



Centro Internacional de Agricultura Tropical

CAPACITACION CIENTIFICA
Y CONFERENCIAS

Seminario
Programa de Frijol



SE-5-86

Diciembre 5, 1986

1854

ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL Y RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL
COMPUTARIZADA DE LA MITOSIS EN SUSPENSIONES CELULARES
DE MAIZ (Zea mays)

Andrea Niessen

Mitosis es un proceso de las células eucarióticas mediante el cual los cromosomas replicados se separan y van a las células hijas; es, por tanto, una actividad de fundamental importancia en el ciclo celular.

Muchos científicos han tratado de entender este complejo mecanismo y han empleado diversos procedimientos y técnicas para lograrlo. El microscopio de luz y el microscopio electrónico de mayor resolución, han ayudado al estudio de la mitosis. A pesar de que han sido notables los progresos obtenidos, aún quedan muchos interrogantes sin responder.

Una de las grandes limitaciones en el estudio de la mitosis ha sido la pérdida de la imagen tridimensional de la célula. Pero la reciente

938

aparición de microcomputadoras, de lenguajes de programación relativamente simples, y de digitadores hacen posible en la actualidad la visualización y reconstrucción de ultraestructuras celulares en tres dimensiones.

En la presente investigación se estudiaron las fases mitóticas de suspensiones celulares de maíz. Se escogió el maíz (Zea mays) por su papel trascendente en genética vegetal y en las investigaciones de la biología molecular vegetal.

La importancia y el interés despertados por el cultivo de tejidos, así como el avance logrado en los últimos años en las técnicas que éste emplea, pronostican un gran potencial a esa nueva ciencia para el mejoramiento de plantas.

Las suspensiones celulares son ideales para el estudio de la división celular porque es posible llegar a su sincronización; éste proceso permite aumentar considerablemente el número de células en una misma fase del ciclo celular.

Este estudio comprende la combinación de observaciones al microscopio de luz y al microscopio electrónico, y la aplicación de novedosas técnicas computarizadas para la reconstrucción tridimensional.

Microscopia de luz

La suspensión celular está compuesta de agregados celulares de diversos tamaños que aumentan de tamaño con la edad. Observarlos al microscopio de luz es difícil debido a la rígida pared celular y al compactamiento de los agregados de estas células.

Se hicieron observaciones de los agregados celulares desde el momento de su transferencia a un medio de cultivo fresco hasta el octavo día de crecimiento, fecha en que rutinariamente se lleva a cabo una nueva

transferencia. Las células varían significativamente durante este período. Inicialmente son redondeadas y se organizan de modo compacto. Al final del período de crecimiento o sea, alrededor del sexto día las células comienzan a aumentar en volumen, los agregados son menos compactos, y el citoplasma aparece menos denso.

El índice mitótico más alto, 2.79% lo alcanzó la suspensión celular al segundo día de crecimiento. Aunque este índice es relativamente bajo, es parecido al indicado por otros autores para cultivos celulares semejantes de gramíneas. Durante el segundo, tercero y cuarto días, se encontró un porcentaje más alto de profases; en el sexto y octavo días en cambio, la mayoría de la células mitóticas estaban en telofase.

Partiendo de los valores de índice mitótico se puede concluir que la fase mitótica más larga es la profase, la siguiente es la telofase, y las más cortas son la metafase y la anafase.

Sincronización

Para incrementar el número de células en mitosis, se inició un proceso que trata de sincronizar la suspensión celular. Este proceso se inició al sexto día de crecimiento cuando la mayor parte de las células ya habían concluido la mitosis. El proceso de sincronización consistió en someter las células a dos tratamientos de frío de tres días, separados por un período de 48 horas en que se les adicionó medio fresco y se dejan a temperatura ambiente. Se obtuvo un índice mitótico de 5.14 % el segundo día después de la sincronización, es decir, 45.6 % mayor que el obtenido antes de la sincronización.

