

Efectos citológicos y sobre el crecimiento vegetal del extracto de semilla de remolacha*

por

Jorge E. Mora Urpi**

(Recibido para su publicación el 1 de octubre de 1954)

INTRODUCCION

El examen de la literatura existente sobre estudios realizados referentes a la ocurrencia de fenómenos mutagénicos en plantas de diversas especies provenientes de semillas de diferentes edades, nos muestra que existe una relación, aunque no proporcional (13), entre la frecuencia de aparición de dichos fenómenos y la edad de las semillas que dieron origen a las plantas estudiadas (1) (4) (5).

Bastante se conoce sobre los efectos citológicos y sobre el crecimiento que ejercen algunas de las sustancias contenidas en semillas, raíces y hojas de algunas plantas. KECK y HOFFMAN OSTENHOF (7) indujeron en *Allium test*, c-mitosis y fragmentaciones cromosómicas entre otros fenómenos mutagénicos, utilizando extractos de bulbos de cebolla. GISQUET, HITIER, IZARD y MOUNAT (5) produjeron algunas mutaciones al tratar semillas germinantes de tabaco con extractos de semillas de la misma especie que ya habían perdido gran parte de su poder germinativo. MOTA (11) trabajando con extractos de cebada en *Allium* observó una serie de interesantes fenómenos citológicos pero no encontró diferencias entre los efectos producidos por los extractos de semillas de diferentes edades.

Son muchas las clases de semillas que contienen sustancias capaces de inducir fenómenos mutagénicos y además es bien sabido que algunas de ellas influyen marcadamente la germinación de semillas que se encuentran en su vecindad (12). El objeto de este trabajo es estudiar la acción del extracto de semillas de remolacha, tanto en su aspecto citológico como en los de germinación y crecimiento.

* Trabajo realizado en la Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza (España).

** Departamento de Agronomía del Ministerio de Agricultura e Industrias.

MATERIAL Y METODOS

Hago a continuación una división de acuerdo a las experiencias para mayor claridad.

a) PARA LA EXPERIENCIA CITOLOGICA

Como material para esta experiencia se ha utilizado el ya clásico en citología por reunir muchas de las condiciones adecuadas, *Allium cepa*, de acuerdo con el método descrito por LEVAN (8) denominado *Allium test*. Dicho método consiste en poner a germinar pequeños bulbos de cebolla lo más uniformes posible después de bien limpios, sobre la boca de tubos de ensayo de 2,5 cm de diámetro por 20 cm de largo llenos de agua corriente. Cuando las raíces han alcanzado una longitud de 3 a 4 cm se traspasa el bulbo a otro tubo que contiene la disolución a ensayar.

Para lo obtención del extracto se utilizaron semillas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) de la variedad Ebro IZ de la cosecha de 1952 con un 93% de germinación. El extracto se obtuvo dejando la semilla en maceración en agua durante 24 horas en una estufa de temperatura constante de 26°C. Las proporciones usadas fueron de 100 grm. de semilla por 500 cc de agua, haciendo luego las diluciones a ensayar: 1,00, 0,75, 0,50, 0,25, 0,125, 0,100, 0,050, 0,025 y testigo.

Se hicieron fijaciones del material a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, con el propósito de observar la marcha proporcional de las fases mitóticas a través de los diferentes tiempos de tratamiento, además de la ocurrencia de fenómenos mutagénicos. Las fijaciones de los meristemos radicales se hicieron en Karpechenko-Müntzing, luego deshidratados en mezclas de etanol y n-butanol de concentración creciente en este último. Incluyendo a continuación en parafina y haciendo los cortes longitudinalmente de 18 μ , para teñir luego con cristal violeta.

b) PARA LAS EXPERIENCIAS DE GERMINACION Y CRECIMIENTO

El material empleado para la experiencia de germinación estuvo constituido por semillas de las siguientes especies: Veza (*Vicia atropurpurea*), Trigo (*Triticum aestivum*), Tomate (*Lycopersicum esculentum*) y Remolacha (*Beta vulgaris*). Tanto la veza como el trigo fueron puestos en maceración en las disoluciones correspondientes durante 4 horas, luego al igual que el tomate y la remolacha, puestos a germinar en placas de petri con papel de filtro previamente humedecido en las disoluciones respectivas.

