

Este recubrimiento se hace al vacío con el recubridor de capa fina. Uno de los mayores factores que afectan la uniformidad de la capa fina es el tipo de material usado en el recubrimiento. Los metales más empleados son el oro, paladio, carbón o las combinaciones de ellos. El oro es de uso más generalizado debido a su fácil adquisición en forma pura o combinada, es fácilmente evaporado desde un filamento de tungsteno y tiene un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios.

V. OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS

I. INTRODUCCION

Los avances tecnológicos en las diversas ramas de la ciencia han permitido ir diferenciando los complicados problemas biológicos, facilitando en nuestros días una visión más precisa de la complejidad de los organismos y particularmente de la célula. Este es el caso de la citogenética, la cual se ha convertido en disciplina con un papel muy importante en el conocimiento biológico de los recursos vegetales desde el punto de vista taxonómico, de hibridación de cultivos de ingeniería genética o en la detección de los efectos de contaminación ambiental.

La citogenética requiere del conocimiento de la forma, número y asociación de los cromosomas, importantes por ser los responsables de los caracteres hereditarios en cada organismo, así como el proceso cariocinético. Durante tal proceso son elásticos y de consistencia gelatinosa pudiendo ser teñidos con facilidad por los colorantes básicos como resultado de contener una elevada proporción de DNA y proteínas.

Un método utilizado recientemente para observar cromosomas es el "Squash". Dicha técnica permite separar las células individualmente facilitando la observación de los cromosomas por su espaciamiento en el citoplasma durante la mitosis.

2. BREVE DESCRIPCION DE LA MITOSIS

La división celular es obviamente la primera etapa en el crecimiento y diferenciación. La formación de nuevos tejidos no puede producirse sin la división celular. Durante este proceso, se multiplicará tanto el núcleo como el citoplasma denominándose a este período de división nuclear con el término de mitosis, el cual compren

Este recubrimiento se hace al vacío con el recubridor de capa fina. Este proceso se hace de cuatro fases que son: Profase, metafase, anafase y telofase y a todo el tiempo de división se le denomina como ciclo mitótico.

La división de una mitosis normal varía según las células que se consideren estudiar, por ejemplo en los estigmas de las gramíneas, el proceso de mitosis se desarrolla durante tiempos comprendidos entre 77'-110'. La profase y la telofase son las de mayor duración, realizándose la profase entre 35'-45' y la telofase de 20'-35', la metafase se desarrolla entre 7'-10' y la anafase de 15'-20'. El período de gestación de la división se conoce como interfase en la cual se lleva a cabo la duplicación del DNA. La duración de ésta en células vegetales varía entre 10 y 20 horas.

Durante el proceso de la división celular se lleva a cabo la división nuclear o cariocinesis y la del citoplasma conocida como citocinesis, en esta última se producen dos nuevos conjuntos de citoplasma. En los estadios finales de la división celular en plantas superiores el citoplasma está dividido por una placa celular cuyo crecimiento se inicia internamente y sigue hacia la periferia, hasta que completa la división de las dos células hijas.

De ordinario, la división nuclear precede directamente a la división de citoplasma, pero el núcleo no se separa en dos partes por medio de la formación de un surco o de una placa celular. El núcleo, para poder dividirse pasa por una serie de actividades y a este proceso de división nuclear indirecta es llamada mitosis, donde se originan núcleos, que tienen complementos genéticos idénticos.

INTERFASE

Durante este período el núcleo está limitado por una membrana nuclear y está lleno de una sustancia básica o matriz de aspecto más o menos homogéneo, en la cual se encuentra uno o más cuerpos pequeños llamados nucleólos y materia de cromosomas desespiralado en forma de cromatina.

PROFASE

La primera indicación de que el núcleo se está preparando para dividirse es la aparición en su sustancia básica de una masa de fibras separadas, conocidas como cromosomas y su aparición marca el inicio de esta fase. Cada cromosoma está formado por dos estructuras espiraladas una en otra, llamadas cromátidas:

A medida que continúa la profase, en cada cromosoma las cromátidas se vuelven más cortas y más gruesas y se desenrollan una de otra. Al final de la profase los nucleólos y la membrana nuclear han desaparecido y los cromátidas han formado bastones gruesos que por primera vez empiezan a moverse activamente.

La parte activa o de movimiento, no es propiedad de todo el cromosoma, sino que está restringido a una región particular del mismo llamada centrómero.

