

ANALISIS CITOGENETICO Y CITOQUIMICO DE URENA *Lobata* y *Sinuata*

Sonia De Greiff M.*

REVISION BIBLIOGRAFICA

Se llevó a cabo una revisión exhaustiva de la literatura existente sobre la familia Malvacea Género *Urena* en la Biblioteca Central a la Universidad Nacional y en la biblioteca de la Compañía de Empaques y se conocieron resúmenes de artículos que sobre dicho tema se han publicado en el mundo; toda la Bibliografía se refería al cultivo de esta planta, requerimientos de mayor desarrollo, enriado, rendimiento, aspectos económicos o análisis de celulosa en la fibra, pero ninguno trataba sobre análisis histo-químicos ó morfología detallada de la fibra.

RESUMEN

En este estudio se ha realizado un análisis histoquímico y morfológico de las fibras de varias plantas del género *Urena* en sus variedades *Lobata* y *Sinuata* que se cultivan en varias zonas del territorio Colombiano con un mínimo de exigencias en las condiciones químicas del suelo y con grandes perspectivas de substituir en la industria a diferentes fibras como las del yute y ramio entre otras. Antes de dar comienzo al trabajo, se quiso definir la filogenia de las plantas, con un estudio cromosómico hecho en anteras y raicillas de plantas obtenidas de semillas donadas por la Compañía de Empaques.

Del estudio sobre las fibras de las plantas de *Urena*, *lobata* y *sinuata* se obtuvieron datos sobre su génesis, composición química, concentración y estado de deterioro a través del enriado.

INTRODUCCION

Las fibras de las plantas dicotiledóneas en estudio que son fibras del floema (Liberianas) contienen una cantidad media de lignina en relación con la

* Profesora Asociada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional.

celulosa, clasificándose en este aspecto como Lignino-Celulósica según Esau (4). Otros componentes de la fibra, reconocidos como Polisacáridos no celulósicos que forman parte de la pared celular son: la manana, xilana, arabana y galactana.

Con el fin de analizarlos se hicieron una serie de reacciones histoquímicas a nivel de tejido, en comienzos de la formación de la fibra, y en la fibra madura después de que se ha constituido la pared secundaria con sus capas. También se le prestó interés en este estudio, al aspecto morfológico de la fibra, a su localización dentro del tallo, y a la concentración de las mismas en relación con el desarrollo de éste, y de sus cubiertas externas a fin de obtener una visión panorámica del conjunto; con este fin se consultaron Dewey (3) y Kirby (12).

De acuerdo a lo anterior, para dar comienzo a estos análisis, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- 1) Seguir el proceso de desarrollo de las fibras de la planta desde el estadio de plántula hasta la planta adulta.
- 2) Observar el proceso de desarrollo fibrilar para establecer en cuál estado del desarrollo inicial del tallo se encuentran una mayor concentración de fibras.
- 3) Relacionar el periodo en el cual se encuentra una mayor concentración de fibras, con el desarrollo de la corteza, con la mayor o menor concentración de suberina y el espesor total del tallo.
- 4) Realizar análisis histoquímicos para localizar los diferentes constituyentes de las fibras maduras e inmaduras.
- 5) Establecer el diámetro, espesor mural, lumen y promedio del lumen de la fibra madura.
- 6) Hacer observaciones sobre el estado de la fibra durante los días que permanece en el enriado con el fin de observar un posible deterioro de la fibra por exceso de la acción enzimática bacteriana.
- 7) Hacer un recuento cromosómico de cada planta para definir las filogenéticamente.

MATERIALES Y METODOS

El material a investigar: tallos y semillas de las dos variedades de Urena fueron obtenidos a través de la Compañía de Empaques y traídas de las Regiones del Chocó, Valle y Medellín. (Ver fotos No. 1 y 2).

Para algunos de los exámenes citoquímicos se recurrió a cortes a mano alzada fresco y otros por el método de inclusión en parafina y cortes, con un espesor entre 6 y 15 micras según el caso, también se utilizaron fibras obtenidas por enriado, según el método de Guth (8).

