

## PRÁCTICA 2.- CICLO CELULAR EN CÉLULAS VEGETALES

### Recordatorio teórico

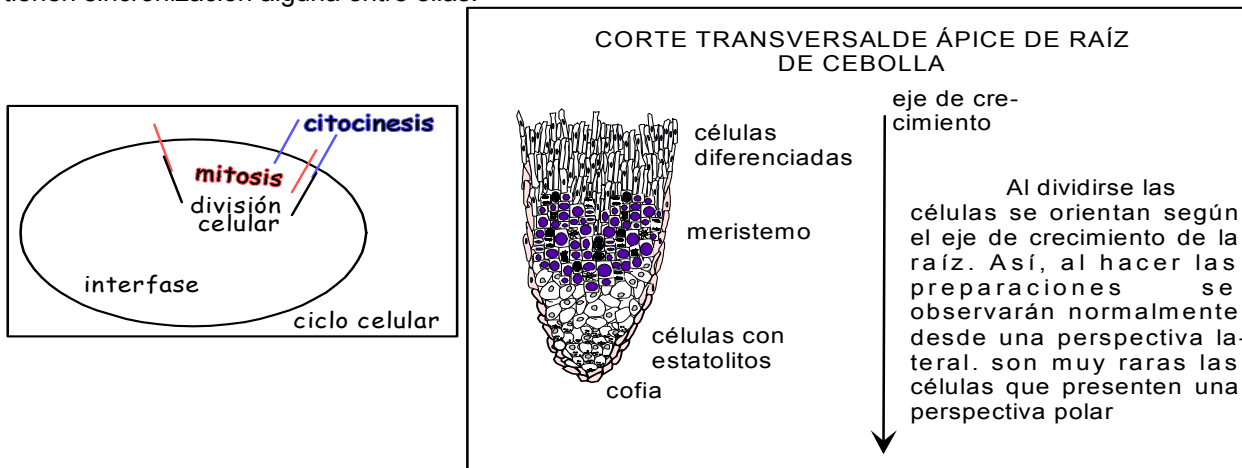
El estudio citológico del ciclo celular se basó tradicionalmente en el análisis de la mitosis, ya que éste es el momento en que se producen alteraciones morfológicas de las células fácilmente apreciables.

Mitosis es sinónimo de cariocinesis o división del núcleo y su punto de comienzo se identifica al microscopio óptico por las transformaciones que sufre el núcleo en el que empiezan a hacerse patentes los cromosomas. El final de la mitosis se produce al terminar la desespiralización de los cromosomas que dejan así de ser visibles.

Solapada con el final de la mitosis se produce la división del citoplasma o citocinesis. El conjunto de la mitosis más la citocinesis es la división celular. Al finalizar ésta comienza la interfase.

**Meristemo radicular.** Material biológico: cebolla (*Allium cepa*).

Cerca del extremo apical de las raíces se encuentra un conjunto de células que proliferando hacen que crezca la raíz. Es la zona meristemática cuyas células sufren ciclos celulares continuos y en condiciones normales no tienen sincronización alguna entre ellas.

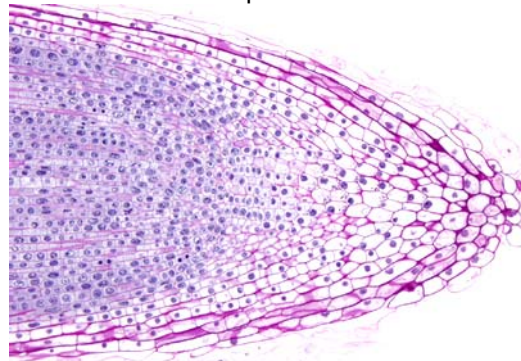
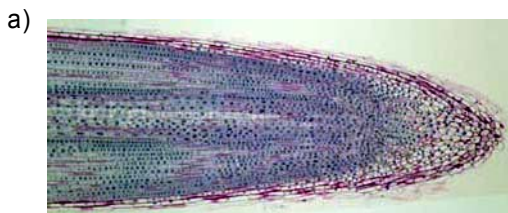


Si se pudiera hacer una película del desarrollo de un meristemo radicular se podría observar cómo cada célula después de la interfase entraría en división y daría lugar a dos células hijas. Se podría calcular directamente la duración de cada etapa lo que proporcionaría una idea de la complejidad de cada proceso y su intensidad metabólica. Sin embargo al hacer una preparación lo que se obtiene es una instantánea, una foto fija del meristemo a través de la cual también pueden determinarse parámetros de interés ya que al no existir sincronización cada célula sigue ciclos celulares independientemente del resto y, mientras más largo sea un proceso o una etapa del ciclo celular, más células se encontrarán en ella mientras que si la etapa es corta las células pasarán poco tiempo en ella y será más difícil que en la "foto fija" se encuentren muchas células de esa fase. Si en una preparación se localiza una zona meristemática y se contabilizan células en división y células en interfase, se puede tener una estima indirecta del tiempo de duración de una respecto a la otra o a todo el ciclo celular.