METAFASE

Los centrómeros se mueven en una dirección particular en relación a una estructura fibrilar llamada "huso", la cual se ha formado durante la profase. Los cromosomas por medio de los centrómeros emigran de cualquier posición que puedan tener en la región del "huso" al plano ecuatorial. Cuando todos los centrómeros han llegado al plano ecuatorial del "huso", la mitosis se encuentra en su siguiente fase llamada metafase.

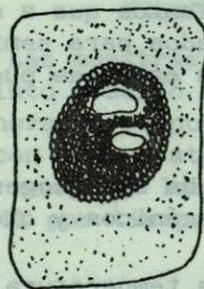
Hasta este punto, las cromátidas de un cromosoma están aún unidas en el centrómero o cerca de él aunque en sus otras partes estén libres.

ANAFASE

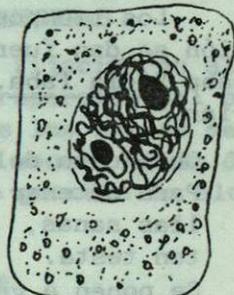
En esta fase se separan los centrómeros y los dos centrómeros hijos de inmediato se apartan yendo cada uno de ellos hacia un polo opuesto del huso, con el resto de la cromátida, la cual ahora se conoce como cromosoma joven. Cuando los cromosomas han llegado a los polos, ocurre el último estadio conocido como telofase.

TELOFASE

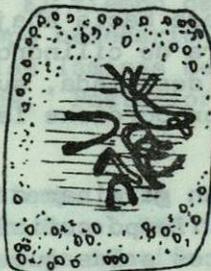
Es este estadio los acontecimientos aparecen como inversos a los de la profase. Específicamente el huso se desintegra, se forma una nueva membrana nuclear alrededor de los cromosomas y reaparecen los nucleólos. Los cromosomas se vuelven más delgados y más largos y luego se puede ver que consisten en dos fibras delicadas (las cromátidas torcidas entre ellas). Finalmente los cromosomas pierden su identidad visible y el núcleo entra en la interfase o estadio intermitótico o metabólico.



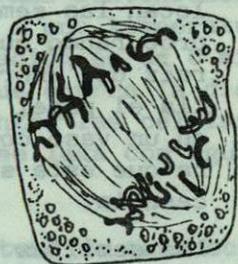
Núcleo en reposo
Interfase



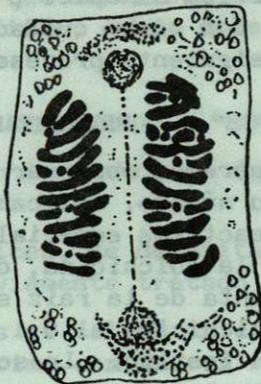
Profase



Metafase



Anafase



Telofase

3. PREPARACION DE RAICES PARA OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS

Los tiempos y procesamientos que a continuación se dan fueron determinados para semillas de haba Vicia faba. Para otras especies puede variar.

Obtención del material.

Para obtener raíces de haba se escogen semillas sanas, sin daños mecánicos y que presenten testa.

Se ponen a germinar a una temperatura de 20 a 25°C. sobre un papel filtro humedecido y doblado de una de sus partes. En la cual se colocan las semillas espaciadas una de otra, procurando que el meristemo apical de la raíz del embrión quede hacia abajo. Se enrolla el papel a manera de cilindro y se coloca en un vaso con agua destilada, suficiente para que ésta suba y proporcione la humedad necesaria.

Las semillas se dejan germinar a 20°C. de tres a cinco días. Tiempo suficiente para que emerjan las raíces a las que se les cortará arriba del ápice 3 milímetros aproximadamente, con mucho cuidado pues de aquí depende ra el siguiente proceso.

PRETRATAMIENTO

Si queremos observar la forma de los cromosomas y su número, aplicamos pretratamientos con algunos reactivos especiales. Uno de los más usados es la colchicina, durante este tratamiento a la punta de la raíz se le agrega una solución de colchicina al 0.1 % por dos horas, dejándose un testigo. La solución de colchicina es un pretratamiento que se aplica para que se contraigan los cromosomas, facilitando su conteo y la clara observación de su morfología. Otro

efecto importante es el de obtener el mayor número de células en metafase por inhibición del movimiento de cromosomas.

FIJACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras se llevan a fijación en alcohol absoluto y ácido acético en proporción 3:1 por dos horas. Después de fijadas las raíces se lavan con agua destilada varias veces, si se desean mantener las muestras se guardan en alcohol al 70% por tiempo indefinido.

