



Estudio comparativo del índice mitótico en el meristemo de *Allium cepa* L

Comparative study of the mythotic index in the meristem of Allium cepa L

Nancy Jaimes Méndez^a; Manuel Alejandro Gil Durán^b; Diego Alexander Jaimes Méndez^a

^aPrograma de Biología, Grupo de investigación en biología molecular y genética, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona Colombia.

^bPrograma de Matemática Aplicada, Grupo de investigación en biología molecular y genética, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Colombia

Correspondencia: njaimed@unipamplona.edu.co

Recibido: Febrero, 2022. Aceptado: Abril, 2022. Publicado: Mayo, 2022

Resumen

El bioensayo de porcentaje de índice mitótico en *Allium cepa*, es utilizado actualmente en varios campos de la ciencia y la industria para determinar el potencial citotóxico de múltiples compuestos, por tener una gran sensibilidad, por ser de fácil acceso, económico y por su practicidad en el momento de realizarse. En el presente estudio se determinó el porcentaje de índice mitótico bajo unas condiciones específicas de crecimiento del meristemo de la raíz *A. cepa* (tiempo de crecimiento de 4 días, agua de grifo cambiada dos veces al día, temperatura de 20 a 22 °C), para compararla con estudios previos y observar la variabilidad o similitud de los resultados. Se estableció que el porcentaje mitótico bajo las condiciones experimentales para este ensayo fue de 14.92 DE±1.18, el cual presenta concordancia con estudios reportados, pero también hay variabilidad en los datos que puede ser debido a que el porcentaje de índice mitótico puede estar influenciado por las condiciones de desarrollo del meristemo de *A. cepa* como el tipo de agua en la cual crece el bulbo, el tiempo de crecimiento de las raíces, el fotoperiodo, temperatura y estado fisiológico del bulbo de cebolla. En conclusión, el porcentaje de índice mitótico obtenido no presenta diferencias significativas con otros estudios, siendo un modelo eficaz para su replicación *in vitro* de la actividad antimitótica.

Palabras clave: Mitosis, bulbo de cebolla, meristemo

Abstract

The mitotic index percentage bioassay in *Allium cepa* is currently used in many fields of science and industry to determine the cytotoxic potential of multiple compounds, due to its high sensitivity, because it is easy to access, economical and because of its practicality in the moment to do it. In the present study, this mitotic index percentage was determined under specific growth conditions of the root meristem *A. cepa* (growth time of 4 days, tap water changed twice a day, temperature between 20 and 22 °C to compare it with previous studies and observe the variability or similarity of the results. It was established that the mitotic percentage under the experimental conditions for this trial was 14.92 SD±1.18, which is consistent with reported studies, but there is also variability in the data that may be due to the fact that the percentage of mitotic index may be influenced by the development conditions of the *A. cepa* meristem such as the type of water in which the bulb grows, the root growth time, the photoperiod, temperature and physiological state of the onion bulb. In conclusion, the percentage of mitotic index obtained no presents significant differences with other studies, being an effective model for *in vitro* replication of antimitotic activity.

Keywords: Mitosis, onion bulb, meristem

1. Introducción

Existen diversos bioensayos que ayudan a evaluar efectos citotóxicos de una sustancia o una mezcla de sustancias, un ejemplo son los meristemos de Liliáceas como *Allium cepa* y *Allium sativum*, estas especies son frecuentemente utilizada para estudios del proceso de división celular como parte del ciclo celular [1, 2]. Además, desde que la prueba de *Allium* fue introducida por primera vez por Leven (1938), los bioensayos con meristemos de las raíces de varias plantas como *A. cepa*, *A. sativum* y *Tradescantia*, se utilizan

ampliamente para determinar los efectos biológicos de productos químicos. Adicionalmente, a las mencionadas anteriormente, otros investigadores trabajan en evaluar la división de células mitóticas en diferentes plantas, dentro de las que se pueden mencionar *Capsicum annum*, *Ocimum sanctum*, *Triticum aestivum*, *Phaseolus vulgaris* y *Raphanus sativus*. El meristemo de la punta de la raíz de *Allium* se caracteriza por una masa homogénea de células que se dividen rápidamente con 16 cromosomas grandes (2n= 16), lo que lo convierte en un sistema ideal para los bioensayos. Por lo anterior, las variaciones mitóticas así inducidas en las

células de la punta de la raíz de *A. cepa* pueden ser útiles en estudios citológicos [2,3].