Las coloraciones llevadas a cabo para identificación de los componentes químicos de las fibras fueron de alta especificidad así: Reconocimiento de

lignina (Test de fluroglucinol), celulosa, (cloruro de zinc yodado) aminoácidos, (test de Million), polisacáridos no celulósicos, (Reacción de Schiff (pas) previa extracción de componentes de interferencia. En estas técnicas se siguieron las modificaciones de Jensen (9) y Fuller (6).

Para la observación de la epidermis de la hoja con fines a observar estomas, células epidérmicas y cristales, se siguieron los métodos de extracción de la clorofila con posterior coloración de safranina y ácido pícrico, de acuerdo a la metodología de Johansen (10).

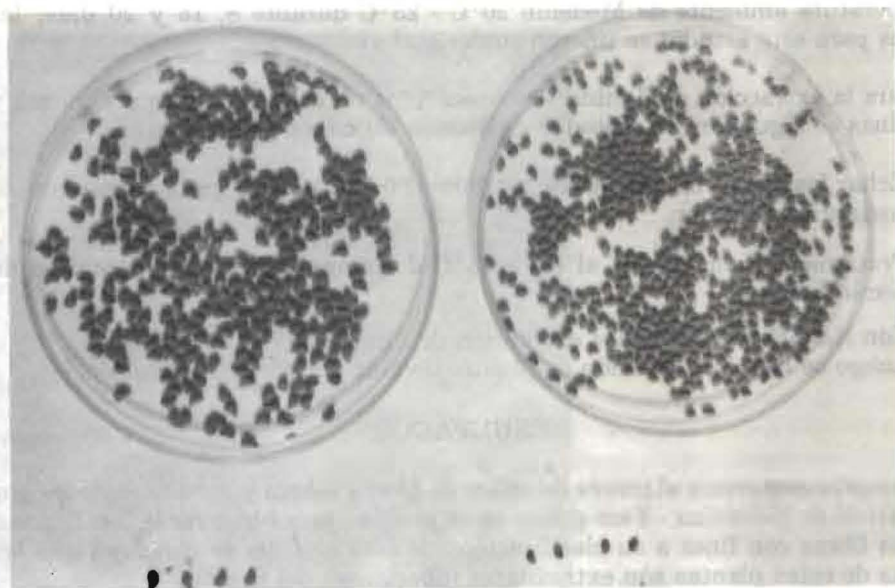


Urena sinuata



Urena lobata

FOTO No. 1



Semillas tetraploides

semillas diploides

FOTO No. 2

La coloración elegida para observar suberina y fibras a la vez fue la Sudán III para la observación de detalles morfológicos se escogieron las coloraciones de Safranina cristal violeta y safranina - fast-green.

Para la fotografía se empleó la cámara fotográfica automática m-f matic; el microscopio empleado fue un Zeiss modelo Ampival.

En el estudio sobre germinación de la semilla se utilizaron cajas de Petri con doble papel de filtro y tierra; se escogieron varias técnicas de tratamiento y cultivo:

- a) Se sembraron semillas con espículas, en cajas de Petri con papel de filtro doble.
- b) Se sembraron sin espículas en la misma condición.
- c) Se sembraron semillas sin y con las espículas en tierra.
- d) Se sembraron semillas que tuvieron tratamiento previo en ácido concentrado por cinco minutos a temperatura de 10°C y enjuague con agua estática para evitar recalentamiento.

Para recuentos cromosómicos se utilizaron anteras según el método de Kirby (12) y raicillas que se fijaron en etanol acético (3:1) y se tiñeron con orceína acética.

Las fibras obtenidas por enriado para observar el deterioro durante dicho proceso, se obtuvieron de tallos que permanecieron en agua estancada a temperatura ambiente de Medellín 20°C - 25°C durante 8, 15 y 20 días; las fibras para este estudio se tiñeron con cristal violeta.