MACERACION

Las raíces se ponen en un colador y se coloca encima de un vaso de precipitado conteniendo ácido clorhídrico al 1 normal y a una temperatura de 60°C. El tiempo de maceración es de 6 minutos, tiempo necesario para que ocurra la disolución de las láminas medias entre las células de las raíces. Posteriormente se lava con agua destilada.

El tiempo y la temperatura de maceración e hidrólisis en el DNA influye principalmente en el proceso de tinción; si no obtenemos resultados excelentes hay que modificar el proceso de maceración e hidrólisis, dando diferentes tiempos y/o temperatura.

TECNICA DE APLASTADO O "SQUASH"

Para este caso tomaremos la descrita por Murín, (1960):

1. Se sacan las raíces, se depositan sobre un portaobjeto previamente tratado con adhesivo.
2. Sobre las raíces se coloca un cuadro de papel celofán y se oprime con fuerza moderada con algún objeto de paredes lisas de tal manera que se forme una película de células. Esto hace que el agua excedente se elimine, quedan

do alrededor del papel la cual se extrae con un papel secante una vez realizado lo anterior se deja secar un poco cuidando ahora que el celofán no se enrolle sobre sí mismo.

TINCION

Las preparaciones se tiñen en una solución saturada de fucsina básica (0.26%), por siete minutos.

DIFERENCIACION

Para este paso se usa alcohol al 80% por un tiempo aproximado de dos minutos. Es importante observar el material al microscopio para ver el grado de coloración de los cromosomas.

DESHIDRATACION

Se pasan las laminillas a alcohol al 90 % - por cinco minutos, después en alcohol absoluto - por otros cinco minutos.

PREPARACIONES PERMANENTES

Después de los alcoholes se pasan las laminillas por una mezcla de alcohol y xilol y se montan con resina.

Alcohol	2 partes	
Xilol	1 parte	10 min.
Alcohol	2 partes	
Xilol	2 partes	10 min.
Alcohol	1 parte	
Xilol	2 partes	10 min.
Xilol puro		De 12 hasta 24 horas.

PREPARACION DE SOLUCIONES USADAS

1. ADHESIVO.

Cantidades iguales de glicerina y albúmina de -- huevo se mezclan y filtran (con algodón). Para conservar la mezcla se puede poner un gramo de -- salicilato de sodio o un cristal de timol.

SOLUCION PARA HIDROLISIS Y MACERACION.

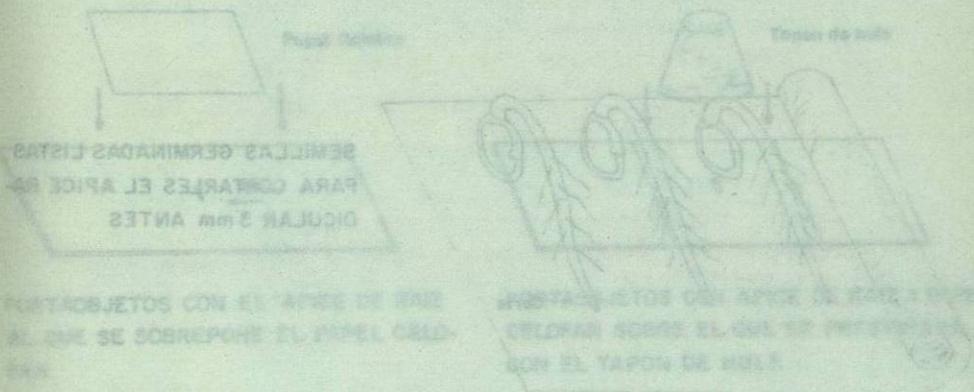
2. Para la hidrólisis se utilizan ácido clorhídrico 1 N.

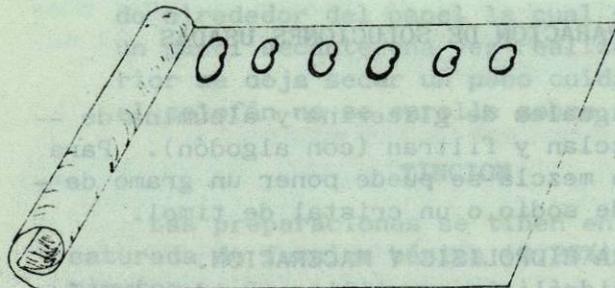
Para 150 ml.

Acido clorhídrico concentrado	12.5 ml.
Agua destilada	137.5 ml.

