

PRÁTICA - 2

Nome:

Ciclo Celular e Mitose

Nº USP:

► Descrição da Atividade

Será apresentado um método padrão de preparação de cromossomos mitóticos para estudos citogenéticos. Será conduzida uma coloração química estequiométrica, conhecida como Coloração pelo Método de Feulgen. As lâminas serão preparadas pelo método do esmagamento. Serão preparadas lâminas a partir de pontas de raízes apenas fixadas para observação das fases do ciclo celular e pré-tratadas com agentes anti-mitogênicos e sua ação deverá ser considerada no relatório. O objetivo desta prática é introduzir os estudantes aos métodos de tratamento para obtenção de material para estudos citogenéticos e de coloração de cromossomos, bem como o de entender o que é uma metáfase mitótica de alta qualidade que permita o estudo citogenético, descrevendo a estrutura dos cromossomos e permitindo a elaboração de cariótipos e a contagem precisa do número de cromossomos.

► Questões

Sobre pré-tratamento

O que é e para que serve um pré-tratamento no estudo citogenético?

O que é um agente anti-mitogênico? Cite alguns exemplos de drogas com esta propriedade

Como agem os agentes anti-mitogênicos?

Como deve ser feito o descarte de um agente anti-mitogênico e porque?

Sobre a observação das preparações citológicas

Qual é a principal diferença entre a lâmina preparada a partir de pontas de raízes apenas fixadas, daquelas que passaram pelo processo de pré-tratamento?

Ao que se deve o espalhamento dos cromossomos?

Quais estruturas cromossômicas podem ser observadas?

Qual é a importância da observação destas estruturas?

Qual fase seria a mais indicada para o estudo dos cromossomos?

Sobre a espécie observada com pré-tratamento com anti-mitogênico [Zea mays - milho]

Qual é o número de cromossomos desta espécie?

Que estruturas cromossômicas puderam ser observadas e quais são suas funções?
[considere apenas as metáfases mitóticas]

Esquematize a metáfase mitótica observada

Sobre a Coloração pelo Método de Feulgen

Descreva o procedimento utilizado para a Coloração do Método de Feulgen.

Qual é o processo químico envolvido na coloração por este método?

Por que esta coloração é considerada estequiométrica?

Por que esta coloração é importante para os estudos citogenéticos?

Referências

Mello, M. L. S., & Vidal, B. D. C. (1978). A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura*, 30(6): 665-676

Cuco, S. M., Mondin, M., Vieira, M. L. C., & Aguiar-Perecin, M. L. (2003). Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botanica Brasílica*, 17(3), 363-370.

Bertão, M. R., & Aguiar-Perecin, M. L. (2002). Maize somatic chromosome preparation: pretreatments and genotypes for obtention of high index of metaphase accumulation. *Caryologia*, 55(2), 115-119.

Guerra, M., & Souza, M. D. (2002). Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC.

Singh, R. J. (2002). *Plant cytogenetics*. CRC press.

▶ **Apêndice**

Obtenção de raízes

➔ Sementes de milho :

Embeber as sementes em água destilada (use uma placa de Petri pequena).

Germinar as sementes em Sphagnun umedecido, em banho-maria a 28o C, em sala climatizada (28oC).

➔ Bulbo ou sementes de cebola:

Colocar bulbos de cebola sobre um recipiente contendo água, para germinação das raízes ou germinar sementes como no ítem a.

Cortar as raízes com 1 cm e tratá-las com solução aquosa de colchicina 0,1%, durante 5 horas em temperatura ambiente (26 - 28 oC).

➔ Estacas de Passiflora:

Para a obtenção de um grande número de raízes para a rotina de trabalho as estacas são cultivadas em copos de plásticos contendo o substrato Plantmax composto de vermiculita, turfa e cascas vegetais processadas, e após 15 a 20 dias as primeiras raízes emergentes são coletadas. As estacas são desenvolvidas em telado.

Pré-Tratamentos de raízes

Milho: Após 2-3 dias, coletar raízes, com 1 cm de comprimento em:

Hidroxiquinolina a 300ppm (0,03%), por 2:30 horas ou

Hidroxiquinolina a 600ppm + Cicloheximida a 6,25 ppm, por 2:30 horas (Concentração final da solução : H a 300ppm + C a 3,12ppm).

Passiflora: Após 15 a 20 dias as primeiras raízes emergentes são coletadas em Hidroxiquinolina a 600 ppm + Cicloheximida a 6,25 ppm, por 2:30 horas (Concentração final da solução: H a 300ppm + C a 3,12 ppm).

Cebola: Cortar as raízes com 1 cm e tratá-las com solução aquosa de colchicina 0,1%, durante 5 horas em temperatura ambiente (26 - 28 °C).

Fixação

Transferir as raízes para fixador de Carnoy (3 partes em álcool etílico absoluto: 1 parte de ácido acético glacial P.A) deixando pernoitar em temperatura ambiente .

Transferir o material para álcool a 70% (duas trocas) e manter em geladeira (para coloração pelo método de Feulgen).

Coloração pelo método de Feulgen

- 1.Retirar o material (raízes conservadas em álcool a 70%) da geladeira com antecedência, deixando atingir a temperatura ambiente.
 - 2.Lavar as raízes em água destilada por 5 minutos.
 - 3.Hidrólise Ácida: colocar o material em HCL 1 N, 60°C durante 8 minutos.
 - 4.Lavar o material em água destilada por 5 minutos.
 - 5.Colocar as raízes em Reativo de Schiff, em frascos escuros, tampados. Conservar o frasco em ambiente escuro, deixando corar por 45 minutos.
 - 6.Lavar as raízes em água corrente, por 10 minutos.
-

