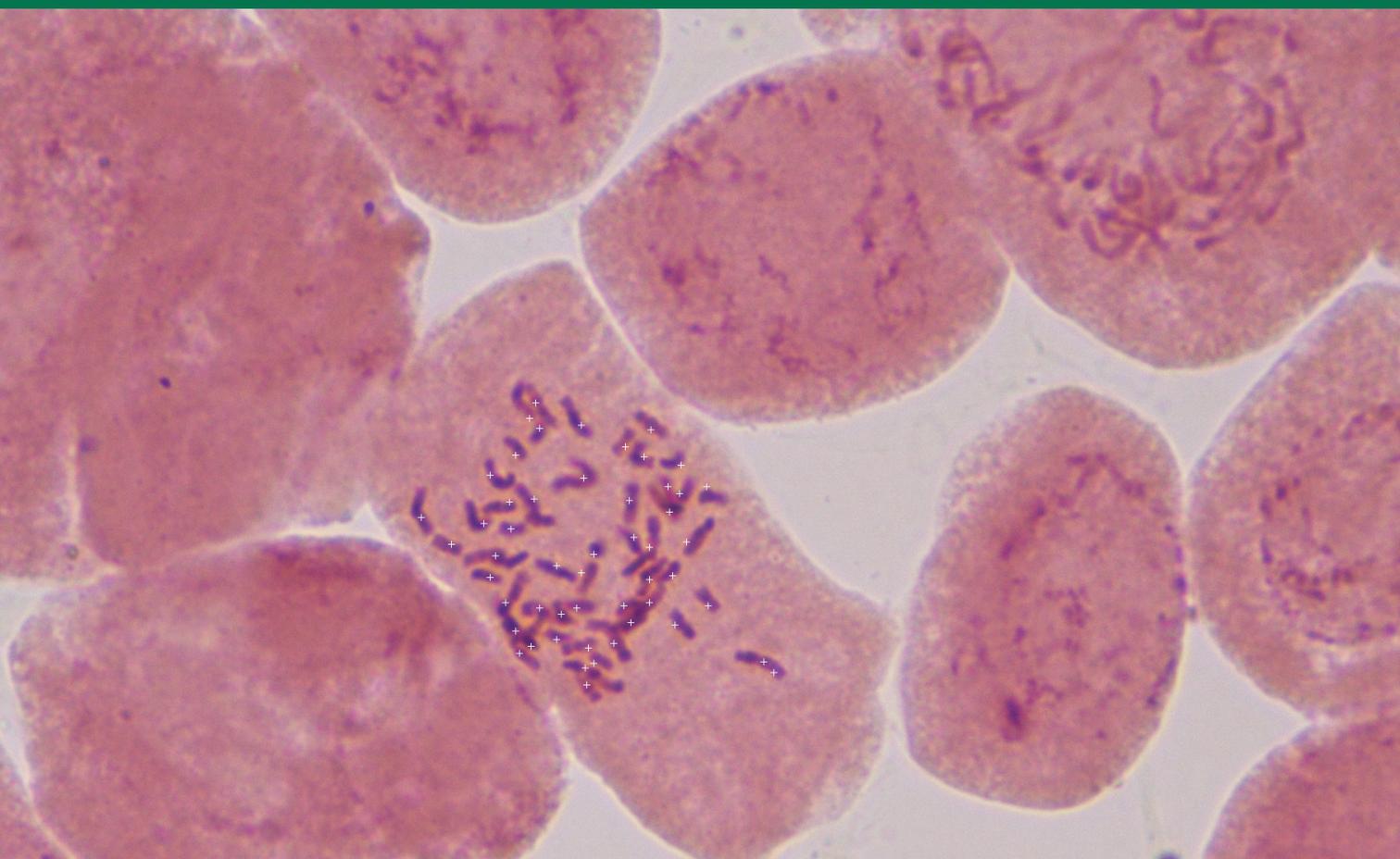


# Manual de conteo cromosómico del yacón

(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson)

## mediante la técnica squash



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO  
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA  
DIRECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA - DRGB

# Manual de conteo cromosómico del yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) mediante la técnica squash

51

Proyecto 092\_PI

“Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación”.