3. SOLUCION DEL COLORANTE.

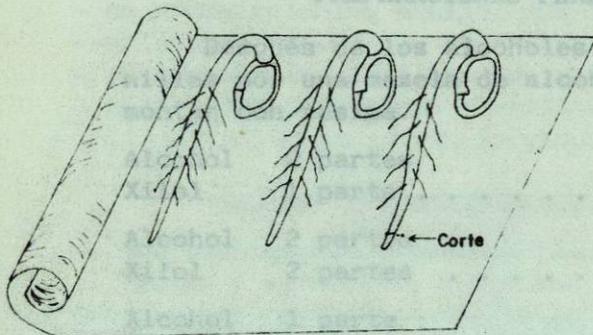
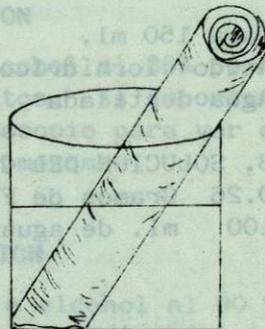
0.26 Gramos de Fucsina básica
100 ml. de agua destilada y filtrar.



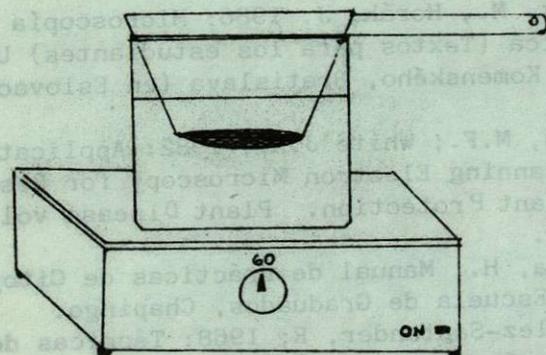


Papel Filtro Enrollando
Semillas.

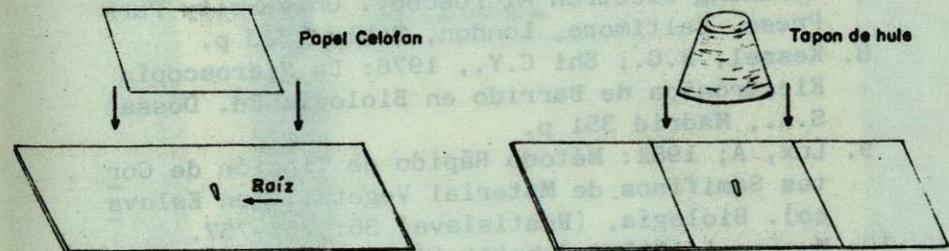
VASO CON AGUA DESTILADA Y CON EL PAPEL FILTRO ENROLLADO CONTENIENDO LAS SEMILLAS PARA GERMINAR.



SEMILLAS GERMINADAS LISTAS PARA CORTARLES EL APICE RADICULAR 3mm ANTES



VASO CON SOLUCION DE AGUA DESTILADA Y ACIDO CLORHIDRICO A 60° C, CON UN COLADOR PARA HIDROLIZAR LOS APICES DE RAIZ.



PORTAOBJETOS CON EL APICE DE RAIZ AL QUE SE SOBREPONE EL PAPEL CELOFAN.

PORTAOBJETOS CON APICE DE RAIZ Y PAPEL CELOFAN SOBRE EL QUE SE PRESIONARA CON EL TAPON DE HULE.