En estudio recientes con *Allium cepa*, se reporta el efecto citotóxico del glifosato, evidenciándose que, a mayor concentración de dicho químico, menor fue el índice mitótico [4]. Así como, otras investigaciones utilizan células meristemáticas de raíces apicales de *Pisum sativum* y *Lens culinaris* como bioindicadores del efecto citotóxico de diferentes compuestos químicos como el hipoclorito de sodio [5,6] clorpirifos [7], malatión [8], propinil [9] y paraquat, observándose también inhibición de la mitosis [10].

El análisis citológico con respecto al comportamiento mitótico o meiótico es uno de los índices más confiables para estimar la potencia de los mutágenos. Los estudios de la actividad antimitótica empleando células meristemáticas de la punta de la raíz de *A. cepa* demuestra ser un sistema fiable, eficiente y rentable para realizar pruebas del efecto citotóxico, genotóxico y mutagénico [3,11]. También, se conoce que algunos compuestos estimulan la actividad mitótica, mientras que otros provocan actividad mitodepresiva y tóxica. Estos compuestos mitodepresores son eficaces contra las células que están proliferando y algunos de ellos producen un efecto citotóxico, ya sea dañando el ADN durante la fase S (síntesis) del ciclo celular o bloqueando la formación del huso mitótico en la fase M (mitosis) [11].

Además, la prueba de *A. cepa* se está utilizando para el diagnóstico de toxicidad de diferentes compuestos por su gran sensibilidad, es por ello, que en la actualidad se viene usando para monitorear el grado toxicológico de compuestos farmacéuticos, alimenticios y contaminantes, entre otros, esto debido a que fácilmente se pueden obtener un diagnóstico citogenético. Esto implica que hay variaciones en las divisiones celulares y una forma de determinarlo es mediante el cálculo del índice mitótico en el meristemo de las raíces. De manera que, la prueba de *A. cepa* aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempos de exposición. [12,13,14]. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue resaltar la aplicabilidad de la prueba de índice mitótico en células meristemáticas de *A. cepa* y comparar los datos del % IM obtenido en condiciones ambientales controladas con los % IM reportados en otros estudios en el ensayo control.

2. Métodos y materiales

2.1 Índice Mitótico

Las zonas radiculares de las cebollas (*A. cepa*) se limpian para eliminar partes secas (catáfilas y raicillas). En un frasco con agua de grifo se colocaron los bulbos de *A. cepa* en contacto del disco germinativo con la superficie del agua,

este montaje se estableció 4 días antes de su uso y se mantienen en una zona aireada, entre 20 y 22 °C, además, se recomienda cambiar el agua al menos 2 veces al día. Terminado el tiempo de crecimiento entre 2-3 cm de las raíces, se cortaron 2 mm de la punta de la raíz (meristemo) y estos se colocaron por 20 minutos en la solución de etanol-acético (3:1 V/V). Posteriormente, se adicionó 1ml de una disolución de HCl 1N durante 10 minutos a 60°C. Las raíces se lavaron con agua fría por 4-5 minutos y secaron con papel absorbente, finalmente, se realizó el montaje en el portaobjetos, se agregó aceto-orceína durante 5 minutos a 50°C, se rompió el meristemo por la técnica de aplastamiento, finalmente, los montajes se sellaron con entelan y se examinaron con el microscopio óptico Nikon Eclipse 80i [1,15]. Las diferentes fases de la mitosis se cuentan para calcular el índice mitótico (%IM) con la siguiente fórmula: $\%IM = TDC \times 100 / TC$.

TDC= Total de células en división

TC= células totales (células en división y células en no división) [2]

El registro micrográfico se hizo utilizando la cámara Nikon Ds-Fi1. Para calcular el %IM, se contaron las células en 7 campos microscópicos (objetivo 100x). El valor del índice mitótico de *A. cepa* se comparó con los índices mitóticos obtenidos en otros estudios para esta especie de *Lilliacea*.

2.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó comparando las medias aritméticas y su desviación estándar del índice mitótico, que se calculó en este estudio y los reportados en otras investigaciones para el ensayo control. Además, posteriormente los datos se analizaron empleando el programa GraphPad Prism, usando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el método de Dunnett's, esto con el fin de comparar las diferencias significativas entre el %IM obtenido y los reportados en células meristemáticas de *A. cepa*.