**MANUAL DE CONTEO CROMOSÓMICO DEL YACÓN  
(SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS (POEPP. & ENDL.) H. ROBINSON)  
MEDIANTE LA TÉCNICA SQUASH**

**Ministerio de Agricultura y Riego**

Ministro de Agricultura y Riego

**Ing. Jorge Luis Montenegro Chavesta**

Viceministro de Desarrollo e Infraestructura Agraria y Riego

**Econ. Carlos Alberto Ynga La Plata**

Viceministra de Políticas Agrarias

**Econ. Paula Rosa Carrión Tello**

Jefe del INIA

**Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph. D.**

© Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA

**Proyecto 092\_PI**

“Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la Hidrolasa responsable de su degradación”.

**Elaboración de contenido:**

Blga. Rosa María Cabrera Pintado

Blga. Milca Gianira Elespuru Shuña

**Equipo técnico:**

Blga. Rosa María Cabrera Pintado

Blga. Milca Gianira Elespuru Shuña

Blga. Jérica Danae Aliaga Cóndor

**Editado por:**

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA

Equipo Técnico de Edición y Publicaciones

Av. La Molina 1981, Lima - Perú

(51 1) 240-2100 / 240-2350

www.inia.gob.pe

**Editor general:**

Eliana Alviárez Gutierrez, M.Sc.

**Revisión de contenido:**

Betty Flores Gonzales

Heillen Calderón Castillo

Gabriela Salazar Alvarez

**Diseño y diagramación:**

Abner Fernando Mio Torrejón

Luis Carlos Arévalo Mercado

Jeams López Acaro

**Publicado:**

diciembre, 2019

**Primera Edición:**

diciembre, 2019

**Tiraje:**

2000 ejemplares

**Impreso en:**

**Nombre de la imprenta:** Vayu advertising

& communications S.A.C.

**RUC:** 20604037361

**Teléfono:** 964389548

**Dirección:** De los ingenieros Nro. 110 Dpto. 102

Urb. Valle Hermoso Lima - Lima - Santiago de Surco

**E-mail:** ventas@vayucunicaciones.com

**ISBN:**

978-9972-44-042-7

## Tabla de contenidos

1. Introducción	3
2. Incremento de raíces de vitroplantas	6
3. Preparación de batería de reactivos para tinción de células metafásicas de raíces	7
4. Tinción cromosómica	8
4.1 Prefijación	10
4.2 Fijación	11
4.3 Hidrólisis	12
4.4 Tinción	13
5. Técnica squash	13
6. Conteo cromosómico	15
7. Anexo Protocolo para el conteo cromosómico del yacón mediante squash	16
8. Glosario	17
9. Referencias	18



## 1. Introducción

El yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson), es una planta herbácea conocida en el norte peruano como “yacón”, “llacón” o “lajuash” y en el centro del Perú como “aricoma”. En Bolivia “yakuma”, en Ecuador “jícama”, “jíquima”; en Colombia y Venezuela “jíquima” y “jiquimilla” (López, 2005). La planta crece hasta 1.5 - 3 m de altura, posee tallo cilíndrico angular, surcado, hueco en la madurez y densamente pubescente en la parte superior (Grau y Slanis, 1996; Wells, 1965). Las raíces son fusiformes y ovaladas, de color blanco, crema o púrpura y tiene múltiples flores de color amarillo-naranja. (Seminario, Valderrama y Manrique, 2003; Hermann, 1997).

Las raíces reservantes del yacón son comestibles y tiene gran contenido de agua, que representa entre el 83 % y 90 % del peso fresco de las raíces (Hermann, 1997). Los tubérculos poseen un agradable sabor dulce y dejan una sensación refrescante después de consumirlo, razón por la cual en la región andina es considerada como fruta. El sabor dulce se atribuye principalmente a los fructooligosacáridos (FOS), un tipo de azúcar con atributos beneficiosos para la salud humana (Seminario et al., 2003), que son almacenados en las raíces. Por estas razones, el yacón ha ganado progresivamente mayor aceptación mundial, logrando expandir su cultivo a varios países como Nueva Zelanda, Japón y Brasil (Campos et al., 2012).