El extracto fué obtenido por el mismo método descrito en a) pero variando las proporciones de semilla y agua con el objeto de obtener una disolución más concentrada, empleándose 200 grm. de semilla por 500 cc. de agua y luego diluyendo a: 1,00, 0,50, 0,375, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031, 0,15 y testigo.

Para la experiencia sobre el crecimiento se emplearon bulbos de cebolla, los cuales se pusieron a germinar directamente en las disoluciones a ensayar. La medecido en las disoluciones respectivas.

concentración del extracto fue la misma que la utilizada en la experiencia de germinación pero la dilución se llevó más adelante: 1,00, 0,500, 0,375, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,0075, 0,00375, 0,00187, 0,00093, 0,00046, 0,00023, 0,00012, 0,00006 y testigo. Tomándose como medida del crecimiento la longitud máxima mostrada por las raíces. Las medidas se tomaron diariamente en milímetros. Así como también se renovaron diariamente las disoluciones para evitar, en lo posible, los efectos de la fermentación.

OBSERVACIONES

a) CITOLÓGICAS

Las disoluciones 1 y 0.75 resultaron letales a las 24 y 48 horas respectivamente. En éstas así como en la disolución 0,50 se observan desde las 4 horas de tratamiento gran cantidad de gotas de cromatina, núcleos picnóticos y algunos núcleos necróticos. Núcleos contraídos y dispuestos en los vértices de las células fueron frecuentemente observados. Estos fenómenos tienden a desaparecer con la dilución de las concentraciones.

En general los fenómenos más frecuentes fueron la contracción y la aglutinación cromosómicas, presentándose con mucha frecuencia juntos, y siendo tanto más marcados cuanto más concentrada la disolución empleada. Puentes telofásicos fueron frecuentes en preparaciones que mostraron una aglutinación bastante marcada.

Disolución de la cromatina y vacuolización de los cromosomas se presentaron mayormente en los tratamientos de concentración intermedia después de largo tiempo de exposición.

Una acción c-mitótica bastante clara nos la mostraron las disoluciones más concentradas encontrándose algunos núcleos tetraploides. Pero en general la acción no es completa, observándose toda una escala intermedia entre la mitosis normal y la c-mitosis.

Cromosomas retardatarios fueron observados en muy raras ocasiones con tratamientos de concentración intermedia. No se observaron efectos radiomiméticos ni "lampbrush".

Muy notorio fue el efecto inhibitorio de la frecuencia de las mitosis mostrado con mayor intensidad por los tratamientos de más alta concentración, disminuyendo dicho efecto con la dilución. También es digna de hacer resaltar la relación proporcional de las fases mitóticas en las diversas concentraciones y en el curso del tiempo de tratamiento. El número de profases fue enormemente elevado en las disoluciones más concentradas, tendiendo a la normalidad con la dilución de la concentración, pero sin alcanzarla aun en la disolución 0.025. También tiende a la normalidad con el tiempo, pero en forma menos notoria. La variación mostrada por las metafases fue menos acentuada que en las profases, siguiendo un curso contrario al de éstas conjuntamente con las anafases y telofases. Estas dos últimas sí muestran una alteración considerable, y en el curso del tiempo de tratamiento. El número de profases fue enorme-

Fig. 1: C-Metafase. Obsérvese la falta de arreglo ecuatorial característica de estas metafases. Acción de la disolución 0,5 a las 8 horas.

Fig. 2: Cromosomas vacuolados. Acción de la disolución 0,5 a las 24 horas.

Fig. 3: Puente telofásico. Acción de la disolución 0,75 a las 4 horas.

Fig. 4: Gotas de cromatina alrededor del núcleo. Acción de la disolución 0,75 a las 8 horas.