La citocinesis (que es parte de la división celular) se desarrolla en su mayor parte de manera coincidente con el final de la mitosis, de tal forma que la división termina sólo un poco después del final de la cariocinesis. Teniendo en cuenta esto y la dificultad que entraña la determinación del final de la citocinesis, para el desarrollo de la práctica se puede asumir como mínimo el error de contabilizar las células que no están en mitosis como células en interfase.

Para poder realizar el conteo y teniendo en cuenta que el límite entre interfase y principio de mitosis es también difícil de determinar, deben precisarse características celulares observables al microscopio óptico que permitan la identificación sin duda alguna de la etapa en que se encuentre la célula que se analiza.

FOTOGRAFÍAS DE CORTE LONGITUDINAL DE RAÍZ DE *Allium cepa*. a) 40 aumentos. b) 100 aumentos



**CÉLULA EN INTERFASE:**

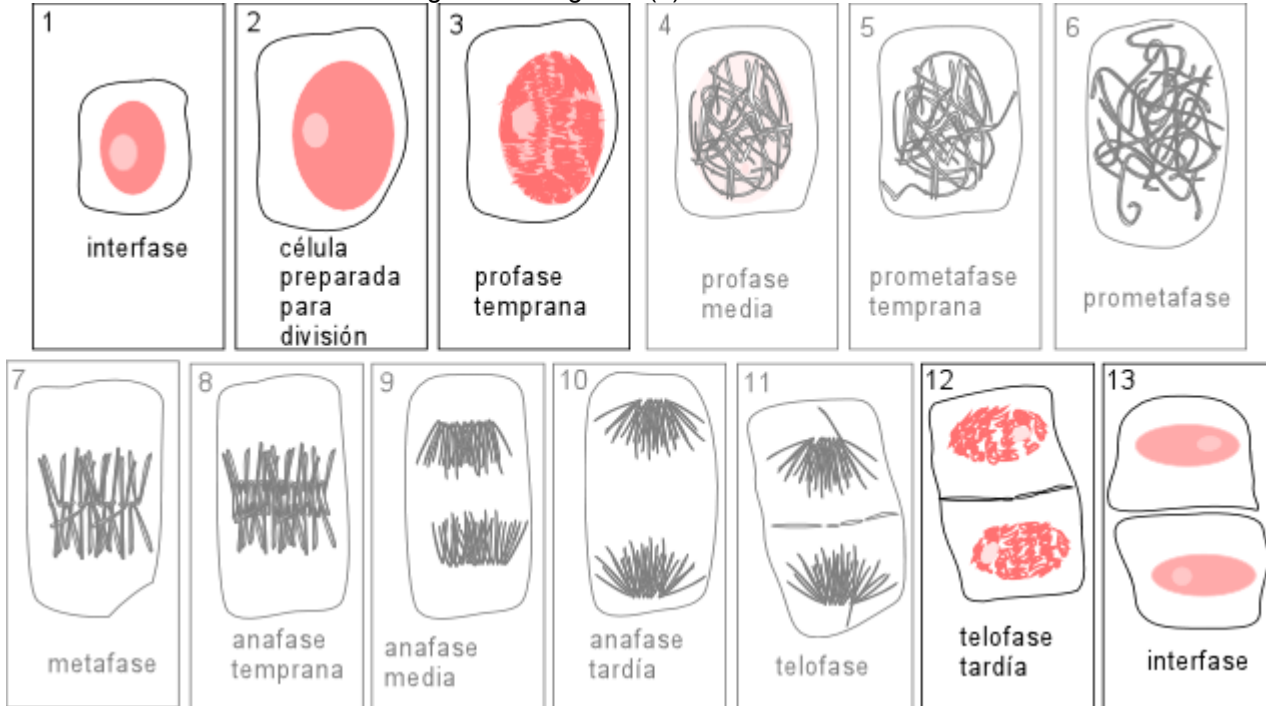
Presenta un núcleo redondeado con un granulado muy fino y continuo (algunas zonas más intensamente teñidas y otras menos pero sin discontinuidades). La envoltura nuclear aunque no se ve, forma un círculo que limita el núcleo. En número de 1 o 2 se aprecian zonas más claras, transparentes, que son los nucleolos (1).

Cuando las células van a entrar en mitosis aparecen más voluminosas y el núcleo mucho más grande (2).

**CÉLULA EN MITOSIS:**

Están en mitosis todas las células en las que se observan cromosomas. El principal problema consiste en identificar en comienzo de la mitosis, que coincide con el de la división celular, y el final de la mitosis que se solapa con la citocinesis.

Comienza la mitosis con el inicio de la espiralización de los cromosomas. En la práctica se consideran en mitosis las células en las que se puede apreciar una tenue concentración de la cromatina dejando espacios más claros a modo de canales entre los grumos alargados (3).