En el yacón, la baja capacidad de reproducción sexual es una limitante importante para el mejoramiento genético (Viehmannova et al., 2013); esto se debe principalmente a su origen aloploiploide. León (1964) e Ishiki et al. (1997) han reportado especímenes de  $2n = 32$  hasta  $2n = 87$ , constituyendo esto un problema para su caracterización. Conocer el nivel de ploidía del yacón es un aspecto muy importante para estudios de mejoramiento genético. Singit y Ozias-Akins (1992) refieren que el conteo de cromosomas en células meristemáticas es un método confiable para la determinación del número de cromosomas y nivel de ploidía de una especie. En el conteo cromosómico mediante la técnica squash es necesario usar tejidos meristemáticos como el de la raíz, por estar en constante crecimiento longitudinal y diagonal (mitosis), siendo el más utilizado (Roth citado por Valladolid et al., 2004).

Como uno de los resultados del Proyecto 092\_PI: Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: Caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación, se ha elaborado el presente manual que describe el protocolo para el conteo cromosómico de yacón mediante la técnica de squash.

## 2. Incremento de raíces de vitroplantas

- **Material vegetal:** cuellos de vitroplantas de yacón (Figura 1).
- **Metodología:**

El medio de cultivo a usar es el medio basal de Murashige y Skoog - MS (1962) complementado con sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup>, carbón activado 1 g.L<sup>-1</sup> y 0.4 mg. L<sup>-1</sup> de ácido naftalén acético (NAA) y agar 7 g.L<sup>-1</sup>.

El pH deberá ajustarse a  $5.7 \pm 0.01$ , para luego dispensar 10 mL de medio de cultivo en tubos de 25 x 150 mm. Tapar y esterilizar a 15 psi, 121 °C durante 15 minutos.

Bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí, aislar los explantes (cuello de vitroplanta) y sembrar uno en cada tubo conteniendo el medio de cultivo previamente esterilizado. Tapar, rotular, sellar e incubar a 15 °C con fotoperiodo de 16 horas luz durante 6 semanas.

Pasado el tiempo de incubación, se dispone de cantidad suficiente de raíces para realizar el conteo cromosómico (Figura 2).

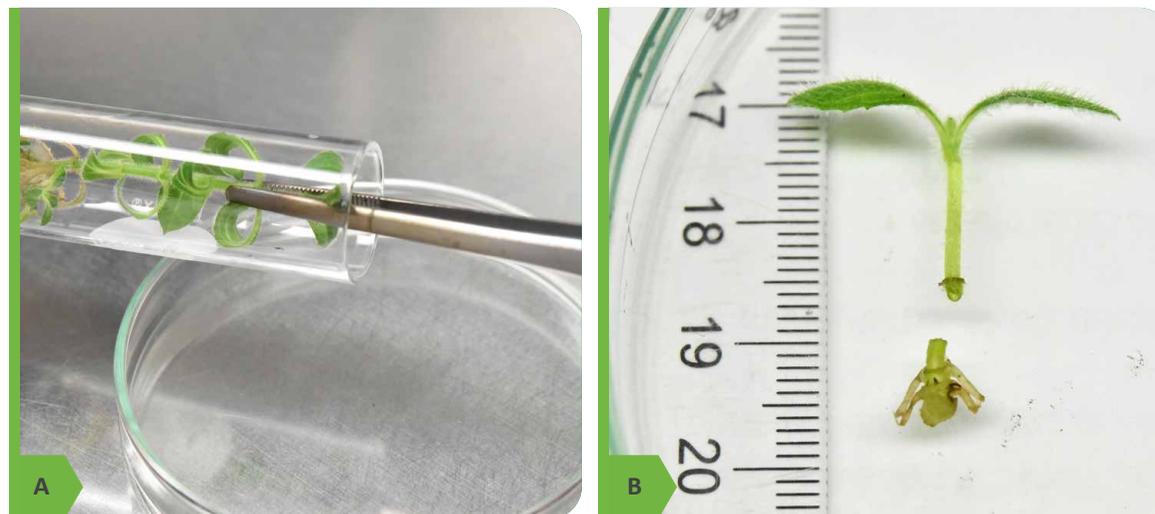


Figura 1. Material vegetal. (A) Vitroplanta de yacón. (B) Explante de yacón-cuello de vitroplanta.