Citología de microscopia de luz

Las células en interfase presentan, dentro de un citoplasma densamente coloreado, un núcleo redondo con grupos dispersos de cromatina condensada y un nucléolo compacto. En la profase los cromosomas son delgados y

largos, y se encuentran en la denominada conformación "Rab1", es decir, con todos los centrómeros agrupados en el polo nuclear. En algunos casos es posible diferenciar el cromosoma seis del maíz que es el cromosoma organizador del nucléolo por estar unido a él.

Es evidente la presencia de sincronía localizada ya que frecuentemente se encuentran agrupadas dos o más células en mitosis.

En la metafase, los cromosomas se congregan en el plano ecuatorial de la célula formando lo que se ha llamado la congregación metafásica. Se observó que todos los centrómeros parecen estar localizados en un mismo plano y formando un círculo.

Las células en anafase ya indican la conformación "Rab1" puesto que los cromosomas hijos migran hacia los extremos orientados de igual forma.

Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional

La mayoría de las células mitóticas se encontraron en la periferia de los agregados celulares. No se observaron cambios evidentes a nivel citológico entre las suspensiones celulares de maíz sometidas al proceso de sincronización y las que no lo fueron.

Las diferencias observadas en estas células de maíz en diferentes períodos de crecimiento se hacen tanto más evidentes cuanto mayor magnificación se emplea. Durante los primeros días las células presentan un citoplasma cargado de plastidios y ribosomas así como de gránulos de almidón y de pequeñas vacuolas que rodean el núcleo. Las células de un agregado se encuentran comunicadas entre sí por medio de numerosos plasmodesmos.

A medida que las células envejecen aumentan de volumen, pudiendo multiplicar varias veces su volumen original. Las vacuolas pequeñas se fusionan para formar grandes vacuolas que llegan a ocupar gran parte del espacio citoplasmático. Las células elongadas alcanzan un estado no

morfogénico en el cual ya no llevan a cabo la mitosis. En algunos casos, dependiendo de la dirección en que se ha hecho el corte, las células parecen binucleadas. En realidad, se trata de los llamados núcleos anillados ('looped nuclei') los cuales han perdido su característica forma redondeada y presentan prolongaciones en forma de "U" que se forman gradualmente.

Interfase

La mayoría de las células observadas estaban en interfase, y la cantidad de cromatina condensada (heterocromatina) presente en el núcleo variaba según el período interfásico (G1, S o G2) en que se hallaba la célula. Por la forma como se encuentra distribuida la heterocromatina, estas células de maíz pertenecen al grupo de los núcleos reticulados o cromonemáticos, al igual que a la subcategoría de núcleo 'cap'.

Tanto si la célula se halla en interfase como en profase, se observa en ella un grupo de heterocromatina unida a un centro fibrilar del nucleólo; este grupo es parte del cromosoma seis que es el organizador nucleolar del maíz (NOR). Estos centros fibrilares parecen ser los sitios activos del nucleolo. Muchas veces el NOR forma una especie de cinturón, que parcialmente rodea al nucleólo. Otros segmentos de cromosomas, representados por partes heterocromáticas, también están en contacto con la envoltura nuclear, pero no se observó interacción entre ellos y los centros fibrilares.

Profase

En la profase temprana la heterocromatina comienza a condensarse. Con la ayuda de las reconstrucciones tridimensionales se logra unir la información que cada corte presenta para poder determinar, por ejemplo, qué región de cromatina pertenece a determinado cromosoma y como se encuentran localizados los cromosomas dentro del núcleo. Al observar el total de los cortes de una célula (en el caso de un núcleo profásico eran 52 cortes) en tres dimensiones, no se logra discernir nada, pues hay

demasiada información y las estructuras se sobreponen. Tomando grupos de cortes, en cambio, la situación es diferente: se logra identificar los cromosomas, su posición dentro del núcleo, la íntima relación que existe entre los cromosomas y la membrana nuclear, y la superficie del nucléolo. Los cromosomas están en contacto con la membrana nuclear por uno de los telómeros. Con grandes magnificaciones se pueden observar los poros nucleares con su estructura anular y el centro granular.

