

# Estudio cariológico del olivo

Estructura y comportamiento de los cromosomas en los procesos de maduración de las células madres del grano de polen

por el Profesor D. JUAN HOMEDES RANQUINI

*“At illa venit ad eum ad vesperam  
portans ramum olivae virentibus fo-  
liis in ore suo.”*

Génesis, cap. VIII, vers. 11<sup>o</sup>

DENTRO de la especie *Olea Europeae* L., los botánicos admiten dos razas: Raza I.<sup>a</sup>, *O. Silvestris* Mill, *O. Oleaster* Hoffg y Link, *O. Europeae*  $\alpha$ , *Oleaster* D. C., con su variedad  $\beta$ , *buxifolia* Ait., y la Raza II.<sup>a</sup>, *O. Sativa* Hoffg y Link, *O. Europeae*  $\beta$ , *Sativa* D. C., de la cual se conocen numerosas variedades que se cultivan en nuestro suelo para la obtención del aceite, que tanta importancia tiene en nuestra economía nacional.

En los ficheros bibliográficos revisados, nada hemos encontrado que hiciera referencia a estudios citológicos de este árbol. El olvido por parte de los citogenetistas, se debe indudablemente a la reducida área de su cultivo en el mundo, y quizá también a las dificultades que ofrece el estudio genético.

Por considerar que el presente trabajo puede reportar antecedentes de interés genético, se lo brindamos a los técnicos olivicultores que deseen emprender la mejora del olivo.

En esta primera parte, nos ocupamos únicamente de la estructura y comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, para seguir estudiando en otros las peculiaridades cromosómicas diferenciales de las dos razas, y de un modo especial las existentes entre las variedades que se cultivan en nuestro país.

El material estudiado ha sido recogido y fijado por nuestro amigo y competente técnico de los Servicios Técnicos de Agricultura de la Excm. Diputación Provincial de Barcelona don Francisco J. Riera, al que quedamos muy reconocidos.

#### MATERIAL Y TÉCNICAS

El material, constituido por inflorescencias muy jóvenes, procede de pies de olivo identificables con la Raza I (*bords*) y de olivos pertenecientes a la Raza II correspondientes a las variedades cultivadas en Cataluña: *Arbequina*, *Grossal*, *Morruda*, *Blanqueta* y *Argudell*.

La fijación de las tiernas florecillas se ha conseguido mediante el fijador de Lenoir, en el que han permanecido por espacio de cuarenta y ocho horas. La inclusión se ha hecho en parafina de 41-42° de fusión, primero, y de 52° después, obteniéndose bloques de los que se han hecho cortes de un espesor de 14 micras teniendo en cuenta las magnitudes de las células madres del grano de polen. Para la obtención de cortes perfectos, en verano nos ha dado muy buen resultado someterlos a un principio de congelación en la forma que aconseja Von Veh.

Para la coloración de las preparaciones, hemos empleado además del método de la hematoxilina férrica de Heidenhain, sola o combinada con la fuchsina ácida, la técnica de Newton modificada por Nawaschin (violeta de genciana según Gram) y el método de la safranina de Winiwerter y Sainmont.

#### DATOS INVESTIGADOS

##### DIVISIONES DE MADURACIÓN

*Profase de la división heterotípica.*—Dada la gran trascendencia genética de la profase de conjugación, sinapsis, hemos investigado con algún detenimiento todos aquellos estados que pueden aportar esclarecimientos sobre la estructura y comportamiento de los cromosomas.

Al iniciarse la profase heterotípica, las células madres del grano de polen se distinguen por su forma poligonal acusada, efecto de hallarse muy apretadamente colocadas en el interior de las anteras. Del núcleo, con la cromatina en estado difuso repartido en grumos de muy distinto volumen interpuestos en un magma acromático, de la *interfase presindética*, surge en la profase heterotípica un espiroma de filamentos excesivamente finos y ondulados que ocupan toda la cavidad nuclear. Observados con cuidado, se ve que son

dobles y las numerosas cromómeras, algunas muy voluminosas, están acopladas y refundidas. Posteriormente los filamentos pierden la hendidura, aumentan de grosor y tienen mayor afinidad tintórea. Para nosotros, este estado correspondería a estados típicos de *leptotene* porque en él toma origen el estado *zigotene* que se caracteriza por la conjugación paralela de dichos filamentos, *parasíndesis*, que muy ondulados empiezan estableciendo contactos accidentales para conjugarse después, primero las cromómeras homólogas más voluminosas y sucesivamente las medianas y pequeñas (Plancha n.º 1). En este momento, las células madres del grano de polen se disponen más holgadamente en el interior de las anteras y por ello su forma poligonal es menos acusada.