Figura 2. Raíces de yacón adecuadas para el conteo cromosómico.

## 3. Preparación de batería de reactivos para tinción de células metafásicas de raíces

- **8-Hidroxiquinolina 2mM**  
Disolver 5.8 mg de 8- hidroxiquinolina en 0.5 mL de alcohol etílico absoluto, agregar 19.5 mL de agua destilada para completar un volumen final (Vf) de 20 mL.  
Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.
- **Ácido clorhídrico HCl 1N (Vf=250 mL)**  
Añadir 229.18 mL de agua destilada en una probeta, luego agregar 20.82 mL de HCl vertiendo lentamente por las paredes de la probeta.  
Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.
- **Orceína acético-láctica (Vf =100 mL)**  
Disolver 2 g de orceína sintética (SIGMA O7380) en 100 mL de una solución compuesta por 45 mL de ácido láctico y 55 mL de ácido acético glacial p.a. Calentar hasta la primera ebullición y filtrar con papel filtro N° 05.  
Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.
- **Reactivo de Carnoy**  
El reactivo se debe preparar unos minutos antes de usarlo, consta de 12 gotas de alcohol absoluto, 2 gotas de ácido acético y 6 gotas de cloroformo. Se recomienda realizar la mezcla directamente en el tubo que contiene las muestras.

## 4. Tinción cromosómica

Después de 6 semanas de desarrollo de las vitroplantas, se aíslan los ápices radiculares de 1 cm de longitud. Las raíces se colectan usando pinzas de punta fina y se colocan en placas de petri de vidrio de 100 mm de diámetro conteniendo agua destilada para limpiar y retirar los restos de medio de cultivo (Figuras 3 y 4). Depositar las raíces en tubos eppendorf (Figura 5).

Se recomienda ejecutar el proceso entre las 08:00 a. m. y 10:00 a. m., ya que durante este periodo del día existe mayor número de células en división (Quijia-Lamina, 2010) y por lo tanto, se incrementa la probabilidad de encontrar células en metafase.



Figura 3. Procesamiento de material vegetal. (A) Extracción de vitroplanta del medio de cultivo. (B) Plántula lista para seccionar las raíces.

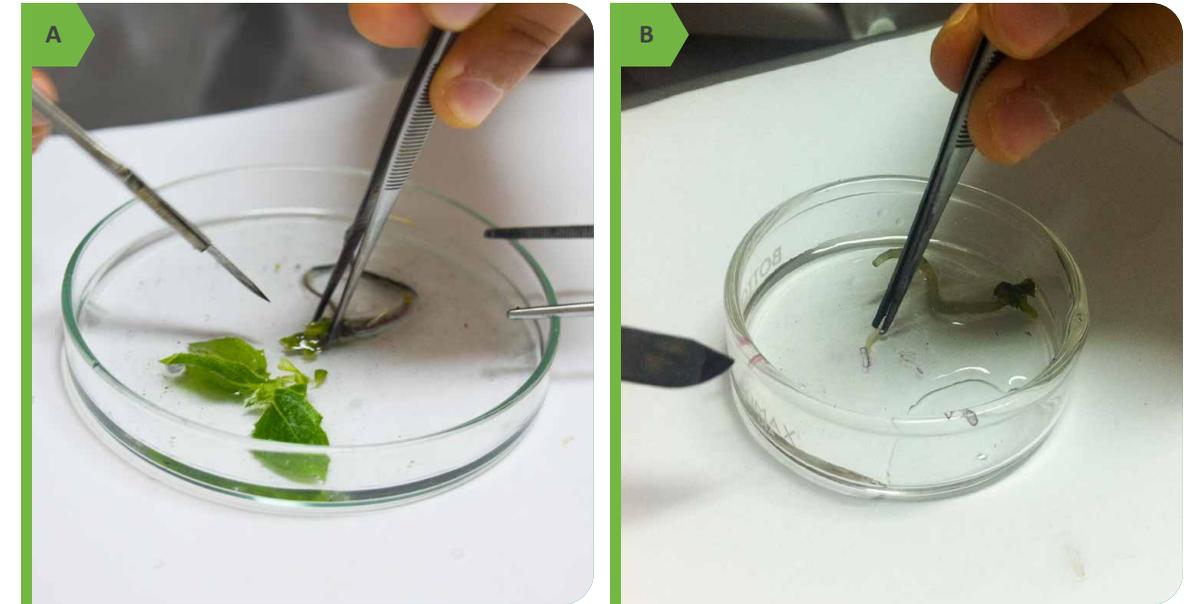


Figura 4. Aislamiento de ápices radiculares. (A) Corte de raíces para procesamiento. (B) Ápices radiculares para fijación.