Cuando se digita únicamente la membrana nuclear con el nucléolo, la imagen tridimensional muestra la redondez del núcleo en profase y la interacción del cromosoma organizador del nucléolo con el nucléolo.

En la profase tardía, cuando los cromosomas están totalmente condensados, la membrana nuclear comienza a invaginarse para desintegrarse finalmente en fracciones de similar tamaño; enseguida el área nuclear pierde densidad, y grupos de microtúbulos penetran en ella.

Metafase

La membrana nuclear ha desaparecido completamente al igual que el nucléolo. Largos tramos de retículo endoplasmático rugoso rodean la región que había sido el área nuclear. Los cromosomas se ven compactos y se pueden diferenciar las cromátidas hermanas.

Los cromosomas se encuentran en el plano ecuatorial de la célula y se observan paquetes de microtúbulos unidos a los cinetocoros en mayor número de diez. Los cinetocoros están en un mismo plano, pero los brazos de los cromosomas están orientados en todas direcciones formando una especie de cilindro en el plano ecuatorial de la célula. Algunos de los cromosomas ya han comenzado a separarse y a migrar hacia los polos, lo cual indica que la metafase y la anafase son casi simultáneas.

La posición del cinetocoro permite determinar si un cromosoma es metacéntrico, submetacéntrico, o acrocéntrico, respectivamente, lo cual es importante para su identificación. El total del huso acromático se encuentra rodeado por fibras de retículo endoplasmático que lo aíslan del resto del citoplasma y evitan de esta forma que los orgánulos interfieran con la migración de los cromosomas. Se ha demostrado en otras gramíneas que este retículo endoplasmático controla la concentración de iones libres de Ca^{++} en el aparato mitótico, lo cual influye en la regulación de la formación de microtúbulos y por ende en la motilidad de los cromosomas.

Anafase

La separación de los cromosomas hijos se completa y éstos migran a los casquetes polares opuestos del huso acromático, guiados por los microtúbulos del cinetocoro y manteniendo los brazos cromosomales hacia atrás.

Durante la anafase la zona del huso acromático comienza a ser invadida por gran cantidad de sistemas membranosos, y en la anafase tardía, cuando ya todos los cromosomas han migrado a su respectivo casquete polar, lo cual sucede rápidamente, orgánulos tales como las mitocondrias, los gránulos de almidón, etc., se observan en la región ecuatorial de la célula.

Telofase

Aparentemente, una vez los cromosomas han terminado su migración se vuelve a reformar sin demora la membrana nuclear, la cual es similar inicialmente a una tira de retículo endoplasmático rugoso, del cual quizás se originó. Muchos ribosomas se encuentran asociados con esta zona nuclear, que poco a poco recupera su característica forma redondeada. Los cromosomas se desconcentran poco a poco, perdiendo su aspecto compacto y su densidad electrónica. Ya no es posible diferenciar cromosomas individuales. El núcleo se encuentra rodeado por un gran número de orgánulos.

Citocinesis

El retículo endoplasmático tubular y de cisterna, al igual que numerosos plastidios redondeados en su mayoría, que se encuentran en la célula parecen migrar hacia la región donde se está formando el fragmoplasto. Esta era la región de la placa ecuatorial del huso acromático, entre los núcleos recién formados. Los plastidios y las tiras de retículo endoplasmático comienzan a fusionarse desde los extremos de la célula para formar poco a poco el fragmoplasto que luego constituirá la membrana y la pared celular de las células hijas.

Una vez este completo el fragmoplasto, las células hijas adquieren rápidamente las características de células en interfase. La mitosis ha culminado y se inicia un nuevo ciclo celular.