Fig. 2: Cromosomas vacuolados. Acción de la disolución 0,5 a

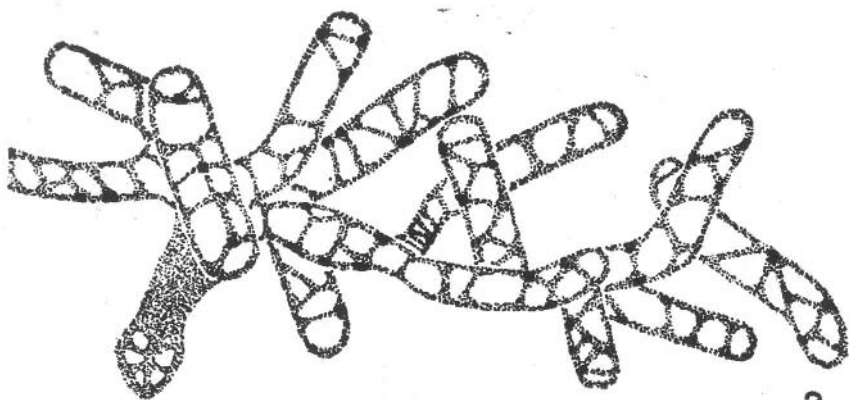
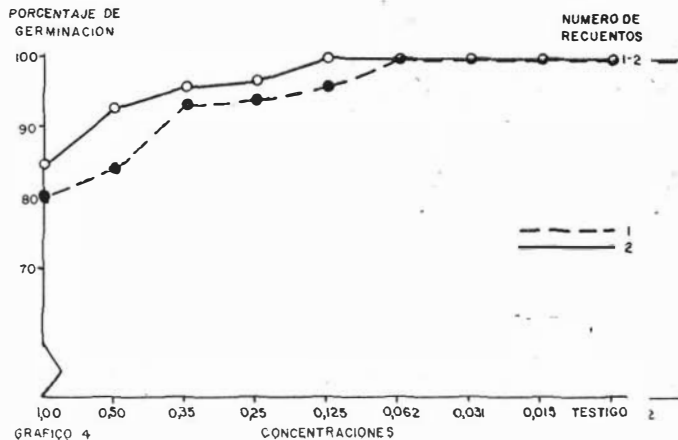
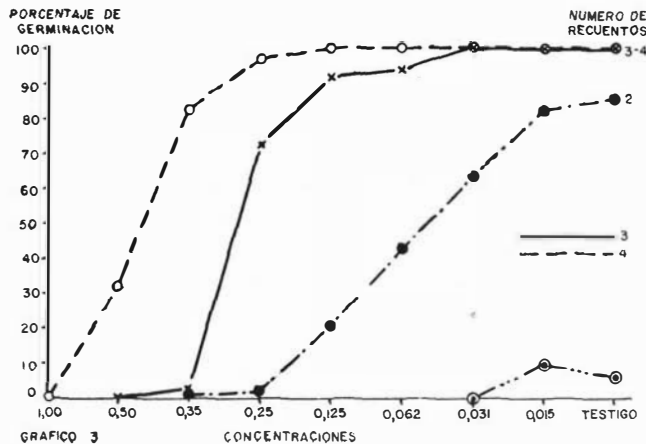
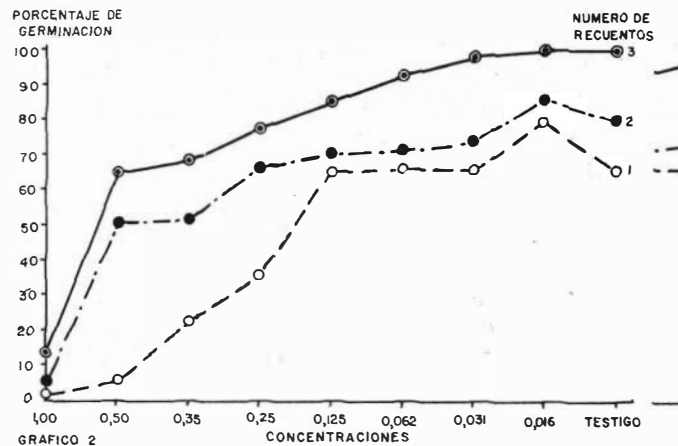
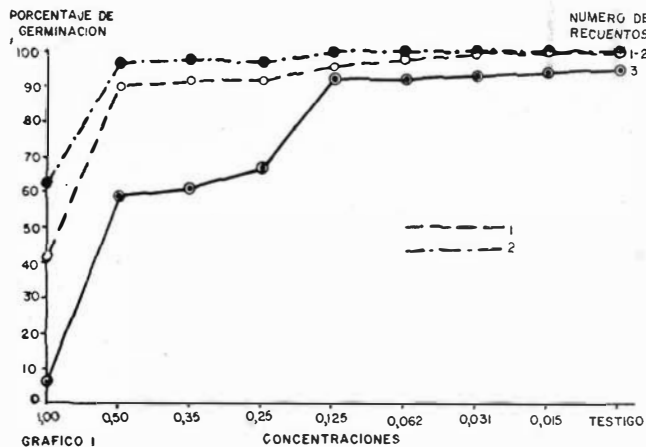


Gráfico 1: Marcha de la germinación en veza (*Vicia atropurpurea*).

