

# LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

## ESPERIENZA: LA DIVISIONE CELLULARE - LA MITOSI

### Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
  - L'enzima
  - Il substrato
  - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
  - Scheda per lo studente
- Come elaborare i dati
- Bibliografia/sitografia

### OBIETTIVO:

IDENTIFICARE E RICONOSCERE I VARI STADI DEL PROCESSO DI DIVISIONE CELLULARE UTILIZZANDO DIVERSI METODI DI COLORAZIONE

## INTRODUZIONE

Una delle caratteristiche degli organismi viventi è la loro capacità di replicarsi e di trasferire l'informazione genetica alle nuove generazioni. La divisione cellulare nelle piante avviene in regioni particolari, chiamate meristemi apicali. Le cellule in queste regioni non sono specializzate e si dividono ripetutamente per mitosi.

Dal momento che in queste regioni è alto il numero di cellule in mitosi si potranno osservare i diversi stadi della mitosi.

Le cellule meristematiche hanno forma isodiametrica, con pareti sottili, sono povere di cellulosa e disposte verticalmente le une rispetto alle altre. L'interno della cellula è pieno di un denso protoplasma, con un nucleo grande.

Nel meristema apicale si possono distinguere file di cellule (linee cellulari) che grazie all'attività mitotica incessante vengono spinte verso l'alto sviluppandosi lungo la radice e arrivando fino alla zona di struttura primaria. La crescita dell'apice radicale è molto uniforme e non è soggetta a modificazioni morfologiche periodiche come avviene invece nell'apice del germoglio; infatti, la formazione dei primordi laterali (radici laterali) si ha in una zona distante dal meristema, contrariamente a quanto avviene nel fusto.

La zona di differenziazione si trova in contiguità con l'apice meristemato e termina in corrispondenza della zona di struttura primaria. Si estende per qualche millimetro ed è quindi più estesa rispetto all'apice meristemato. Analogamente a quanto accade nel fusto le cellule in questa zona vanno incontro ad una progressiva differenziazione.

### I coloranti per il DNA

Sono diversi i coloranti utilizzati per evidenziare il DNA durante il processo della mitosi: tra i più comuni e semplici da usare possiamo citare

- carminio acetico, una soluzione acida del colorante carminio, ottenuto dalla cocciniglia, un insetto della specie *Dactylopius* (in particolare si estrae dal carapace dell'insetto: per ottenere 1 kg di colorante sono necessari circa 100000 insetti). La formula chimica del colorante è  $C_{22}H_{20}O_{13}$
- Orceina, ottenuta per ossidazione con perossido di idrogeno dell'orcino, un composto organico fenolico contenuto in licheni dei generi *Roccella*, *Licanova* e *Vacuolaria*. La sua formula chimica è  $C_{28}H_{14}N_2O_7$ .
- Fucsina basica o rasanilina cloridrato, la cui formula è  $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$

Saranno questi i coloranti che utilizzeremo sia nella esperienza di base che in quella implementata. Hanno tutti una alta affinità per il Dna, composto acido.

### L'idea portante dell'esperimento

Grazie alle tecniche di colorazione specifiche per il DNA si possono visualizzare i cromosomi nelle varie fasi della mitosi e i nuclei nelle fasi del ciclo cellulare. Si cercherà di ritrovare nei vetrini osservati quante più fasi possibili, per ricostruire il processo studiato in teoria. Si cercherà di raccogliere immagini per illustrare i vari stadi, in modo da costruire una sorta di atlante a complemento di quanto studiato precedentemente. A seconda della bontà del risultato ottenuto, si potrebbe anche cercare di calcolare l'indice mitotico e la percentuale di cellule nei vari stadi della mitosi.

## LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

### Reagenti

- Acido acetico glaciale  H314-216, P 280-301+330+331
- Etanolo 96%  H 225, P210
- Carminio Red
- Acqua distillata
  
- Acido acetico glaciale  H314-216, P 280-301+330+331
- Acido cloridrico  H 280-314-331, P 261-280-305+351+338
- Orceina
- Fucsina basica
- Bisolfito di sodio  H302, P264,270,310+312-305+351+338-330
- Acqua distillata
  
- Cipolla/aglio/germogli porro..

### Strumenti/vetreria

- Bagno termico
- Microscopio
- Bisturi, pinzette
- Becher , 250 mL
- Vetrini porta oggetto/ vetrini copri oggetto
- Becher 50 mL
- Capsule Petri

#### **“Reazione di Feulgen-colorazione con fucsina basica “**

*E' una reazione istochimica che mette in evidenza il DNA con un colore magenta. L'idrolisi, in stufa a 60°C, avviene con HCl 1N e la sua durata varia a seconda del fissativo precedentemente usato, dal tipo di tessuto e dalla specie animale. Questo è, infatti, il punto critico della reazione perchè con l'idrolisi a caldo si verifica la separazione delle basi puriniche, con conseguente formazione di gruppi aldeidici, colorati con il reattivo di Schiff in magenta. Se l'idrolisi, però, viene prolungata vengono allontanati anche gli istoni e gli acidi apurinici aumentando così la reazione nel liquido di idrolisi e facendo apparire i cromosomi sempre meno colorati. Questa reazione è altamente specifica perchè non si conosce nessuna altra sostanza cellulare, in queste condizioni, capace di formare un composto colorato con il reattivo di Schiff.”*

<http://www.istologia.unige.it/page1/page31/page31.html>

## SCHEDA PER LO STUDENTE

### La divisione cellulare: mitosi

#### MATERIALE

La preparazione delle due soluzioni va fatta sotto cappa. Indossare guanti, proteggere gli occhi.