3. Resultados y Discusión

Después del crecimiento de las raíces de *A. cepa* como se describió en la metodología, los montajes se observaron al microscopio y se contaron las células en las fases de profase, metafase, anafase, y telofase de la mitosis (Fig. 1 a y b). Posteriormente, se determinó el índice mitótico de las células del meristemo de *A. cepa*, y se obtuvo un %IM de 14.92 ± 1.18 . Al comparar este resultado con los conseguidos por otros estudios, se evidenció que el valor obtenido de 14.92 ± 1.18 no presentó diferencias con registros de un %IM 14.4 ± 0.854 y 14.43 ± 0.307 [1]. Por otro lado, también se observó mayores diferencias en el % IM, ya que se reportaron % IM de 4.33 ± 0.24 [11] hasta 26.1 ± 1.6 [16] (Tab. 1).

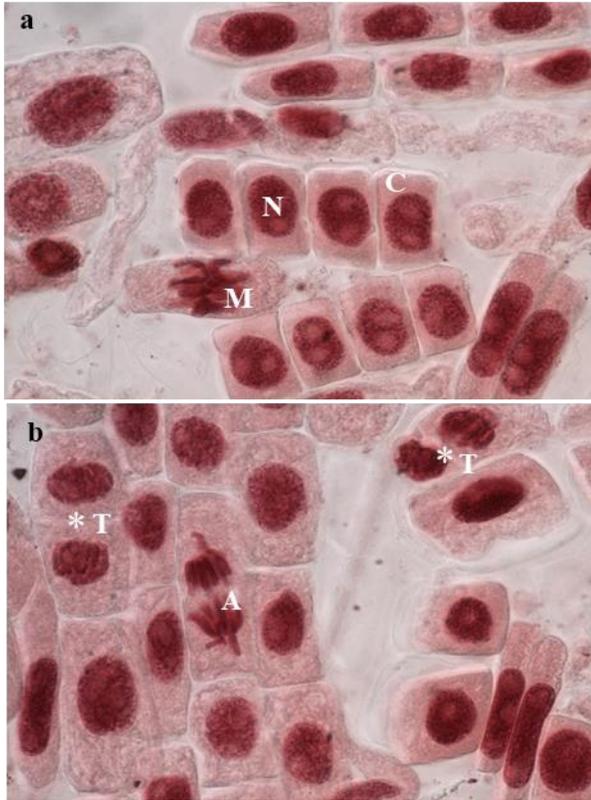


Figura 1. a y b células del meristemo de *A. cepa* en mitosis. N: núcleo, C: citoplasma, M: Metafase, A: Anafase, T: Telofase tardía y * citocinesis. Microscopía óptica, objetivo 100X mediante tinción de aceto-orceína.

Al comparar el %IM obtenido con los %IM reportados se observó que el grupo de datos que se reportaron en un rango entre 14.4 ± 0.854 a 26.1 ± 1.6 , no se evidenciaron diferencias significativas con el obtenido en este estudio, mientras que con el grupo de datos en un rango de 4.33 ± 0.24 a 6.74 ± 1.17 existen diferencias significativas ($p < 0.0001$). (Fig. 2).

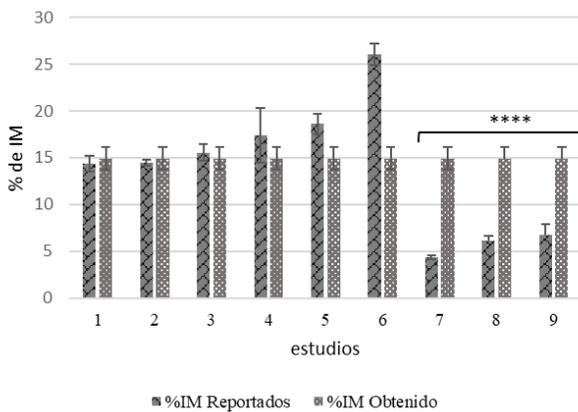


Figura 2. Comparación del %IM reportados y obtenido en estudios de meristemo de *Allium cepa*. **** ($p < 0.0001$).