Gráfico 2: Marcha de la germinación en remolacha (*Beta vulgaris*).

Gráfico 3: Marcha de la germinación en tomate (*Lycopersicum esculentum*).

Gráfico 4: Marcha de la germinación en trigo (*Triticum aestivum*).



estando casi totalmente ausente en los tratamientos de mayor concentración y alcanzando casi la normalidad en la disolución 0,025 a las 72 horas de exposición (Figs. 1, 2, 3, y 4).

b) SOBRE LA GERMINACION Y EL CRECIMIENTO

En la experiencia de germinación se observó claramente que las disoluciones muy concentradas eran altamente tóxicas para las semillas en germinación, inclusive para las de remolacha, y que las concentraciones decrecientes mostraban una acción inhibitoria de las mismas. Dicha acción inhibitoria guardaba una estrecha relación con la concentración, disminuyendo proporcionalmente a ella hasta desaparecer en las concentraciones 0,031 y 0.015 y transformándose en una acción estimulante en la concentración 0,015.

La acción inhibitoria no fue mostrada con igual intensidad sobre las semillas de las cuatro especies. Las semillas de tomate mostraron una mayor sensibilidad, no germinando cuando fueron tratadas con la disolución más fuerte, sensibilidad que se notó asimismo en el desarrollo de las plántulas procedentes de tratamientos con menor concentración.

En la experiencia de crecimiento se observó una acción semejante a la anterior, mostrándose una escala desde la inhibición total del crecimiento hasta un efecto estimulante del mismo bastante marcado. Las cuatro concentraciones mayores resultaron letales, las cuatro siguientes provocaron la formación de c-tumores y la más débil (0,00006) fue la que estimuló el crecimiento.

A continuación se exponen las representaciones gráficas de los resultados de las experiencias de germinación (Graf. 1, 2, 3, 4.) y de crecimiento (Graf. 5), así como también una fotografía que nos muestra diferencias de crecimiento en plántulas de veza y trigo con diversas concentraciones (Fig. 5).

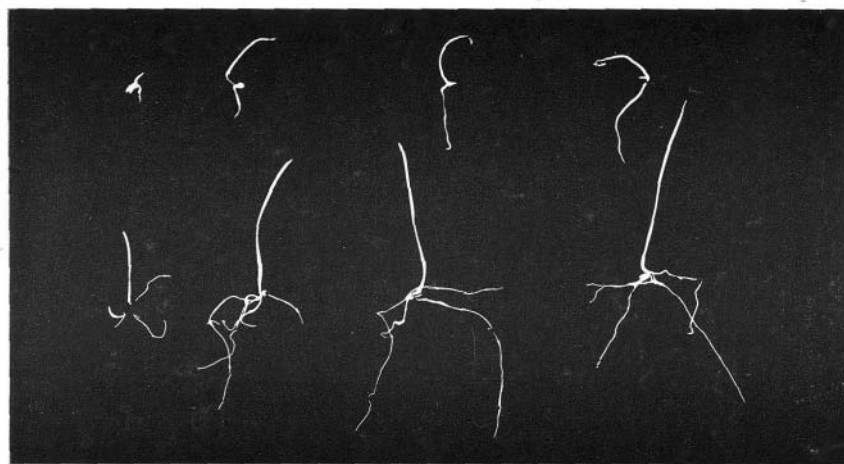


Fig. 5: Diferencias de crecimiento debidas al tratamiento. En plántulas de veza en la hilera superior, y de trigo en la inferior. La concentración utilizada disminuye de izquierda a derecha. Obsérvese el poco crecimiento de las plántulas procedentes de los tratamientos de más elevada concentración.

DISCUSION

En primer término hemos de considerar que el extracto utilizado en estas experiencias está constituido por una mezcla heterogénea de sustancias químicas de naturaleza indeterminada. Siendo así que los efectos pueden tener origen en más de una causa. Además debe considerarse la ligera fermentación que tuvo lugar.