Para la extracción de lignina y polisacáridos no celulósicos hemicelulosas y pectinas se siguieron los métodos de Jensen (9) cuyos pasos son:

- a) Echar los cortes en oxalato de amonio al 0.5°C a 70°C para extracción de sustancias pécticas;
- b) Tratamiento con Na OH al 4% a 25°C de temperatura para extracción de hemicelulosa y
- c) Con Na OH al 17.5% para extracción de lignina.
Luego se hizo la coloración de cloruro de zinc yodado para celulosa.

RESULTADOS

Los primeros cortes al través de tallos de *Urena lobata* y *sinuata* teñidos por el método de Safranina - Fast-green, se emplearon para observar la localización de las fibras con fines a su clasificación; de este análisis se concluyó que las fibras de estas plantas son extraxilares (liberianas) del floema.

A mayores aumentos del microscopio se observó que las fibras poseen lúmenes de diferente forma, algunos de aspectos elipsoide y otros un poco más

redondeados; en cuanto a tamaño, unos lúmenes eran más pequeños que otros lo que nos lleva a la conclusión de que esta panorámica corresponde a un haz de fibras de tipo fusiforme cortadas a diferente nivel, de acuerdo a su disposición natural en el tallo. (Ver foto No. 3 y 4 para el corte longitudinal de las fibras.)



FOTO No. 3
Haces de fibras (Corte transversal)

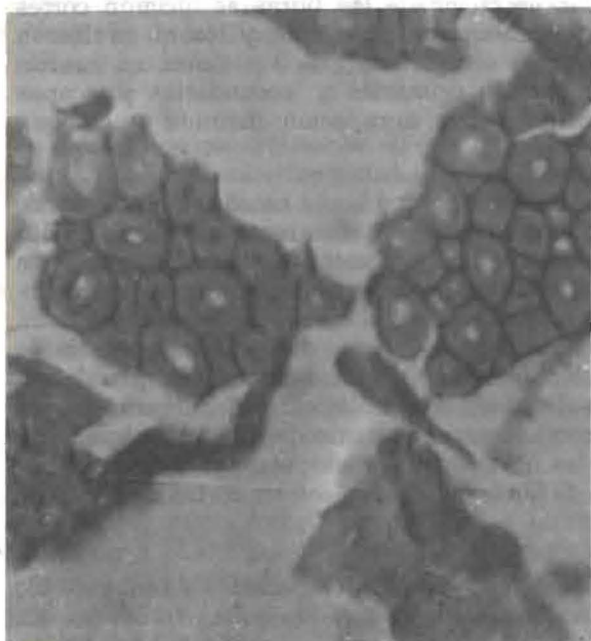


FOTO No. 4
Haces de fibras (Corte longitudinal)

Estas fibras además poseen gran espesor mural como puede apreciarse en la gráfica. Observadas con un colorante débil y con juego de filtros y luz en el microscopio, es posible observar las capas de la pared secundaria con refringencia alternante (Anisotropía), que posiblemente corresponden a constituciones celulósicas y no celulósicas de la pared celular según conceptos de Stterfield (15).

ESTUDIO CITOQUIMICO.

Para la identificación de la celulosa en la fibra, se utilizó la reacción de cloruro de zinc yodado en cortes, al través, de fibras obtenidas por maceración; la reacción no mostró el color azul propio de la celulosa, sino un color amarillo-café correspondiente a lignina (Holocelulosa), cuya presencia fué confirmada por medio de un test más específico para este componente, que fue el floroglucinol; las fibras de cabuya dieron también positiva la prueba para lignina, pero con una coloración de mayor intensidad lo que comprueba que poseen mayor cantidad de lignina que los *Urena lobata* y *sinuata*. El fenómeno de negatividad que dió la prueba de cloruro de zinc yodado para el caso de la celulosa, en ambos cortes, es debido a que la lignina enmascaró la reacción de celulosa y debió entonces procederse con reacciones que extrajeran componentes de interferencia. Los métodos utilizados para extraer estas sustancias son los de Mac Manus (13) Jensen (7) y Currier: 2) ya mencionados en la metodología.

Una vez extraídos los componentes, la reacción para la celulosa, se pudo ver claramente.