Los filamentos apareados en la sinapsis, a veces *entrecruzados* empiezan en seguida a contraerse y condensarse en los sitios en que

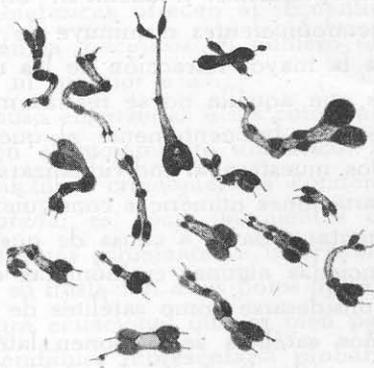


Fig. 1

*Eslabones típicos de la doble cadena cromática, producto de la conjugación y retracción de los filamentos leptoténicos, en el estado final del paquitene. Su forma y dimensiones dependen de la manera de ordenarse y agruparse las distintas cromómeras sobre los filamentos de linnina*

se agrupan las cromómeras, estableciéndose progresivamente el estado *paquitene*. En fases avanzadas de este estado, hemos intentado perseguir los filamentos en todas sus flexuosidades para cerciorarnos de su continuidad o discontinuidad. En esta operación, nos ha ayudado y orientado la disposición, forma y tamaño de las cromómeras, especialmente de un gran par y otro mediano, que, por estar separadas por un extremo y unidas y ligadas por el otro al filamento respectivo, las identificamos en seguida como origen y fin de una cadena cromática. Un estudio minucioso, revisando numerosas células, ha permitido es-

tablecer el hecho de que existe solamente una cadena cromática abierta cuyos eslabones representan asociaciones cromomerales más o menos condensadas. Como las cromómeras apareadas en distintos tramos del filamento son volumétricamente muy diferentes, así como diferente es el modo de ordenarse al formar la agrupación, se desprende de ello, que a medida que la retracción y condensación va en aumento, las estructuras resultantes adquieren formas muy semejantes a cromosomas *bivalentes*.

Cuando la cadena cromática alcanza grados extremos de condensación, estado de *diacinesis*, las agrupaciones cromomerales adquieren entonces formas típicas de bivalentes, pero realizando un concienzudo examen, siempre es posible establecer la existencia de ligamentos que unen los eslabones bivalentes de la cadena. Algunos de estos ligamentos a distancia más o menos grande de la agrupación contienen cromómeras pequeñas. (Plancha n.º 2.)

El número de *seudobivalentes* disminuye de unas células a otras proporcionalmente a la mayor retracción de las agrupaciones cromomerales, a causa de que aquélla no se realiza muchas veces uniformemente. Ello determina frecuentemente el que algunos *bivalentes* parcialmente retraídos muestren al individualizarse más de una condensación con las variaciones numéricas consiguientes. Los errores de cálculo pueden aumentar todavía a causa de que muchas agrupaciones presentan distanciadas algunas cromómeras que por su aspecto y situación deben considerarse como satélites de aquéllas.

Algunos pequeños satélites se disponen lateralmente sobre las grandes cromómeras quedando desligados de la cadena. Por último además del entrecruzamiento, existen estructuras bivalentes asimétricas por faltarles alguna o algunas cromómeras en alguno de los componentes (Fig. 1).

Las particularidades estructurales descritas, a nuestro entender, tienen gran significación genética y por ello serán más adelante objeto de especial estudio para establecer diferencias en los cariogramas de las distintas variedades de olivos.

Se alcanza fácilmente, que no siendo muchas veces posible poder fijar exactamente los límites de cada estructura bivalente, los recuentos de ellos en las células madres, del estado de *diacinesis*, no sean exactos; sólo a título provisional damos su número que está comprendido entre 18 y 25 bivalentes. El número de 18 a 19 es bastante constante cuando la condensación de los *gemi* encadenados alcanza cierta uniformidad.

En el instante que desaparece la membrana nuclear, persistiendo aun el nucléolo, los *bivalentes* de la cadena más o menos flexuosa y arrollada experimentan retracción y condensación aun mayores que las agrupan íntimamente, que debe interpretarse como el estado zynético preparatorio de la metafase. (Plancha n.º 3.)

#### DIVISIÓN HETEROTÍPICA

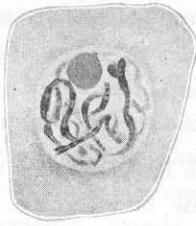
A la aproximación y condensación progresiva de los eslabones cromáticos, una vez formado el huso acromático sigue la inserción por sus fibras de los componentes de cada bivalente que son orientados hacia el plano medio de la célula para constituir la placa metafásica de la división heterotípica. En ella la cadena, más o menos arrollada en zig-zag, se adapta en sus flexuosidades ocupando un área circular. (Plancha n.º 4.)