Figura 5. Ápices radiculares ubicados en tubos eppendorf.

#### 4.1 Prefijación

Adicionar dos gotas de 8-hidroxiquinolina (2 mM) (inhibidor de mitosis) en el tubo eppendorf conteniendo los ápices radiculares (Figura 6A). Dejar reposar a 4 °C y lavar con agua destilada (Figura 6B).



Figura 6. Prefijación. (A) Adición de 8-hidroxiquinolina 2 mM a los ápices radiculares. (B) Lavado con agua destilada.

#### 4.2 Fijación

Adicionar el reactivo de Carnoy en el tubo eppendorf conteniendo las muestras (Figura 7). Dejar reposar a 4 °C durante 3 horas y luego lavar con agua destilada.



Figura 7. Adición del reactivo de Carnoy.

### 4.3 Hidrólisis

En un vaso de precipitado de 20 mL agregar 3 mL de HCl (1N), calentar a 60 °C hasta que se observe vapor en las paredes del vaso. Seguidamente retirar las raíces del tubo eppendorf y colocarlas en el vaso precipitado por 2 minutos (Figura 8). Lavar con agua destilada y colocar nuevamente las raíces en los tubos eppendorf.



Figura 8. Proceso de hidrólisis de las raíces

### 4.4 Tinción

En el tubo eppendorf agregar dos gotas de orceína acético-láctica (Figura 9), asegurando que la raíz quede totalmente inmersa en la solución, e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.



Figura 9. Tinción de raíces con orceína acético-láctica.

## 5. Técnica de squash

En una lámina porta objetos colocar una raíz, con ayuda del bisturí eliminar toda la zona pilífera, dejando únicamente el meristema apical y la cofia (corte de 1 a 2 mm). Luego agregar unas gotas de solución de orceína acético-láctica (Figura 10A). Flamear la lámina por 1 segundo (Figura 10B) y colocar la lámina cubre objetos (Figura 10C).

Enseguida realizar presión uniforme con los dedos, y con ayuda de la punta de un lápiz y del lado del borrador realizar suaves golpes para extender la muestra (Figura 10D). Colocar la lámina entre el papel filtro y luego realizar el squash ejerciendo presión uniforme con el pulgar sobre el cubre objeto, de tal manera que las células queden en un mismo plano y los cromosomas dispersos (Figura 10E).