Tabla 1. Reportes del % IM en meristemo de *A. cepa*

Año del estudio	Condiciones para la obtención de la raíz de <i>A. cepa</i> en los bulbos de cebolla	%IM para el meristemo de <i>A. cepa</i> ±DE
2010	Crecieron en agua de grifo durante 48 horas a temperatura de 22 ± 1 °C, longitud de la raíz 2-2.5 cm	6.74 ± 1.17 [17]
2013	Se colocaron en agua de grifo por 3 días, longitud de la raíz de 2-3 cm	14.4 ± 0.854 [1]
2013	Se ubicaron en agua de grifo por 3 días, longitud de la raíz de 2-3 cm	14.43 ± 0.307 [1]
2014	Se colocaron en agua de grifo por 48 horas a temperatura ambiente, posterior se dejaron en agua destilada por 3, 6 y 12 horas.	4.33 ± 0.24 [11]
2014	Se mantuvieron en agua de grifo por 24 horas a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), posterior se dejaron por 4 días en la oscuridad a temperatura ambiente.	6.16 ± 0.45 [18]
2016	Se cultivaron en macetas que contenían arena y suficiente agua. Cuando las raíces crecieron hasta 2-3 cm de largo, los bulbos se sacaron, lavaron y colocaron en agua destilada por 1 hora.	15.53 ± 0.89 [3]
2018	Se pusieron en agua destilada a 20 ± 2 °C y se protegieron contra la luz solar directa durante 3 días hasta que se obtuvieron raíces de 1 a 2 cm de longitud, posteriormente, se dejaron por 24 horas en agua destilada.	26.1 ± 1.6 [16]
2020	Los bulbos de cebolla de un tamaño promedio en diámetro y peso se lavaron con agua corriente y se colocaron en recipientes esterilizados con agua desionizada, a temperatura ambiente para el crecimiento de la raíz por un tiempo de 72 horas.	17.4 ± 2.9 [4]
2020	En recipientes esterilizados con agua destilada se colocaron los bulbos de cebolla con un peso y diámetro definido, se dejaron crecer las raíces a temperatura ambiente durante 3 día.	18.6 ± 1.1 [9]

También existen investigaciones del índice mitótico en otras especies de plantas en estudios de citotoxicidad de diferentes compuestos químicos, por ejemplo, es el caso de *Lens culinaris* y *Pisum sativum*, donde se registraron %IM de 17.4 ± 1.5 , 18.4 ± 1.5 , 16.2 ± 1.3 , 15.2 ± 6.3 y 17.6 ± 0.8 para la primera especie, y de 19.2 ± 2.48 para la segunda especie [5, 6, 7, 8, 9,10].

4. Conclusiones

Los resultados de los %IM obtenido en este estudio y los reportados por otros autores en condiciones control para el crecimiento del meristemo de *A. cepa*, indicaron que se presentaron variabilidad en los datos, desde %IM de 4.33 ± 0.24 [11] hasta 26.1 ± 1.6 [16], esto puede ser debido a la diferencia en las condiciones de desarrollo de las raíces como el tipo agua (grifo o destilada) o en tierra, tiempo, temperatura, fotoperiodos luz/oscuridad, así como el estado fisiológico del bulbo de cebolla. Por lo anterior, se evidenciaron diferencias significativas al comparar los datos

del %IM (rango %IM de 4.33 ± 0.24 a 6.74 ± 1.17) con el obtenido (14.92 ± 1.18) ($p < 0.0001$).

El %IM calculado en este trabajo es de 14.92 ± 1.18 , el cual no presentó diferencias significativas con los reportados en otros estudios (14.4 ± 0.854 y 14.43 ± 0.307) [1], siendo un modelo eficaz para estudios *in vitro* de la actividad antimitótica de diferentes compuestos sintéticos o naturales en células meristemáticas de la punta de la raíz de *A. cepa*. a unas condiciones experimentales definidas.