Los últimos momentos de la mitosis están definidos por la desespiralización de los cromosomas en telofase (12). Mientras se observen, aunque sea como tenues cúmulos de cromatina con canales entre ellos, se considera que persiste la mitosis

Para diferenciar células en profase temprana de células en telofase tardía debe tenerse en cuenta que en esta última suele haber dos células del mismo tamaño, sincrónicas y juntas. Si por causa de la técnica se separasen las células hijas se tendrían en cuenta otros criterios como que los núcleos en profase son mayores que los de las células en interfase y los de telofase no; los estrechos canales entre los cromosomas en telofase son muy paralelos mientras que en profase son más irregulares.

**ÍNDICE DE MITOSIS:**

Una vez establecidos los límites, se pueden clasificar las células meristemáticas que se cuentan; por ejemplo, si se contabilizan 100 células del meristemo, habrá X en mitosis y 100-X será el resto que se toman como interfases.

Las 100 células tomadas de forma aleatoria son representativas de todo el meristemo y, por tanto, de todo el ciclo celular. De esta manera las X que están en mitosis son una muestra proporcional de todas las que están en mitosis y 100-X de las que están en interfase.

Se define el índice mitótico (Im) como la relación entre el número de células que están en mitosis dividido por el número total de células contabilizadas. En el ejemplo: **Im = X/100**

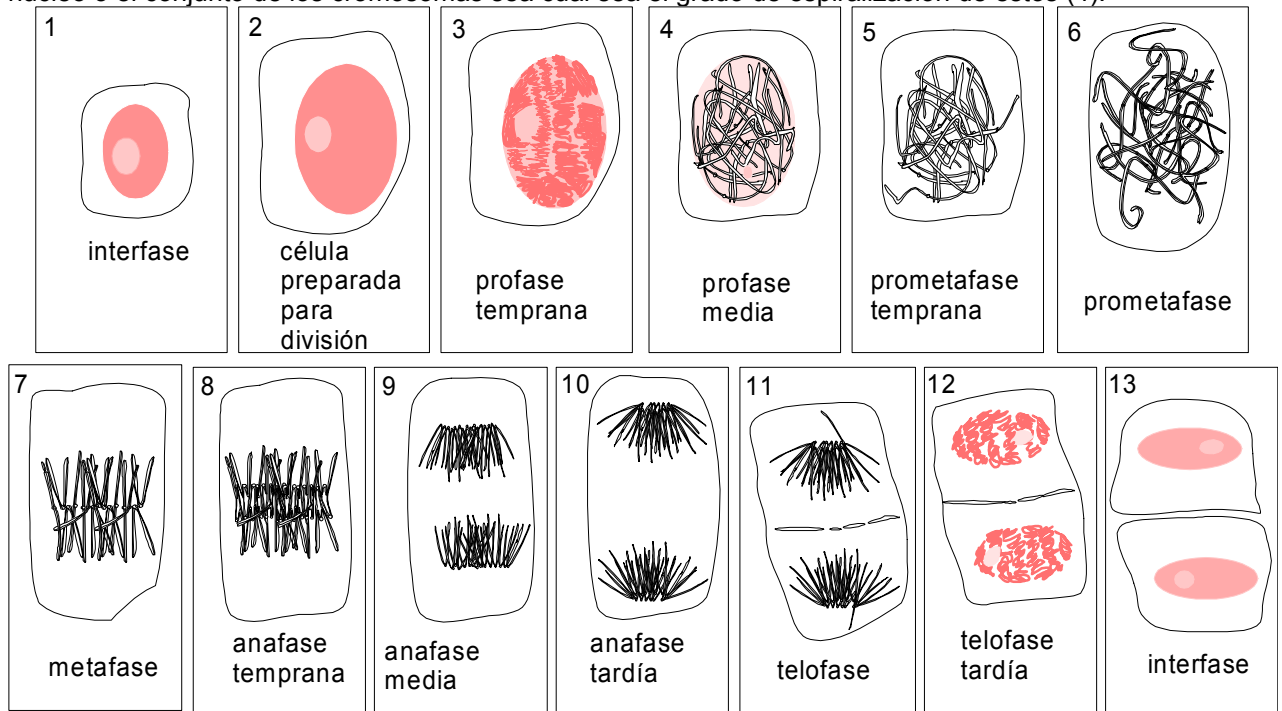
Im resulta ser una estima del tiempo del ciclo celular que está dedicado a la mitosis. Es una medida relativa y por tanto carece de unidades.