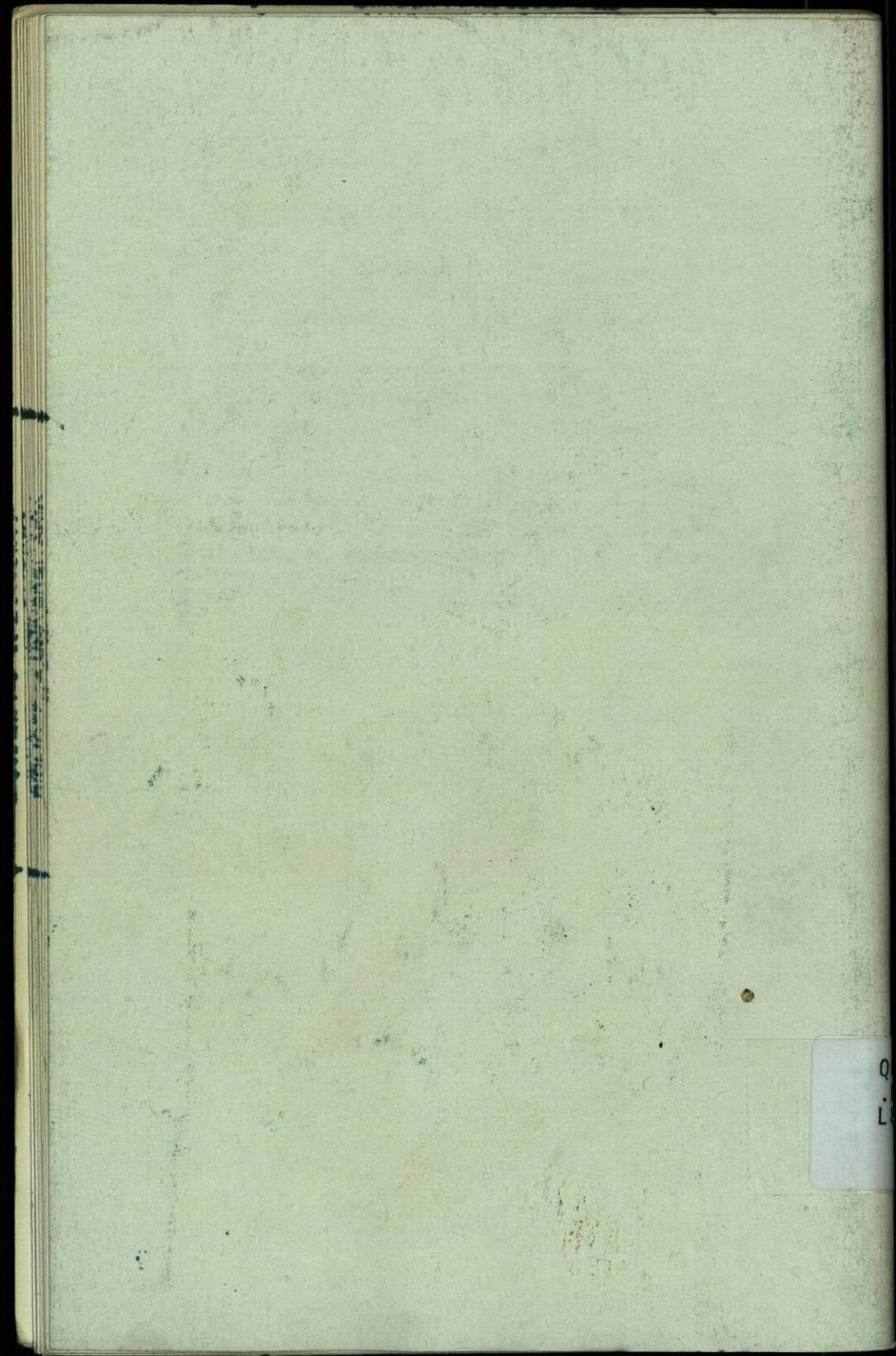
BIBLIOGRAFIA

1. Bobák, M., Horák, J. 1986: Microscopía Electrónica (Textos para los estudiantes) Univerzita Komenského, Bratislava (en Eslovaco), -- 99 p.
2. Brown, M.F.; White J.A., 1982: Applications of Scanning Electron Microscopy for Research in Plant Protection. *Plant Disease* vol. 66 - No. 4.
3. García, H.; Manual de Prácticas de Citogenética. Escuela de Graduados, Chapingo.
4. González-Santander, R; 1968: Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología Ed. Aguilar Madrid, 666 p.
5. Hall C.E.; 1970: Microscopía Electrónica Ediciones Urmo, Bilbao 440 p.
6. Hayat, M.A.; 1972: Basic Electron Microscopy Techniques. Van Nostrand Reinhold Company, - New York, 119 p.
7. Hayat, M.A.; 1978: Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. University Park Press. Baltimore, London, Tokio. 323 p.
8. Kessel, R.G.; Shi C.Y., 1976: La Microscopía Electrónica de Barrido en Biología Ed. Dossat S.A., Madrid 351 p.
9. Lux, A; 1981: Método Rápido de Tinción de Cortes Semifinos de Material Vegetal. (en Eslovaco). *Biología*, (Bratislava) 36: 753-757.
10. Murín, A; 1960: Substitution of Celophane for Glass Covers to Facilitate Preparation of Permanent Squashes and Smears. *Stain Technol.* - 35: 351-353.
11. Rakoff, H.; 1974: Química Orgánica Fundamental, Limusa México, 1a. Ed. 620 p.
12. Swanson, C.P., Merz, T., Young, W.J., 1968: - Citogenética. Union Tipográfica, Editorial - - Hispanoamericana 321. p.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
CAPILLA ALFONSINA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

ducación
POR LA VIDA



Q
L