Para ver el desarrollo y la concentración de las fibras se hicieron cortes secuenciales al través, de tallos, con diámetros entre 3mm. y 15mm. se tiñeron con safranina y sudán III. Los cortes con diámetro de 3 y 4 mm. mostraron fibras apenas en desarrollo con paredes primarias y secundarias sin capas adicionales; las fibras no mostraron una agrupación definida y estaban esparcidas entre el floema y la corteza.

El estudio sobre la concentración de fibras fué hecha en cortes al través, de tallos entre 5mm. y 15 mm. de diámetro los cuales mostraron un ordenamiento de las fibras en haces definidos y en progresivo aumento de la concentración en el número de fibras, de acuerdo al espesor del tallo. Las mayores concentraciones fueron encontradas en los cortes de tallos con diámetros entre 8 y 10mm. que además contenían escasa suberina en la corteza dato que me pareció de importancia reportarlo, pues tallos de estos mismos diámetros desprendieron siempre fácilmente sus fibras en el enriado. Los tallos entre 11 y 15mm. de diámetro de ambas plantas empezaron a mostrar aumento de suberina y hubo dificultad en el desprendimiento de las fibras en el enriado; estos tallos no mostraron aumento en la concentración de fibras en relación con los cortes de 8 y 10 de 8 y 10 mm. de diámetro.

Con el fin de observar la formación de capas de suberina, en tallos de los mismos diámetros reportados anteriormente, se hicieron cortes transversales, seriados.

ESTUDIO CROMOSOMICO

Del estudio cromosómico en *Urena lobata* y *sinuata* se obtuvieron resultados de interés, ya que para definir filogenéticamente ambas plantas, se hizo estudio a nivel de anteras con el fin de contar números cromosómicos básicos; la conclusión fue la siguiente:

Escasas plantas presentaron un número cromosómico, básico de $X=7$ en anteras. Otras plantas mostraron un número cromosómico básico de $X=14$ y otros $X=28$. Obsérvese que los dos últimos números básicos son múltiplos del 7, lo que revela que en este género existe poliploidía.

Para comprobarlo se hicieron preparados de raicillas de todas las plantas, y en la *Urena lobata*, se encontraron plantas con dos números diploides: $2n=28$ y $2n=56$ o sea que si nos basamos en el número haploide de $x=7$, estas plantas de *Urena lobata* son tetraploides y octoploides respectivamente. Las plantas de *Urena sinuata* solo dieron $2n=28$ las cuales se pueden definir como tetraploides.

Como aporte de pruebas por definir poliploidías, se hizo estudio adicional del tamaño de los estomas en las diferentes plantas, observándose mayor tamaño en las poliploides con respecto a las diploides; también variaron los tamaños de las semillas en plantas con diferentes poliploidía (ver foto No. 2).

DISCUSION

Se realizaron análisis microscópicos de cortes transversales de tallos de *Urena lobata* y *sinuata* desde la edad de un mes y medio con fines a observar el desarrollo de las fibras y se pudo constatar una temprana génesis de éstas en tallitos desde 2,5 mm. de diámetro.

También se quiso observar en esta muestra la corteza, por medio de tinciones específicas para suberina y cutina con el fin de medir el grado de suberización a medida que la planta toma un mayor diámetro. En muestras de tallos con 2,5mm. y 3mm. sólo se pudo ver la capa de cutina que en el Sudán III aparece ligeramente rojiza; en tallos entre 4mm. y 10mm. también se pudo ver claramente la capa de cutina, pero se observaron bien los depósitos de suberina en las células del felógeno. En estos tallos se observó mayor grosor del espesor mural y los tallos entre 5mm. y 10mm. mostraron capas en la membrana secundaria. Los tallos con diámetro entre 11 y 15mm. mostraron una suberización progresiva de acuerdo al aumento de diámetro y con el colorante de Sudán III se tiñeron de pardo-rojizo y pardo oscuro según la cantidad de depósito de esta sustancia.