## ANÁLISIS DE LA MITOSIS:

Del mismo modo que se hace el estudio de la mitosis dentro del ciclo celular se pueden analizar las fases de la mitosis en la división del núcleo. Sin olvidar en ningún momento que la cariocinesis es un proceso continuo, para su estudio se divide en varias etapas que tienen que ver con cambios conformacionales, es decir que pueden diferenciarse por la observación en el microscopio óptico de células en división. Desde el comienzo de la espiralización hasta la desorganización de la envoltura nuclear se le denomina **profase**; desde la rotura de la envoltura hasta la colocación de los cromosomas en un plano y en el centro de la célula se le llama **prometafase**; la disposición de los cromosomas en el plano central de la célula con los centrómeros tensionados por su unión a la fibras de huso mitótico constituye la **metafase**; la migración de las cromátidas a los polos se conoce como **anafase** y la organización de la envoltura nuclear y desespiralización de los cromosomas constituye la **telofase**.

### IDENTIFICACIÓN DE LOS LÍMITES DE LAS FASES MITÓTICAS:

El comienzo de la profase se identifica como el comienzo de la división (3). Se consideran en profase aquellas células que tienen envoltura nuclear que se intuye al microscopio óptico por el contorno redondeado que tiene el núcleo o el conjunto de los cromosomas sea cual sea el grado de espiralización de éstos (4).



Empieza la prometafase cuando se desorganiza la envoltura nuclear que se detecta porque el conjunto de los cromosomas pierde su contorno circular (5). La prometafase media presenta los cromosomas dispersos por la célula (6) y dura hasta que todos los cromosomas se colocan en la placa ecuatorial o plano central de la célula, después de unirse los centrómeros a las fibras del huso.

La colocación de todos los centrómeros en el plano central identifica el comienzo de la metafase (7). El número de cromosomas de *Allium cepa* ( $2n=16$ ) hace difícil que se puedan ver bien independientemente por lo que se clasifican las células en metafase por la existencia de una marcada banda central y la ausencia de centrómeros fuera de esa banda.

El comienzo de la anafase (migración de cromátidas hermanas a polos diferentes) es difícil de ver por la gran cantidad de material cromatínico que hay en la zona central de la célula. En la práctica se puede determinar porque la escisión del centrómero y el arrastre de las zonas pericentroméricas en el comienzo de la migración, hacen que se forme una sub-banda más clara dentro de la marcada banda central (8); de esta forma puede determinarse el comienzo de la anafase. Además se identifican como anafases las células en las que hay dos grupos de cromosomas migrando a los polos y cada uno de estos grupos tiene un contorno de trapecio isósceles con los centrómeros coincidiendo con la base pequeña (9).

Termina la migración con un grupo de centrómeros en las proximidades de cada polo (10). Se identifica el comienzo de la telofase por el contorno redondeado de cada bloque de cromosomas en el que además, por esa disposición convergente en un espacio pequeño, puede quedar algún brazo cromosómico situado hacia el exterior de la célula (11). El final de la telofase se considera que coincide con la desespiralización de los cromosomas (12) y se identifica como se ha descrito en el final de la división.

### REALIZACIÓN DE PREPARACIONES:

Material biológico: raíces de cebolla de 2 - 3 cm. de longitud

### GERMINACIÓN:

Se limpian las zonas radiculares de las cebollas eliminando las capas secas.

Se coloca la zona radicular en contacto con agua, si es posible bien aireada, entre 20 y 22 °C. Cambiar el agua al menos 2 veces al día.

### FIJACIÓN:

Cortar raíces de 2 a 3 centímetros y sumergir en etanol-acético 3:1 recién hecho durante un mínimo de 20 minutos.

### CONSERVACIÓN:

En el congelador, si es posible a -18°C.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS (Las preparaciones pueden hacerse con material fijado o fresco)

### TINCIÓN:

Se colocan 3 o 4 raíces en un vidrio de reloj con orceína clorhídrica al 2%. Se calienta sobre un mechero hasta la emisión de vapores blanquecinos y se deja enfriar durante 5 minutos.

Repetir la operación. Calentar igual por tercera vez y dejar enfriar 10 minutos.

Añadir orceína clorhídrica al 2% siempre que se corra el riesgo de que se sequen las raíces.

### REALIZACIÓN DE PREPARACIONES:

Se toma una de las raicillas teñidas y se deposita sobre un porta limpio. Se separan 1,5 o 2 mm. del extremo apical de la raíz (es el más redondeado) y el resto se tira. Se añade una gota de orceína acética al 1% o de acético al 45% sobre el meristemo separado y con cuidado se deposita un cubre y se golpea suavemente con el mango de una lanceta para lograr la extensión de las células. Con un trozo de papel de filtro se elimina el exceso de colorante sujetando con el papel porta y cubre para que este no se desplace lateralmente y presionando sobre el cubre con el dedo. A partir de este momento pueden realizarse las observaciones al microscopio.

### PREPARACIONES PERMANENTES:

Se enfría la preparación con un chorro de nieve carbónica o por inmersión en nitrógeno líquido. Cuando esté congelada la zona de material biológico se separa con una cuchilla el cubre y se introduce el porta, al que se habrá quedado pegado el material, en alcohol etílico al 100% durante un mínimo de 15 minutos. Se saca el porta del alcohol, se seca y se le coloca un cubre limpio con una gota de Entellan o similar.