Estas placas metafásicas ofrecen al recuento las mismas dificultades ya descritas en la *diacinesis*: el número relativo de *bivalentes* no es inferior a 18 ni superior a 25.

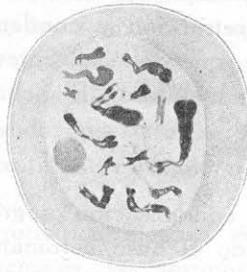
Las fibras del huso engarzadas a los componentes de los bivalentes encadenados, en el movimiento anafásico, separan a los polos respectivos las estructuras cromomerales condensadas, que se conjugaron en el *zigotene*; es decir univalentes encadenados que al separarse adoptan formas semejantes a la original por cuanto dichos univalentes durante su traslación a los polos muestran ya más o menos evidente la hendidura ecuacional que es bien patente a la llegada a los polos. Dicha hendidura representaría probablemente la línea de fusión de los filamentos dobles, *excesivamente finos*, vistos al iniciarse el estado leptotene de la profase heterotípica. (Planchas n.º 5 y 6.)

#### DIVISIÓN HOMOTÍPICA

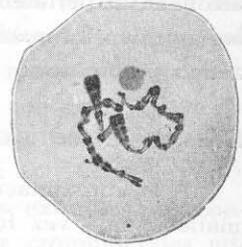
A partir de la telofase, en que una cadena cromática casi escindida pasa a cada uno de los polos hijos, se inicia una interfase típica de larga duración a juzgar por la frecuencia en que se presenta dicho estado. Durante las metamorfosis interfásicas, la cadena cromática se alarga y ondula y momentáneamente pierde colorabilidad para recuperarla después al comenzar la profase de la división homotípica. En ésta, los filamentos con las agrupaciones cromomerales algo disociadas, vuelven a retraerse y condensarse lenta y progresivamente, estructurándose de esta forma *diadas* encadenadas que van adquiriendo aspectos, formas y disposición en la cadena, en un todo seme-



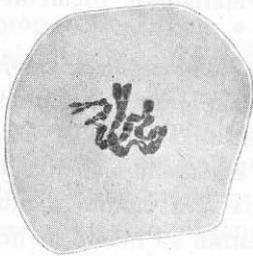
1



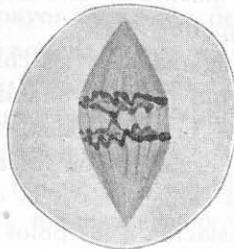
2



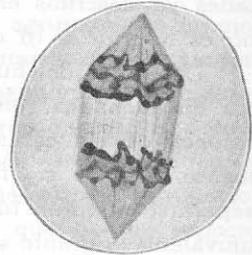
3



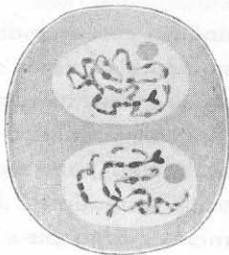
4



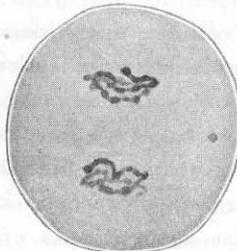
5



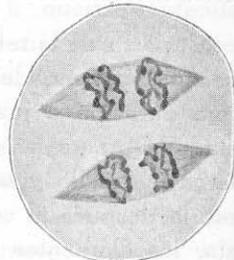
6



7



8



9

## Representación semiesquemática de las células madres del grano de polen de *Olea Europaea* L. durante los procesos de maduración