Indudablemente los fenómenos más frecuentes que se presentaron fueron la contracción y la aglutinación cromosómica. La frecuencia con que éstos se encontraron conjuntamente en las mismas preparaciones parece corroborar la hipótesis de LORENZO ANDREU (9) quien los explica por medio de la teoría de la coacervación, según la cual ambos fenómenos pueden explicarse de manera análoga por la acción de los agentes coacervantes sobre el ácido nucléico, principal constituyente de la matriz, provocando la formación de gotas o en general de aglutinación. Existen probablemente ciertas concentraciones para aglutinación y contracción simultáneas.

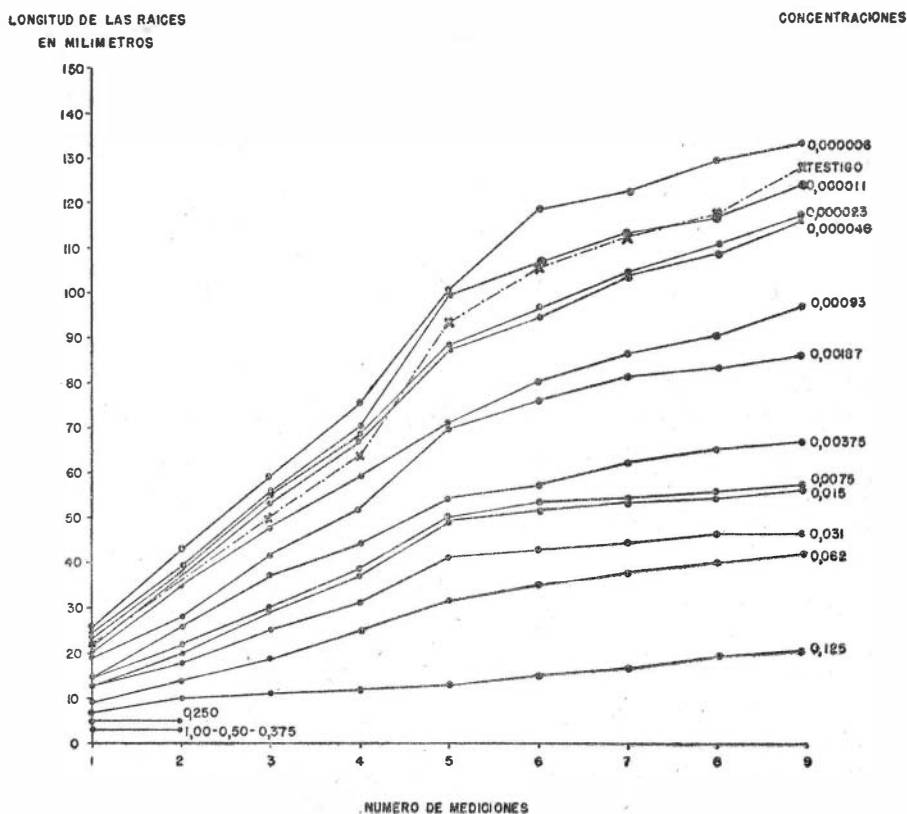


GRAFICO 5

Gráfico 5: Marcha del crecimiento de las raíces de cebolla (*Allium cepa*).

0,250
1,00-0,50-0,375

Estrechamente relacionados con los fenómenos anteriormente discutidos, y revistiendo asimismo bastante importancia, se encuentran los de disolución de la cromatina y vacuolización de los cromosomas.

La acción c-mitótica, aunque se observó con relativa frecuencia, no alcanzó a tener verdadera importancia por cuanto las disoluciones en las cuales parecía ser más manifiesta resultaron bastante tóxicas para las células.

De lo dicho anteriormente se deduce, como también lo notó MORA (11) en su trabajo con extracto de cebada, que los principales efectos se manifiestan sobre la matriz y el movimiento anafásico, suponiendo en este último caso que la acción no es ejercida únicamente sobre el huso sino que también la actividad del centrómero resulta grandemente influenciada.

Como era lógico esperar se encontró una relación directa entre el efecto observado sobre el crecimiento y la frecuencia de las mitosis, resultando bien claro que las disoluciones hasta concentraciones relativamente bajas, ejercen una acción inhibitoria sobre las mismas pero mostrando una acción desigual sobre las diversas fases de la mitosis, alterando así la proporción normal entre ellas. Dicho efecto resulta particularmente claro sobre las profases, y aunque no proporcionalmente, decrece la intensidad de la acción con la dilución de la concentración, llegando en concentraciones muy bajas a mostrar un efecto estimulante en lugar de inhibitorio. Dicho cambio de acción no es de extrañar si recordamos que las sustancias reguladoras de crecimiento vegetal muestran en general igual fenómeno, siendo muy probable que en este extracto se encuentren algunas sustancias de este tipo.