### OBSERVACIÓN DE LA PREPARACIÓN

Objetivo 4x: Se observa la bondad de la extensión y aplastamiento de las células, si se ha conseguido o no una monocapa celular (esto se detecta moviendo ligeramente el tornillo micrométrico para enfocar distintos planos) y si el grado de tinción es el adecuado.

Con estos aumentos los núcleos se ven como diminutos puntos oscuros. Las células meristemáticas son ligeramente mayores y más cuadradas que el resto que son más rectangulares.

Objetivo 10x: Se localiza la zona en la que se observan células en división. (Los cromosomas se aprecian como manchas más intensamente coloreadas).

Localizada la zona meristemática se proceda a la identificación y estudio de las células en división (objetivo 40x).

### DATOS DE LA MITOSIS.

-Recuento de 100 células seguidas, diferenciando las que están en división de las que están en interfase.

-Determinación del índice de mitosis o de división:

$$ID = I_m = \frac{n^\circ \text{ cels. en div.}}{n^\circ \text{ cels. en div.} + n^\circ \text{ cels. en interfase}}$$

### DATOS PERSONALES:

n° cels. div.=

n° cels. interf.=

n° total cels.=

$I_m = \frac{\quad}{\quad} =$

### DATOS DE GRUPO:

n° total cels. div.=

n° total cels. interf.=

n° total cels.=

$I_m = \frac{\quad}{\quad} =$

### COMENTARIOS:

**ANÁLISIS DE LAS FASES MITÓTICAS:**

Sobre la misma preparación utilizada para el anterior estudio, buscar la zona meristemática y contabilizar con el objetivo de 40 aumentos **todas** las células en división nuclear que vayan apareciendo en el campo hasta un mínimo de 50 por equipo.

-Recuento de 50 células en mitosis anotando la fase en que se encuentran

PROFASE	n°	PROMETAFASE	n°	METAFASE	n°	ANAFASE	n°	TELOFASE	n°

-Cálculo de los índices de fase: (relación entre el n° de células en cada fase y el n° de células en división).

n° total de mitosis = profases + prometafases + metafases + anafases + telofases =

$I_{prof.} = \frac{n^{\circ} \text{ prof.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{promet.} = \frac{n^{\circ} \text{ promet.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{met.} = \frac{n^{\circ} \text{ met.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$

$I_{ana.} = \frac{n^{\circ} \text{ ana.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{tel.} = \frac{n^{\circ} \text{ tel.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$

Teniendo en cuenta el bajo número de células contadas, el número relativamente elevado de clases y, como se verá más adelante los diferentes valores esperados para cada clase, es fácil que en este conteo se encuentren errores de muestreo considerables. par evitarlos se procede a la suma por clases de los datos de todos los equipos del grupo de prácticas, repitiendo el análisis después con números suficientemente altos para realizar el análisis estadístico con ciertas ,garantías.

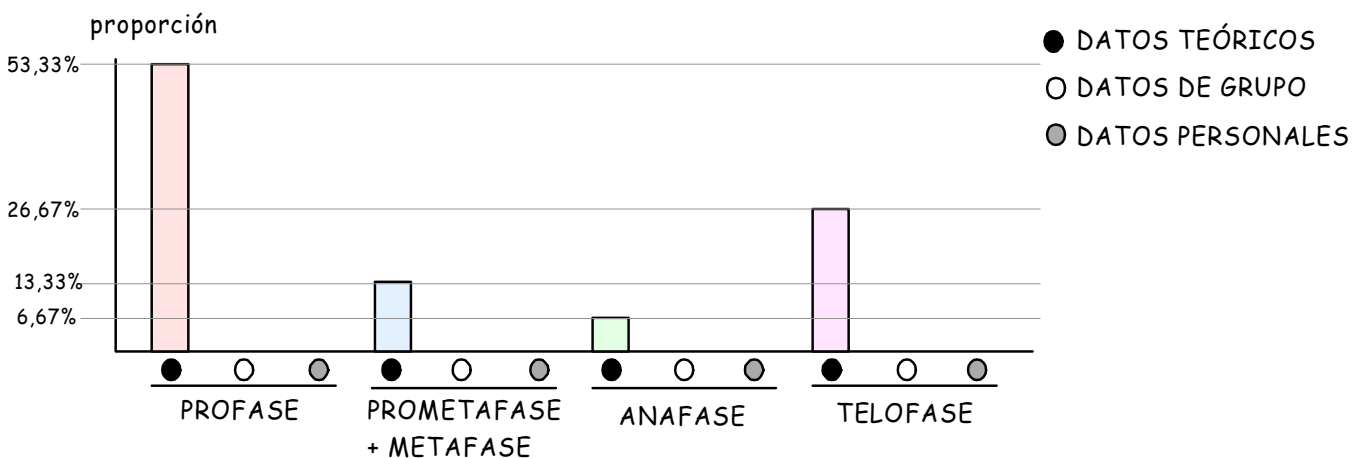
DATOS DEL GRUPO:

PROFASE  n°     
 PROMETAFASE  n°     
 METAFASE  n°     
 ANAFASE  n°     
 TELOFASE  n°

$I_{prof.} = \frac{n^{\circ} \text{ prof.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{promet.} = \frac{n^{\circ} \text{ promet.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{met.} = \frac{n^{\circ} \text{ met.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$

$I_{ana.} = \frac{n^{\circ} \text{ ana.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$ 
                         
  $I_{tel.} = \frac{n^{\circ} \text{ tel.}}{n^{\circ} \text{ mit.}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} = \text{---}$

- Comentar y explicar las diferencias entre los datos personales y los del grupo de prácticas.
- Relacionar estos índices de grupo con la duración de cada fase en la mitosis
- Comparar los resultados con los teóricos que indican que, en condiciones normales por cada anafase deben encontrarse 2 metafases (se consideran metafases como la suma de prometafases y metafases), por cada metafase deben encontrarse 2 telofases y por cada telofase 2 profases..



COMENTARIOS: (añadir hoja)



## TRATAMIENTO CON COLCHICINA

### COLCHICINA: Generalidades

El número de cromosomas de una célula es característico de la especie, es decir, todos los individuos de una especie tienen el mismo número de cromosomas en cada una de sus células somáticas.

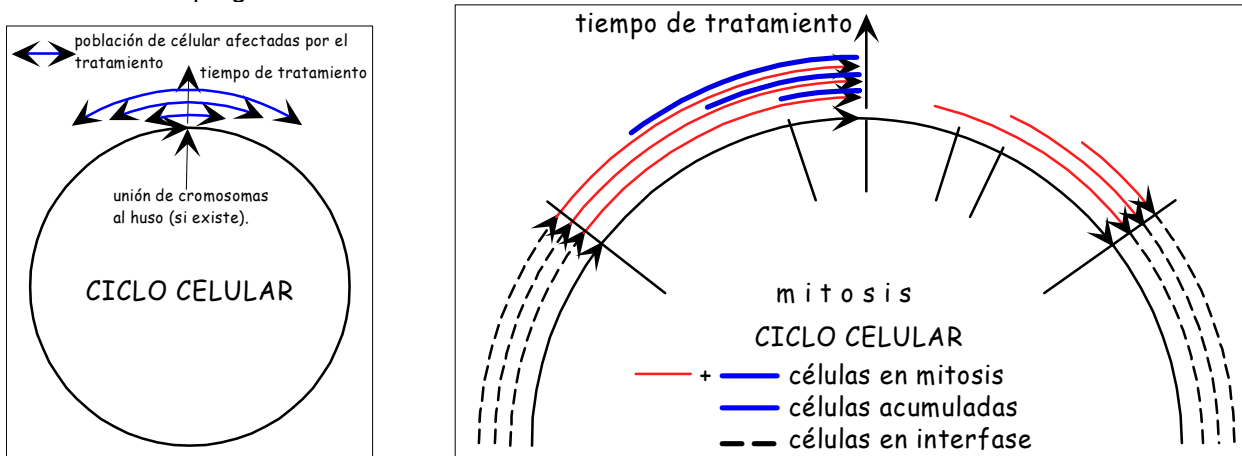
Para la determinación del número de cromosomas de una célula se buscará aquella fase mitótica en la que los cromosomas estén más espiralizados e independientes entre sí: la metafase.

No obstante en muchas ocasiones resulta muy difícil el conteo aún en metafase por lo que se recurre a tratamientos especiales para aumentar la espiralización de los cromosomas.

La colchicina es una droga que se extrae del *Colchicum hispanicum* y cuyo efecto tiene como consecuencia la despolimerización de la tubulina que forma las fibras del huso. Al no formarse huso los cromosomas no se colocan en placa y siguen espiralizándose, acortando su longitud, separándose más entre sí y facilitando su conteo.

La colchicina actúa de forma casi instantánea pues penetra en las células rápidamente, y de la misma manera se elimina fácilmente lavando y poniendo de nuevo agua en la germinación de los bulbos. Si el tiempo de tratamiento es muy largo las células tratadas se mueren, pero si el tratamiento no es suficientemente largo como para producir el bloqueo de la célula, cuando se elimina la colchicina se recupera la actividad metabólica normal y se continúa la división.

Si el tratamiento con colchicina es muy corto, sólo se alterarán las etapas de la mitosis muy próximas al momento de acción de la droga y mientras más se prolongue el tratamiento más se extenderán los efectos, alcanzando así progresivamente distintas fases mitóticas.