- 1) Estado zigotene en que los filamentos cromáticos muy ondulados conjugan sus cromómeras de distinta forma y volumen. En la figura, han sido dibujadas las cromómeras de los extremos del filamento que en dicho estado profásico presentan ya la forma típica que perdura en las fases subsiguientes.
- 2) Final del estado paquitene y comienzo de la diacinesis en que se esbozan y delimitan estructuras bivalentes, equivalentes a verdaderos gemini. A pesar de la tenuidad de los filamentos de linnina, la ligazón de unas estructuras con las otras determina la formación de una doble cadena abierta, producto de la conjugación de los filamentos leptotene.
- 3) Fase terminal de la diacinesis; momento en que desaparecida la membrana nuclear se inicia la contracción zynizética. Las condensaciones cromáticas se van retrayendo y condensando progresivamente centrándose en el plano medio de la célula.
- 4) Estado más avanzado de zynizesis mostrando los bivalentes de la cadena muy condensados y flexuosos, adoptando la posición metafásica para situarse en un área circular del ecuador. En este momento, las agrupaciones cromomerales, primeramente conjugadas y posteriormente condensadas en bivalentes, sus componentes son engarzados por las fibras del huso acromático.
- 5) Anafase heterotípica incipiente en que los componentes univalentes de la cadena marchan a los polos, encadenados. Es de advertir que algunas estructuras univalentes, especialmente los extremos de la cadena, muestran preestablecida la hendidura ecuacional.
- 6) Estado culminante de la anafase heterotípica en que las cadenas hijas muestran muy evidente la hendidura ecuacional.
- 7) Núcleos hijos en la intercinesis en que iniciada la profase de la división homotípica, las diadas presentan aspectos estructurales muy parecidos a los observados en la diacinesis, por la forma y posición de las estructuras en la cadena.
- 8) Estado más avanzado en el que desaparecida la membrana de los núcleos se inicia una rápida y enérgica zynizesis que origina la metafase de la división homotípica.
- 9) Anafase de la división homotípica con la separación ecuacional de los filamentos hijos con sus cromáticas encadenadas.

jantes a las estructuras bivalentes estudiadas en la diacinesis. (Plancha número 7.) Este estado se presta, especialmente, para hacer recuentos de dichas estructuras las cuales dan el número con constante de 22, aceptando la existencia de satélites. A medida que avanza este proceso, el núcleo muy ovalado ha aumentado considerablemente de volumen hasta un momento en que desaparecida la membrana nuclear se inicia una *zynísis* muy pronunciada que contrae y agrupa íntimamente las estructuras de la cadena que se sitúan en el plano metafásico. (Plancha número 8.) Los dos núcleos de cada célula madre evolucionan al mismo tiempo y ambas metafases así formadas pueden hallarse indistintamente en el mismo o distinto plano y ser los husos paralelos u oblicuos.

La anafase homotípica se inicia simultáneamente en ambas placas, separándose las partes del filamento dividido ecuacionalmente, de forma que las cromátidas encadenadas de cada uno de ellos, se mantienen conservando su ligazón, y llegadas a los polos puede advertirse un filamento cromático con el número y disposición de los eslabones repetidamente observados en otros estados del proceso cariocinético. (Plancha n.º 9.) Constituidos los núcleos hijos se forman las *tétradas* por segmentarse la célula madre del grano de polen en dos planos perpendiculares. Las cuatro células hijas resultantes, evolucionan posteriormente a granos de polen.

#### CONSIDERACIONES FINALES

La impresión que se obtiene del estudio realizado, es que el olivo solamente posee en sus células, en las razas investigadas, dos cromosomas extraordinariamente grandes y largos, en el núcleo *diploide* ( $2n=2$ ) y un cromosoma en el *haploide* ( $n=1$ ). Por el hecho especial de ordenarse las cromómeras, algunas muy voluminosas, y el modo de disponerse formando agrupamientos, muy distanciados unos de otros, sobre un largo filamento de linnina, pueden suscitarse dudas a la unidad cromosómica del largo filamento e identificarlo como un caso de *cadena* muy frecuente en especies vegetales como *Oenothera*, *Rhoeo*, originada por translocaciones recíprocas. En nuestro caso, no parece lógico esta suposición por los motivos siguientes: 1.º En la profase heterotípica existe bien patente la *parasindesis*, conjugación paralela de dos filamentos cromosómicos, el acoplamiento de los cuales ha podido perseguirse por la forma especial de las grandes cromómeras, especialmente las de los extremos de los filamentos. En ningún caso ha sido posible evidenciar la telosindesis. 2.º Que las relaciones

de continuidad en las estructuras bivalentes encadenadas se conservan a través de la anafase heterotípica, intercinesis, anafase homotípica y en los núcleos hijos de esta división. 3.º La forma y disposición en la cadena de las condensaciones cromomerales (bivalentes) es constante, salvo pequeñas anomalías de cromómeras perdidas satélites laterales y entrecruzamientos (crossing-over); durante los procesos cariocinéticos no se observan aberraciones de mayor trascendencia.