Cortes al través de tallos entre 3mm. y 15mm. se tiñeron con Sudán III para observar a cuál diámetro correspondía la mayor concentración de fibras y el mínimo de cantidad de suberina; la mayor concentración de fibras y menor cantidad de suberina, fué encontrada en tallos con diámetro; entre 8 y 10mm. en las dos plantas.

El hecho de analizar estos dos factores en conjunto, se consideró de interés ya que con los tallos que poseen estas características, se obtiene mejor resultado en el proceso de enriado. En los tallos entre 12 y 15mm. de diámetro, con abundante suberización, se hace más difícil el desprendimiento de las fibras, y deberá apelarse a procesos químicos poco económicos.

Como varios de los cortes transversales de fibras obtenidas por enriado tuvieron que ser descartadas porque mostraron alteraciones de la pared de la fibra, se resolvió hacer un chequeo del deterioro de esta durante el proceso del enriado y para ello se hicieron cortes transversales de fibras con 8, 10 y 20 días de enriado que habían permanecido en un recipiente sin recambio de agua.

Los resultados que ya fueron anotados, nos llevan a concluir que el tiempo durante el cual permanecen las fibras en el agua, es definitivo para la conservación o deterioro de la fibra. Lo anterior ha sido corroborado por amplios estudios llevados a cabo por ANH (1). A los 8 días de enriado, la pared celular está intacta, con ligeras lesiones, a los 13 días, y con claro deterioro de la pared de este tiempo en adelante.

Eyre y Nodder (3) quienes han investigado sobre el proceso de enriado han considerado cuatro períodos en relación con las enzimas formadas en el proceso. Estos períodos son:

- 1) Período de fermentación de azúcares solubles por microorganismos presentes, con producción de dióxido de carbono.
- 2) Formación de pectinasas que atacan las pectinas que sostienen unidas las células pero no disuelven la laminilla media, y formación de protopectinasas que convierten la pectina en pectato.
- 3) Rápida descomposición de la laminilla media en especial de las células corticales que rodean los paquetes de fibras con formación de pectinasas que atacan el pectato de calcio y pectinas solubles de la laminilla media, con aparición de ácido galacturónico en el agua del enriado y consiguiente deterioro de la fuerza y la calidad de la fibra. También es posible que los ácidos formados en este proceso de maceración, por los microorganismos, contribuyan a la degradación de la fibra. Treaves (5) y Kerckhoff (11) describen las formas más comunes de ataque bacterial caracterizado por zonas de erosión en la pared de la fibra desde el lumen a la región de la laminilla media; cuando se ha llegado a un extremo de ataque bacterial, las paredes primaria y secundaria de fibras adyacentes son completamente destruidas lo mismo que la laminilla media.

Los estudios de citoquímica orientados a localizar posible existencia de celulosa y lignina tuvieron dificultades debido a otros componentes de la fibra que interfirieron la reacción de color de las sustancias mencionadas y se tiñeron como un amiloide, con la coloración del rojo-congo; con el fin de obtener resultados con alta especificidad, se removieron las sustancias de interferencia tales como hemicelulosas, polisacáridos no celulósicos y pectinas y se hicieron las reacciones de cloruro de zinc yodado para la celulosa y el de floroglucinol para la lignina que dieron positivas en ambos casos con una reacción de color de intensidad media lo que confirma que la constitución de la fibra es lignino-celu-

lógica a partes iguales aproximadamente; la prueba de Million para aminoácidos, resultó negativa.

Se quiso adicionar al estudio de la fibra el promedio del espesor mural de la misma y el promedio del lumen. Los resultados fueron:

Promedio del lumen: 37μ (Micras) *Urena lobata*; $35,5 \mu$ micras *Urena sinuata*.
Promedio de espesor mural: $3,3 \mu$ (Micras) *Urena lobata*; $3,0 \mu$ *Urena sinuata*.

Para estas medidas se consultaron las técnicas de Scalla y Col (12).