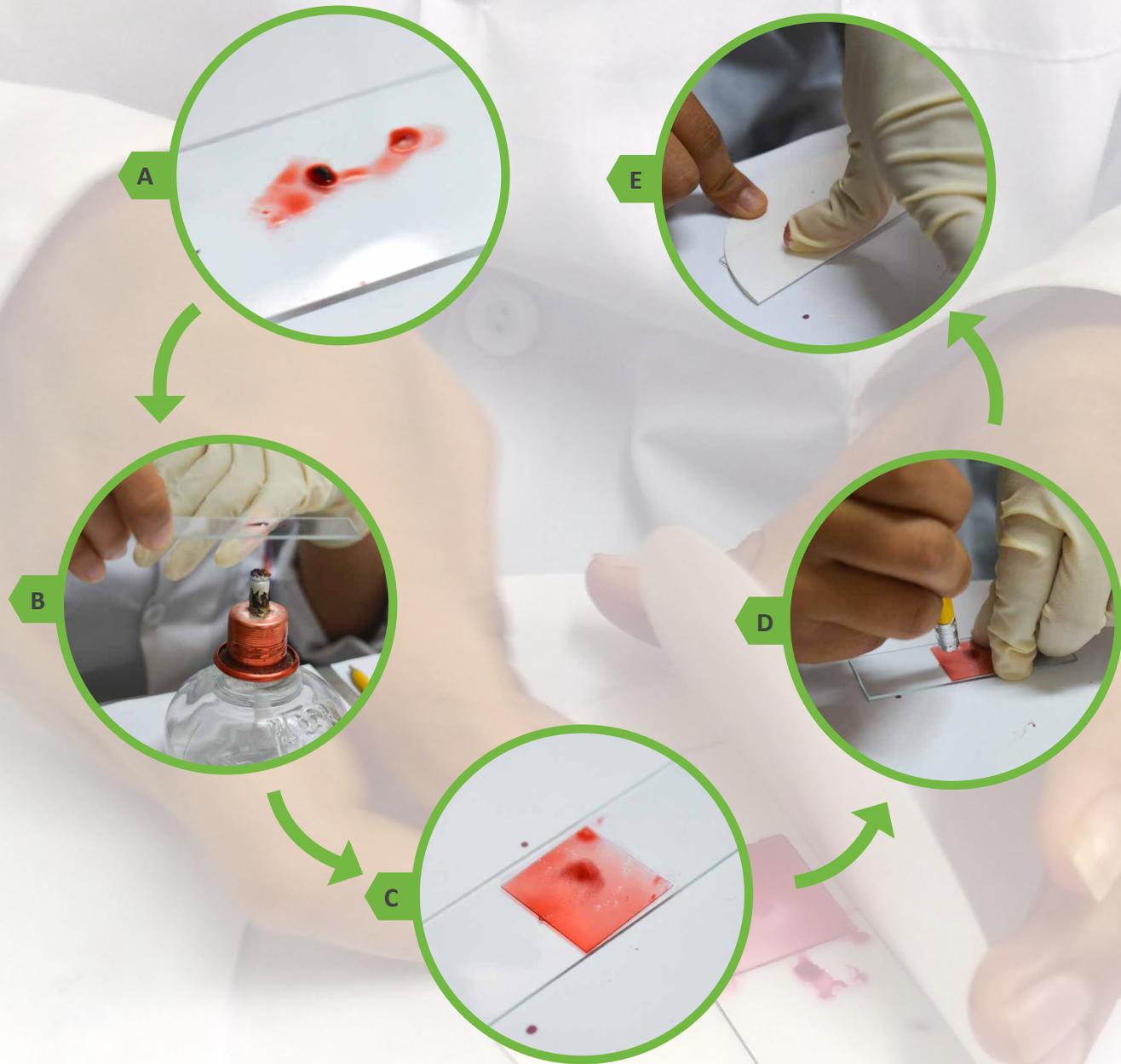


Figura 10. Desarrollo de la técnica de squash. (A) Ápice radicular teñido, (B) flameo de la lámina, (C) lámina con cubreobjetos, (D) presión uniforme con un lápiz y (E) realizado del squash.

## 6. Conteo cromosómico

Con la ayuda del microscopio óptico enfocar las células con el objetivo de menor aumento (4X). Una vez ubicadas las células metafásicas, agregar una gota de aceite de inmersión a la lámina y enfocar con el objetivo de 100X.

Empleando el software NIS-Elements versión 4.40, contabilizar el número de cromosomas (Figura 11). Con el tornillo micrométrico enfocar y capturar en secuencia 4 a 6 fotos desde diferentes ángulos, abarcando toda la imagen. Posteriormente usar el software de apilamiento para cada grupo de fotos, para así obtener mejores imágenes de los cromosomas.