Por otra parte, el hecho de que todos los caracteres que integran la herencia del olivo se hallen ligados a un único cromosoma, explicaría satisfactoriamente la constancia específica de este árbol milenario cuya aparición, probablemente, hay que situarla en el período geológico terciario, puesto que el Género *Olea* prosperaba ya en los alrededores del lago de Ginebra, encontrándose en depósitos terciarios de Kutschlin y en el oligocénico inferior de Aix. Esta circunstancia impide prácticamente la disyunción de los caracteres, oponiéndose al mendelismo, puesto que el lote factorial paterno y el lote factorial materno han de pasar *intactos* de generación en generación. Las únicas variaciones posibles, que habrán intervenido en la formación de las razas y sus variedades, deben ser del orden de las mutaciones génicas y mutaciones cromosómicas, intercambio, delación (pérdida de parte o partes de algún agrupamiento cromomeral), presencia o desaparición de satélites por anfiplastia. Desde este punto de vista tendrá importancia el estudio especial de cada uno de los cariogramas de las variedades de olivo cultivadas.

#### CONCLUSIONES

1.ª Que las razas investigadas de olivo, en los procesos de maduración de las células madres del grano de polen, presentan dos grandes y largos cromosomas, con una disposición cromomeral especial (agrupaciones de cromómeras separadas unas de las otras) que en la sinapsis después de la conjugación parasindética, paquitene, diacinesis y metafase heterotípica, por la forma de ordenarse las cromómeras sobre los filamentos, las condensaciones resultantes adquieren perfecta equivalencia con *gemi* encadenados.

2.ª Que el número de estos *gemi* encadenados producto de una *parasindesis* evidente, no es nunca inferior a 18 ni superior a 25, dependiendo éste de su mayor o menor condensación y agrupación terminal de satélites, que por otro lado se comportan como típicos bivalentes ligados. En el movimiento anafásico, los *univalentes*, que

ya presentan la escotadura ecuacional, siguen formando cadena y de esta forma pasan a los núcleos hijos de la división heterotípica.

3.<sup>a</sup> La división homotípica separa los componentes de las diadas también encadenados cuyas cromátidas, de la misma forma llegan a los polos para formar los núcleos de las tetradas.

4.<sup>a</sup> De las conclusiones anteriores se infiere que el núcleo diploide del olivo debe ser  $2n=2$  y el haploide,  $n=1$ , y que a pesar de la especialísima estructura de los cromosomas, su comportamiento permite descartar el caso de *cadena* y predecir las relaciones entre la citología y la genética en cuanto a la fijeza de la especie cuyas variaciones raciales dependerían únicamente de mutaciones génicas y cromosómicas, estas últimas referidas a pérdida de cromómeras, presencia o ausencia de satélites y entrecruzamiento o crossing-over.

#### BIBLIOGRAFIA

- Bélâr (K.).—Die cytologische Grundlâger der Vererbung. In Handbuch der Vererbungswissenschaft. Vol. I, Berlín, 1928.
- Cuénot (L.).—L'Espèce. París, 1936.
- Darlington (C. D.).—The cytological theory of inheritance in *Oenothera*. Journ. of Genetics, XXIV, 405-474, 1931.
- Gates (R.).—The cytological bases of mutation. Amer Natur. LXV, 97-120, 1931.
- Homedes (J.).—Estudi citològic sobre la formació del pollen en un híbrid *Aegilops* (triuncialis?) ♀ *Triticum vulgare* var. *graecum*. Körn ♂, sota condicions de medi anormals. Arxius de l'Escola Superior d'Agricultura, vol. II, F. IV, 1936.
- Lancastre Araujo Bobone (Alvaro).—Contribuição para o estudo taxonomico da espécie «*Ficus carica*, L.».. Anais do Instituto Superior de Agronomia, 1932, Lisboa.
- Lenoir (M.).—Evolution des chromatines. Archives de Morphologie générale et expérimentale. París, 1926.
- Nawaschin (M.).—Über die Veraüderung von Zahl und Form der Chromosomen in folge der Hybridisation. Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat. V, 195, 1928.
- Nonídez (J. F.).—La herencia mendeliana. 2.<sup>a</sup> edición, Madrid, 1935.
- Romeis (B.).—Guía-Formulario de Técnica histológica. 11.<sup>a</sup> edición, Labor, Barcelona, 1928.
- Rouy (G.).—Flore de France. T. X, 1908, París.
- Schwemmler (J.).—Die Beziehung zwischen zytologie und Genetik in der *Oenotheren*-forschung. Zeit. f. ind., abst. u. Vererbgs. LXI, 36-61, 1932.
- Von Veh (R.).—Schnittbänder ans gefrorenen Poraffinblöcken Ber. d. deutsch. bot. Ges. L., 42-44, 1932.
- Schimper (W. Ph.).—Paleontología de Zittel, vol. V, 1882.