Así a la vez que se estudian los efectos de la colchicina sobre la división, puede determinarse, la fase en que se unen los cromosomas al huso (habrá acumulación en ese momento), las fases anteriores (teóricamente no deben presentar modificaciones en sus índices), y el orden de las fases posteriores (irán rebajando sus índices hasta desaparecer, tanto más tempranamente cuanto más cercanas sean al momento de unión de los cromosomas al huso).

Durante la acumulación las células no avanzan en la mitosis pero los cromosomas siguen espiralizándose, lo que acorta su longitud y facilita el estudio de su morfología y la determinación del número cromosómico de la especie.

Por último, si el tratamiento se prolonga, las cromátidas terminan por separarse y si se elimina después de este momento la colchicina las células pueden pasar directamente a interfase, produciéndose la duplicación del número de cromosomas (en este caso de  $2n$  pasaría a  $4n$ , siendo las células tetraploides viables, de mayor tamaño y, si después de completar la interfase entran de nuevo en mitosis pueden observarse los  $4n$  cromosomas).

TRATAMIENTO CON COLCHICINA: (Se parte de bulbos de cebolla germinados con raíces de entre dos y tres centímetros).

1.- Preparar colchicina al 0.1% (0.1 g. de colchicina en 100 c.c. de agua. (Agitar sin formar espuma).

2.- Sumergir las raíces en la solución y seguir el siguiente protocolo:

- a los 20 min.- Cortar raíces y fijar en etanol acético 3:1 recién hecho. Conservar en el congelador ( $-18^{\circ}\text{C}$ )
- a los 40 min.- idem
- a los 60 min.- idem
- a los 90 min.- idem
- a los 120 min.- idem

3.- Hacer preparaciones (con el mismo procedimiento anteriormente utilizado) con raíces tratadas durante distintos tiempos.

4.- Contar 50 células en división y determinar los índices de fase en cada preparación:

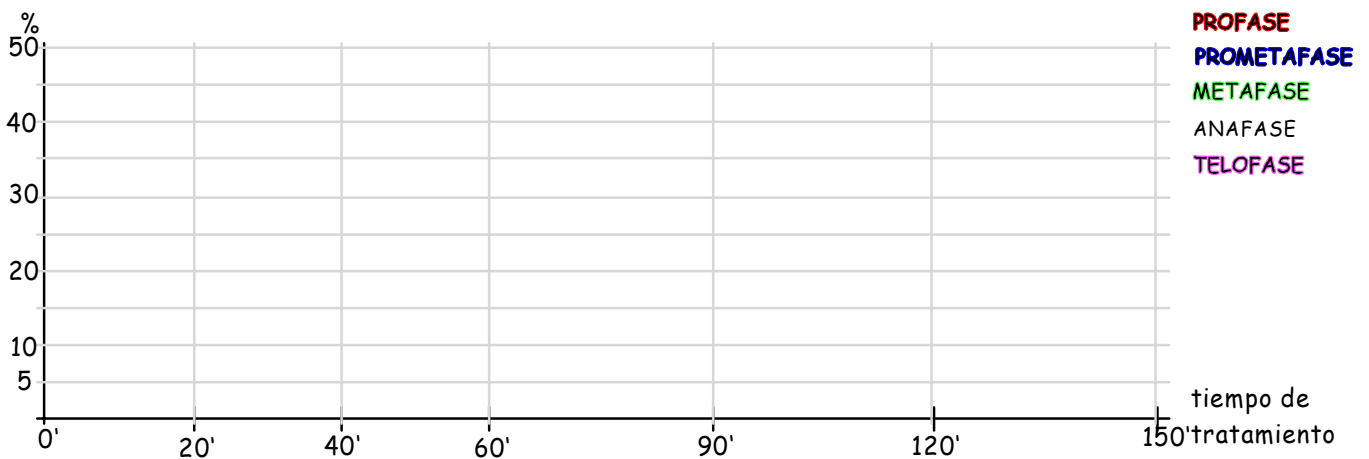
	PROFASE	PROMETAFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE
20'					
40'					
60'					
90'					
120'					
150'					

Para evitar en lo posible los errores de muestreo que se pueden cometer al contabilizar un número tan pequeño de células por persona se procede a sumar los datos de todos los equipos del grupo de prácticas.

