMAS, A. 1988. Propagación Vegetativa de *Alnus acuminata* H.B.K. por Cultivo de Tejidos Vegetales. Revista Facultad de Ciencias. **Pontificia Universidad Javeriana**. Bogotá. Colombia. 1(2): 67-77
- [8]. BADILLA, M.M.V., HIDALGO D., N., GUEVARA B.E. & MURILLO, G. O. 1992. Cultivo In Vitro de Plántulas de Jaúl (*Alnus acuminata*). **Tecnología en Marcha**. 11(3): 3-9.
- [9]. GONZALEZ, C, VILCA, J. 1998. Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Asociación civil para la investigación y desarrollo forestal **ADEFOR**. Cajamarca. Perú. p. 40.
- [10]. ENRICO, R. J. 1998. Citocininas en la producción de múltiples vástagos en el cultivo in vitro de epicótilos de *Alnus acuminata*. En: **Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal**. La Habana. p.93-94
- [11]. GUTIERREZ, L.G. 2001a. El jaúl (*Alnus acuminata*) un forestal con gran respuesta a la embriogénesis somática. **Tecnología en marcha**

- 14(2): 114-121. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- [12]. MARULANDA, M.L., GUTIERREZ, L.G., VENTO, H. 1998. Propagación de aliso cerezo (*Alnus acuminata* H.B.K.) a partir de embriogénesis somática. Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. P. 139.
- [13]. LINDSEY, K. y JONES M.G.K. 1989. Biotecnología vegetal agrícola. **Acribia**. Zaragoza. p.276.
- [14]. ÁLVAREZ, B. A. 2000. Unidad de Citometría. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. ISCIII, Madrid.
- [15]. MURASHIGUE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497.
- [16]. SMULDERS MJM, RUS-KORTEKAAS W, GILISSEN LJW.1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Sci* 97:53-60
- [17]. MULLER, E., BROWN, T., HARTKE, S., LORTZ, H. 1990. DNA variation in tissue culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**. 80: 673-679.
- [18]. LO SCHIAVO, F., PITTO, G., GIULIANO, G., TORTI, G., NUTI-RONCHI, D., MARAZZITI, D., VERGARA, R., ORSELLI, S., TERZI, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **Theor. Appl. Genet.** 77: 325-331.
- [19]. MORENO, V. 1997. La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. En: **Biotecnología y Agricultura: Las Plantas del Futuro**. (Fundació Bancaixa). P. 59-96.
- [20]. RESTREPO, G. and GERVAIS, C. 1994. Chromosome numbers of some Latin American species of *Alnus* (*Betulaceae*). **Rhodora**. 96(855): 1994.
- [21]. MORENO, V., ROIG, L.A. (1990). Somaclonal variation in Cucurbits. In: Bajaj, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, vol 11 p. 435-464
- [22]. SKIRVIN, R.M. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. **Euphytica**. 27:241-266 (citado por Ahuja, 1998)