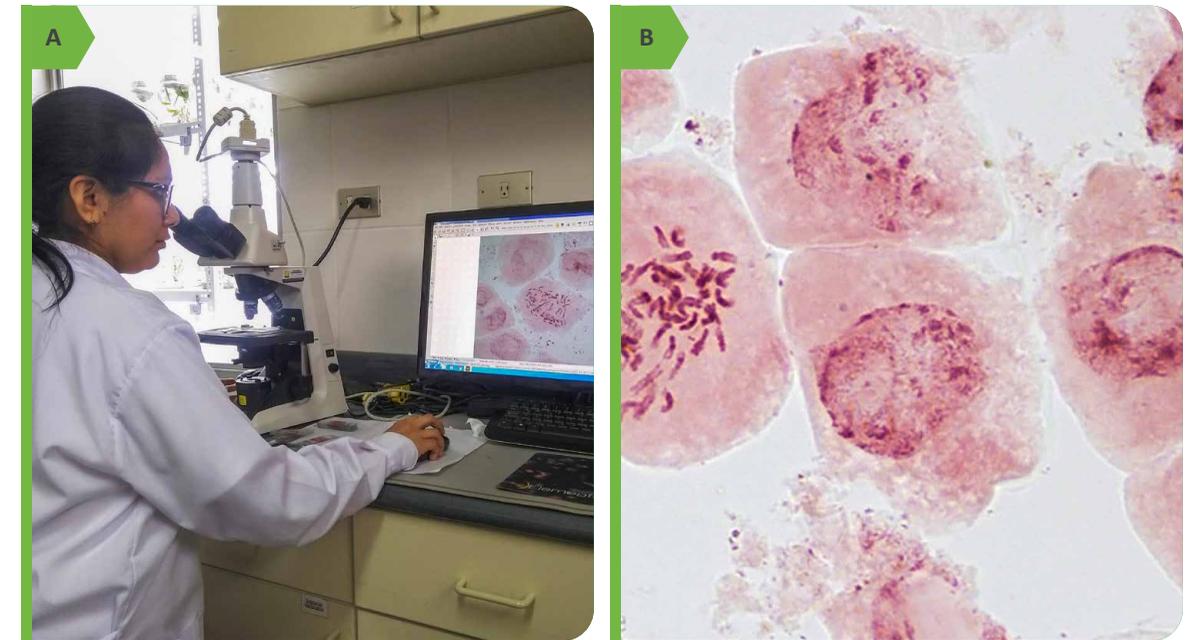


Figura 11. (A) Observación al microscopio compuesto (B) para el conteo de cromosomas con el software NIS-Elements version 4.40.

## 7. Anexo

## 8. Glosario

- **Explante:** cualquier parte de la planta con la cual se inicia el cultivo *in vitro*.
- **Vitroplanta:** plántula obtenida por técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