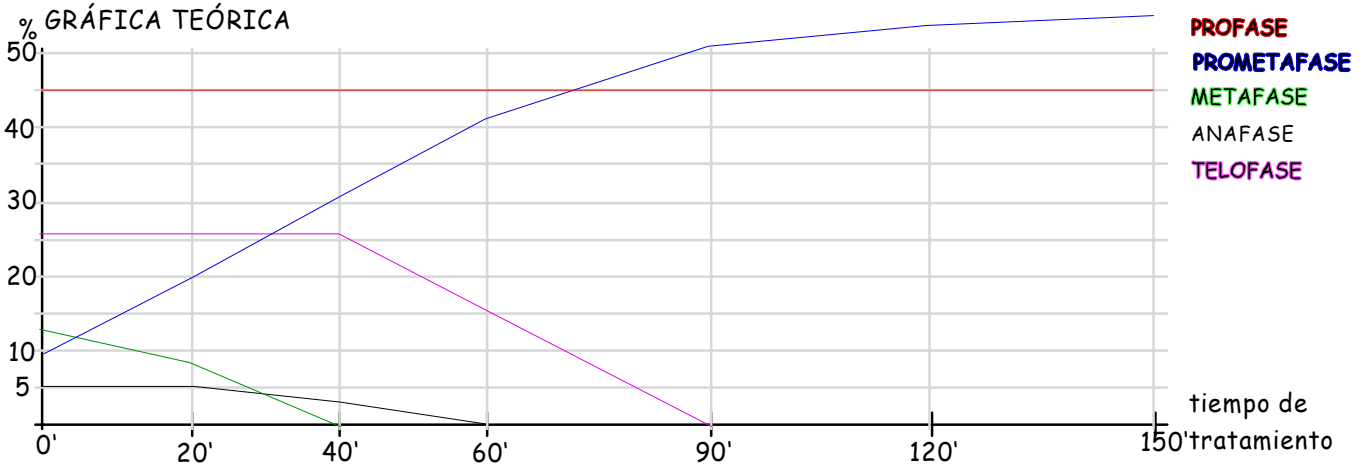
DATOS GLOBALES:

	PROFASE		PROMETAFASE		METAFASE		ANAFASE		TELOFASE	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
20'										
40'										
60'										
90'										
120'										
150'										

Representar gráficamente para cada fase mitótica la evolución de los porcentajes a lo largo de los tiempos de tratamiento, y tomando como datos de tiempo cero los obtenidos en el análisis de lo mitosis sin colchicina (1ª parte de la práctica).



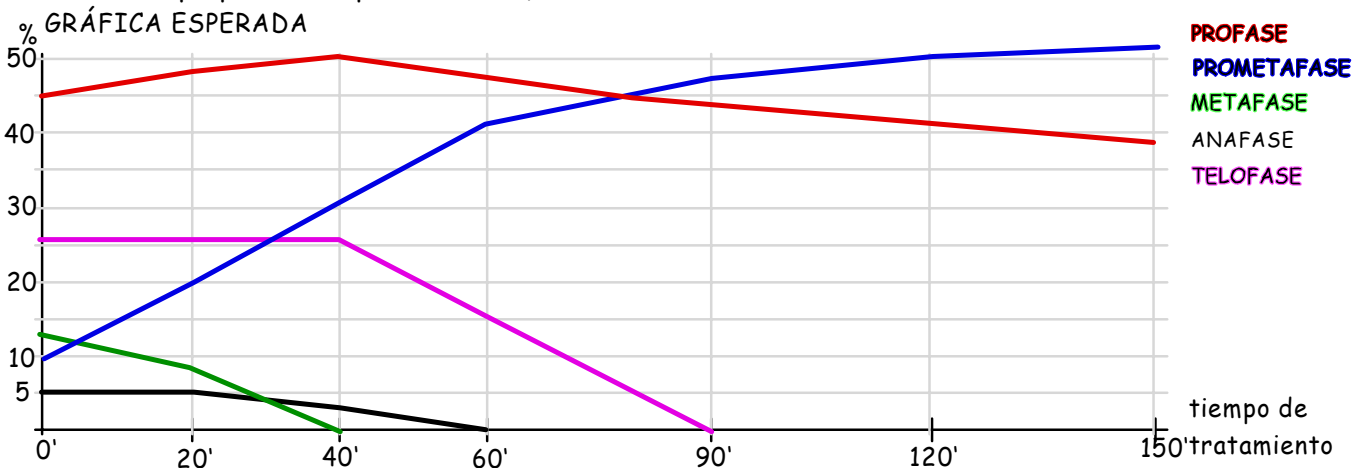
Teóricamente, si la acumulación se produce en prometafase, al representar gráficamente porcentajes de cada fase a lo largo del tiempo de tratamiento, se esperarí:



Sin embargo, de modo sistemático se observan ligeras modificaciones a estas gráficas producidas por los siguientes fenómenos:

-La colchicina alarga ligeramente la profase (al no formarse el huso la envoltura nuclear parece que resulta más persistente) por lo que se espera que la gráfica de las profases no sea plana sino que tenga un ligero repunte a los 20 o 40 minutos de tratamiento.

-Aunque en los primeros momentos de tratamiento entran en mitosis tantas células como salen, cuando se agoten las fases posteriores a la acumulación y sigan entrando el mismo número de células en profase, cada vez habrá más células en mitosis por lo que la proporción de profases decrecerá ligeramente. (Como de profase a prometafase siguen pasando el mismo número de células también se ralentizará ligeramente el aumento en la proporción de prometafases).



COMENTARIOS: (comparar la gráfica obtenida con la esperada tratando de justificar razonadamente las diferencias existentes). (Añadir hoja si es necesario).