Las diferencias de sensibilidad mostradas por las distintas clases de semillas son claramente comprensibles para entrar a discutir las.

AGRADECIMIENTO

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento al Dr. J. H. Tjío, jefe del Departamento de Citogenética de la Estación Experimental de Aula Dei, por la sugerencia del tema así como por su crítica y ayuda que hicieron posible la ejecución de este trabajo.

RESUMEN

Se estudia la acción del extracto de semillas de remolacha sobre meristemas radicales de cebolla tanto en su aspecto citológico como en el de crecimiento, así como también su acción sobre la germinación de semillas de diversas especies. Deduciéndose de las observaciones que dicho extracto contiene sustancias que inhiben la germinación, así como también la frecuencia de las mitosis y con ellos el crecimiento, ejerciendo su máxima acción sobre las profases. Cuando la dilución se lleva muy adelante se manifiesta un efecto estimulante en lugar del inhibitorio. Los fenómenos citológicos más frecuentes fueron la **contracción** y

aglutinación cromosómicas que se explican por la teoría de coacervación. Los fenómenos c-mitóticos también revisten cierta importancia y se explican como debidos a la inhibición del huso e inactivación de los centrómeros.

SUMMARY

The present study concerns the effect of beet seed extract on the cytology of the growing region of onion roots, on the growth of onion roots, and on the germination of seeds of various plant species.

Beet seed extract, in its less dilute solutions, was found to act as an inhibitor of germination, growth, and mitosis frequency, mainly by its effect on prophase.

The opposite was found to hold for the more dilute solutions, which act rather as growth stimulants.

The cytological phenomena, most frequently caused by the extract were contraction and agglutination of chromosomes, explained by the theory of coacervation. C-mitosis phenomena appeared less frequently, and are explained as resulting from the inhibition of the spindle and the inactivation of the centromere.

REFERENCIAS

1. CARTLEDGE, J. L. y BLAKESLEE, A. F.
1934. Mutation rate increased by aging seeds shown by pollen abortation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 20(2):103-110.
2. CARTLEDGE, J. L. y BLAKESLEE, A. F.
1935. Mutation rate from old *Datura* seeds. *Science* 81(2107):492-495.
3. D'AMATO, F.
1949. The effect of m-inositol on c-mitosis and c-tumor reaction. *Caryologia* 1:538-561.
4. GERASSIMOVA, H.
1935. The nature and causes of mutations. 11. Transmission of mutations arising in aged seeds: Occurrence of "Homozygous dislocants among progeny of plants raised from aged seeds". *Cytologia* 1:258-361.
5. GISQUET, K., H. HITIER, C. IZARD y A. MOUNAT
1951. Mutations provoquées par l'extrait a froid de graines vieilles prématurément. *Ann. Inst. du Tabac de Bergerac*, 1(2):5-35.
6. GUNTARDT, H., L. SMITH, M. E. HAFERKAMP y R. A. NILAN
1953. Studies on aged seeds. 11. Relation of age of seeds to cytogenetic effects. *Agr. Jour.* 45(9):338-341.

7. KECK, K. y O. HOFFMAN OSTENHOF
1951 Pflanzliche Stoffwechselprodukte als Mitosegifte. 1. Mitosehemmende und -störende Substanzen in wässrigen Auszügen aus *Allium oepa* (Speisezwiebel) *Monatshefte für Chemie* 82:559-562.
8. LEVAN A.
1949. The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the *Allium* test. *Proc. Elighb Int. Congr. Gen.* 335-337.
9. LOREZO ANDREU, A.
1951. Acciones Químicas sobre la división celular. *An. Est. Exp. Aula Dei*, 2(2)-:174-186.
10. MARTZ, M.
1954. Anomalies mitotiques dans le germination de blé en atmosphère apauvrie en oxygène. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, (8):718-720.
11. MOTA, M.
1952. The action of seed extracts on chromosomes. *Arq. de Patol.* XXIV: 336-357.
12. NAUNDORF, G.
1951. *Las fitohormonas en la agricultura*. Salvat Editores, S. A. Barcelona.
13. NAVASHIN, M. y H. GERASSIMOVA
1941. On the course of the process of mutations in the cells of the dormant embryo within the seed. *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, 26(9):948-951.