Del estudio cromosómico hecho a las plantas se obtuvo por conclusión que en este género existe el fenómeno de la poliploidía lo cual justifica el gran polimorfismo de las plantas, en gran parte. Además de los recuentos cromosómicos, se obtuvieron datos sobre dichas plantas que comprueban lo anteriormente dicho, como fueron la diferencia en el tamaño de estomas y de semillas, la diferente coloración de las hojas que apareció más oscuro en la mayor poliploidía, y crecimiento que fué más lento en este mismo caso. La variedad conocida como *Urena lobata* presentó 2 tipos de guarniciones cromosómicas: $2n = 28$ y $2n = 56$ en tanto que la *Sinuata*, sólo presentó una: $2n:28$ lo que confirmó la existencia de poliploidías en este género.

CONCLUSIONES

- 1) Las fibras de las plantas conocidas como *Urena lobata* y *Urena sinuata* tienen temprana formación, pudiéndose observar fibras completamente maduras desde tallos con 5mm. de diámetro.
- 2) Se encontró una mayor concentración de fibras, en los tallos entre 8 y 10mm. de diámetro.
- 3) En tallos con las medidas de diámetro anteriormente descritas, se encuentra escasa formación de suberina, lo cual facilita el proceso enriado de los tallos.
- 4) En los tallos con diámetro entre 12 y 15mm. se encontró el mismo grado de concentración de fibras, pero la corteza contenía abundante cantidad de suberina que dificulta el proceso de enriado.
- 5) Los estudios citoquímicos definieron las fibras de *Urena lobata* y *sinuata* como lignino-celulósicas.
- 6) Con prolongación del tiempo del enriado por un período mayor de 13 días y a temperatura ambiente de Medellín, la fibra empieza a sufrir deterioro de la pared celular, con menoscabo de fuerza y calidad.
- 7) Las dos plantas difieren, en el número cromosómico pero ambos son múltiplos de un mismo número básico por lo cual se pudo confirmar la existencia de poliploidías.
- 8) La prueba de germinación de semillas sin tratamiento químico previo fué positiva en un 3%. En semilla que fuera tratada con ácido sulfúrico, previamente, el porcentaje de germinación fué de 8%.

BIBLIOGRAFIA

1. AHN, P. 1963. The production of the lobata fibre in Ghana. *World Crops* 15: 92-97.
2. CURRIER H.B. 1957. Callose Substance in plant Cells-Am. j. Botany 44: 478-488.
3. DEWEY LYSTER H. 1964. *Fibras vegetales* 1a. ed. Helio. México 81 p.
4. E S A U. Katherine 1959. *Anatomía vegetal* 2a. ed. Edit. omega Barcelona 213 p.
5. EYRE J. and NODDER. 1924. A experimental Study of flax selling. *Trans. Test. Ind.* 14: 237.
6. FULLER M.S. and BARHAD Y. 1960. Chitin and celulose in the Walls of Rhizidiomyces. *Am. J. Botany* 47: 105-109.
7. GREAVES H. 1969 *Micromorphology of the bacterial attack of wood.* 3: 150-166.
8. GUTH Edith B. Extracción y estudio de las fibras de paja vizcachera *Stipa BRACHY-CHACTA.* *Godr. Revista de investigaciones Agrícolas* 15: 619-639.
9. JENSEN A WILLIAM 1964. *Botanical Histochemistry* ed. la. W. H. Freeman and Company. San Francisco 199 p.
10. JOHANSEN. 1940. *Plant microtechnique.* la. ed. Mc. Graw Hill Book Company inc 80 p.
11. KERCKHOFF. 1936. The Chemistry and physiology. of the pectins. the *Botanical Review* 2: 475.
12. KIRBY- R. H. 1963. *Vegetable Fibres.* 1a. Ed. Interscience publishers inc. New York 2 p.
13. MAC MANUS AND F.A. 1948. Histological and Ana Fistochemical uses of periodic acid. *Stain Tech.* 23: 99.
14. SCALLAN AND E. GREEN. 1973. A Technique for determining the transverse dimensions of the fibres in Wood. *Wood and Fiber* 5: 323.
15. STTERFIELD G. AND BAYLEY S.T. 1961. Structure and physiology of cells. Walls. *Annual Review of plant Physiology* 12: 35.