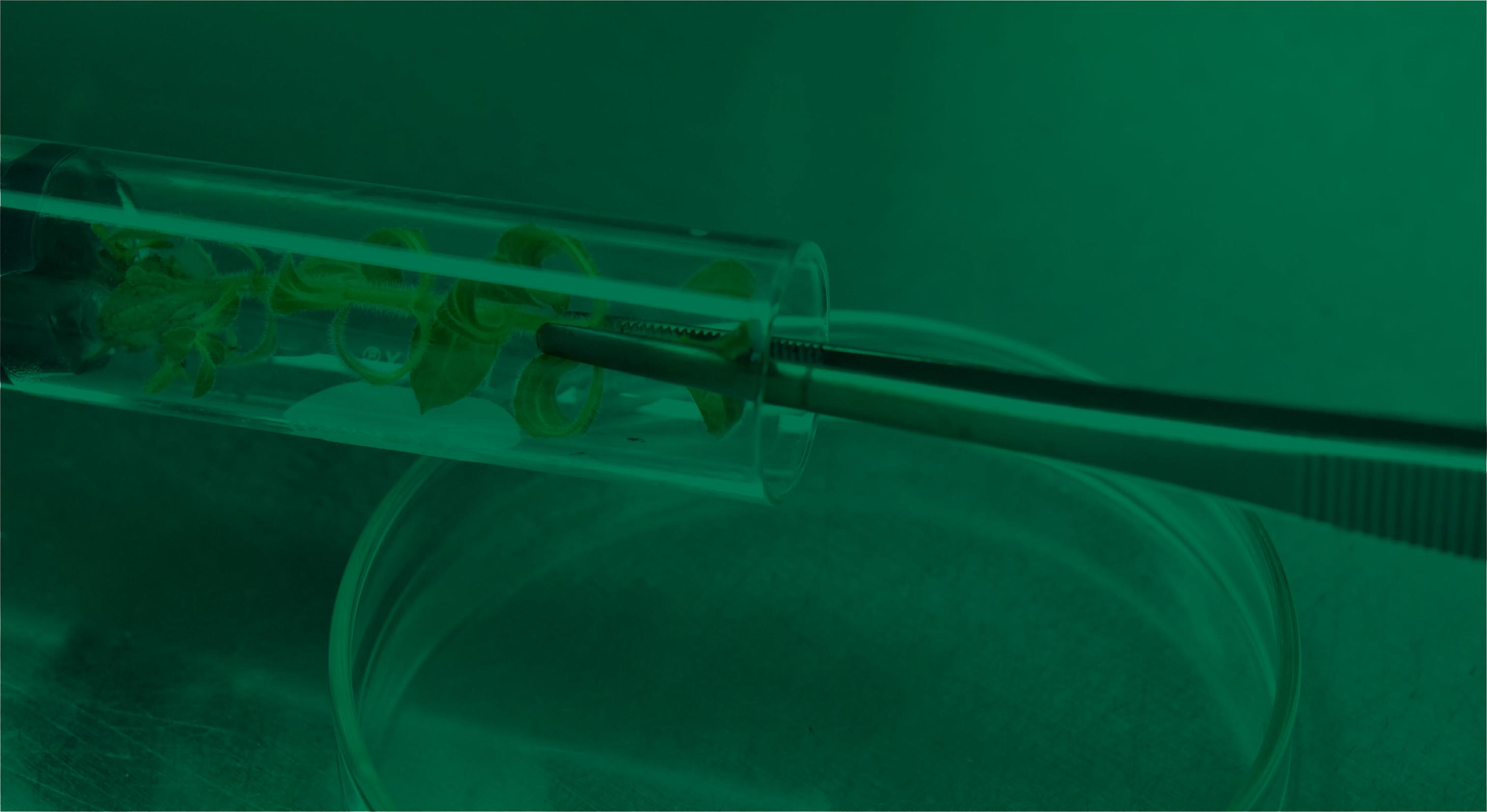


## 9. Referencias

- Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Gálvez, A., Noratto, G. y Pedreschi, R. (2012). Prebiotic effects of yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Journal of Food Chemistry*, 135(3), 1592-1599.
- Grau, A. y Slanis, A. (1996). Is *Polymnia sylphioides* var. *perennis* a wild ancestor of yacón. In Resumos I Congresso Latino Americano de Raíces Tropicais. CERAT-UNESP, São Pedro, Brasil.
- Hermann, M. (1997). Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, maca and yacón (Vol. 21). International Potato Center.
- Ishiki, K., Sagado Moreno, V. y Arellano, J. (1997). Revision of chromosome number and karyotype of Yacón (*Polymnia sonchifolia*). Resúmenes del primer taller internacional sobre recursos fitogenéticos del noroeste argentino (pp.7). Salta, Argentina: INTA.
- León, J. (1964). Plantas alimenticias andinas. Boletín Técnico 6 (pp.112). Lima, Perú: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas Zona Andina.
- Lopez, S.E. (2005). Caracterización morfológica, bioquímica y revisión del nivel de ploidía de *Smallanthus Sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson "Llacón" de tres Provincias ambientalmente diferentes de la región la Libertad (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Quijia-Lamina, P., Segovia-Salcedo, C., Jadán, M. y Proaño, K. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico especies del genero *Polylepis* en Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 31(1,2) ,33-49.
- Seminario, J., Valderrama, M. y Manrique, I. (2003). El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. International Potato Center.
- Singsit, C. y Ozias-Akins, P. (1992). Rapid estimation of ploidy levels in in vitro-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids. *Euphytica*, 64(3), 183-188
- Valladolid, A., Blas, R. y Gonzáles, R. (2004). Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003), 95-99.

Viehmánova, I., Bortlova, Z., Vitamvas, J., Cepkova, P.H., Eliasova, K., Svobodova, E. y Travnickova, M. (2013). Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17,102-106.

Wells, J. R. (1965). A taxonomic study of *Polymnia* (Compositae). *Brittonia*, 17(2), 144-159.





*Instituto Nacional de Innovación Agraria*

Av. La Molina 1981, La Molina  
(51 1) 240-2100 / 240-2350  
[www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe)



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego

ISBN: 978-9972-44-042-7



9 789972 440427