Referencias

- [1] C. Cumpa-Yuption, F. Zavala-de la Cruz, “determinación del índice mitótico de meristemas radiculares de *Allium cepa* expuestas al extracto etanólico de hojas de *Erythroxylum coca` coca`* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición”, Sagasteguiana, pp. 29-38, 2013.
- [2] D. Deogade, P. Nasare, “Mitotic index (MI) and phase index (PI) in *Allium sativum* linn. (variety agrifound white and yamuna safed)”, I J R B A T, vol. 4, n° 1, pp. 188-192, 2016. DOI:10.29369/ijrbat.2016.04.1.0007
- [3] K. Kavitha, M. Shijil-Kumar, C. Lalitha, “Cytotoxicity testing of the fruit extracts of *Rauwolfia tetraphylla* L. using the *Allium cepa* chromosome aberration assay”, International Journal of Advanced Research, vol. 4, n° 1, pp. 1258- 1264, 2016.
- [4] S. A. Salazar-Mercado, J. D. Quintero-Caleño, “Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator”, Science of the total environment, vol 700, pp. 1-8, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134452
- [5] S. A. Salazar-Mercado, C. A. Torres-León, J. P. Rojas-Suárez, “Cytotoxic evaluation of sodium hypochlorite, using *Pisum sativum* L as effective bioindicator”, Ecotoxicology and environmental safety, vol 173, pp. 71-76, 2019. DOI:10.1016/j.ecoenv.2019.02.027
- [6] S. A. Salazar-Mercado, H. A. Maldonado-Bayona, “Evaluation of the cytotoxic potential of sodium hypochlorite using meristematic root cells of *Lens culinaris* Med”, Science of the total environment, vol 701, pp. 1-7, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134992
- [7] S. A. Salazar-Mercado, H. A. Maldonado-Bayona, “Evaluation of cytotoxic potential of chlorpyrifos using *Lens culinaris* Med as efficient bioindicator”, Ecotoxicology and environmental safety, vol 183, pp. 1-7, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109528
- [8] S. A. Salazar-Mercado, J. D. Quintero-Caleño, “Determination of malathion's toxic effect on *Lens culinaris* Medik cell cycle”, Heliyon, vol 6, pp. 1-5, 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04846
- [9] S. A. Salazar-Mercado, J. D. Quintero-Caleño, J. P. Rojas-Suárez “Cytogenotoxic effect of propanil using the *Lens culinaris* Med and *Allium cepa* L test”, Chemosphere, vol 249, pp. 1-8, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126193
- [10] S. A. Salazar-Mercado, J. D. Quintero-Caleño, “Use of *Lens culinaris* Med test as environmental bioindicator to identify the cytogenotoxic effect of paraquat pesticide”, Environmental Science and Pollution Research, vol 28, pp. 51321-51328, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-14352-0
- [11] S. Selmi, T. S. Abdelfattah, F. D. Mostafa, “Deregulation of Mitosis Progression and Cytotoxic Effect Triggered in *Allium Cepa* L. Roots by *Rubus Sancaus* Schreber Extract”, Life Science Journal, vol. 11, n° 11, pp. 1047-1058, 2014.
- [12] P. Vazhangat, J. Thoppil, “Apoptotic induction via membrane/DNA damage and metabolic inactivation by synthetic food colorants in *Allium cepa* root meristem”, Turk J Biol, vol. 40, pp. 922-933, 2016. DOI:10.3906/biy-1511-26
- [13] S. E. Chorzempa, O.S Perniola, S. M. Moscheński, C. López, F. Pantuso, M. Molina, “El índice mitótico como parámetro estimador de la tolerancia a bajas temperaturas durante la germinación de *Zea mays*”, Revista de la Facultad de Agronomía, vol. 116, n° 2, pp. 259-266, 2017.
- [14] A. Berrocal, R. Blas, J. Flores, M. Siles, “Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla”, Rev. Colomb. Biotecnol, vol. XV, n° 1, pp. 17-27, 2013.
- [15] N. Jaimes-Méndez, R. Rodríguez-Martínez. *Biología celular. Observaciones y experimentos*, Pamplona: Editorial Universidad de Pamplona, 2016.
- [16] S. Datta, J. Singh, J. Singh, S. Singh, Singh, “Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test”, Sustainable Environment Research, vol. 28, pp. 171-178, 2018. DOI:10.1016/j.serj.2018.01.005
- [17] T. Askin-Celik, O. Sultan-Aslantürk, “Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with *Allium Test*”, Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2010, pp. 1- 8, 2010. DOI:10.1155/2010/189252
- [18] J. C. Chukwujekwu, J. Van Staden, “Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn”, South African Journal of Botany, vol. 28, pp. 147-150, 2014. DOI:10.1016/j.sajb.2014.03.001