#### STRUMENTAZIONE E VETRERIA

#### PROCEDIMENTO

#### Procedura 1

- Acido acetico glaciale   H314-216, P 280-301+330+331
- Etanolo 96%  H 225, P210
- Soluzione di carminio acetico
- Acqua distillata

#### Procedura 2

- Acido acetico glaciale   H314-216, P 280-301+330+331
- Acido cloridrico    H 280-314-331, P 261-280-305+351+338
- Soluzione di Orceina acetica
- Acqua distillata
- Cipolla/aglio

#### Procedura 3

- Acido acetico glaciale   H314-216, P 280-301+330+331
- Etanolo 96%  H 225, P210
- Reattivo di Schiff

- Bagno termico
- Microscopio
- Bisturi, pinzette
- Becher , 250 mL
- Vetrini porta oggetto/ vetrini copri oggetto
- Becher 50 mL
- Capsule Petri

Ogni gruppo sceglie una o l'altra procedura per il fissaggio e la colorazione degli acidi nucleici.

Il tecnico di laboratorio fornisce ai vari gruppi apici radicali di cipolle, di aglio, di germogli di porro.. per l'esperimento

## SCHEDA PER LO STUDENTE

### La divisione cellulare: mitosi e meiosi

La preparazione delle soluzioni  
va fatta sotto cappa. Indossare  
guanti, proteggere gli occhi.

#### Procedura 1

- Si prepara sotto cappa la soluzione fissatrice, miscelando acido acetico glaciale ed etanolo in proporzione 3:1
- Si riempie il becher piccolo con la soluzione fissatrice e si immettono gli apici radicali. Si lasciano gli apici a bagno per 24 ore.
- Si prelevano gli apici, si spostano in un'altra provetta contenente il carminio acetico, si riscalda per 5 minuti a bagno maria ( a 90°C)
- Si toglie un apice dalla soluzione colorante, lo si deposita su un vetrino e si taglia la parte vicino all'apice, allontanando il resto
- Si prende un vetrino coprioggetto, lo si pone sopra il frammento di apice, lo si copre con un pezzettino di carta assorbente e si preme, schiacciando l'apice.
- Si pone il vetrino sotto il microscopio e si osserva il preparato, cercando le cellule in mitosi.

#### Procedura 2

- Prendere gli apici radicali consegnati dal tecnico e porli in una soluzione di acido acetico ( in un piccolo becher) per una decina di minuti
- Nel frattempo, riscaldare a 60°C una ventina di mL di acido cloridrico 1M.
- Lavare gli apici in acqua fredda per 4-5 minuti ed asciugarli su carta da filtro.
- Trasferire gli apici nel becher contenente HCl e lasciarli riposare 5 minuti
- Lavare di nuovo gli apici e asciugarli
- Sistemare un apice su un vetrino, tagliare l'estremità a 2 mm massimo, scartare il resto.
- Aggiungere una goccia di soluzione colorante (orceina) e lasciar riposare 2 minuti
- Coprire il preparato con un vetrino coprioggetto, premere per schiacciare l'apice.
- Osservare al microscopio il preparato, cercando le cellule in mitosi.

#### Procedura 3

- Prendere gli apici radicali consegnati dal tecnico e
- Fissarli con alcol etilico e acido acetico 3:1 per 1 h
- Risciacquare con acqua fredda
- Idrolisi in acido cloridrico 1N a 60°C per 6 minuti
- Colorazione con reattivo di Schiff al buio per circa 1 h

SCHEDA PER LO  
STUDENTE

- Risciacquare con soluzione solforosa in una provetta ( 3 cambi di due minuti ciascuno )
- Risciacquo con acqua distillata nella capsula Petri
- 
- Per prelevare gli apici radicali della plantule, montarli in acido acetico 45% e con un bisturi separarli da tutto il resto
- Porre l'apice tagliato su un vetrino e coprirlo con il vetrino coprioggetto
- Eseguire lo schiacciamento prima ruotando con il dito e poi picchiettando
- Osservare al microscopio

Il reattivo di Schiff si prepara facendo sciogliere della fucsina basica in acqua bollente; il liquido rosso ottenuto viene fatto decolorare aggiungendo HCl e bisolfito di sodio. Il bisolfito in ambiente acido libera anidride solforosa che decolora la fucsina basica.

L'idrolisi serve a staccare dal DNA le basi puriniche e contemporaneamente nei siti in cui si sono staccate le basi puriniche si formano dei gruppi aldeidici, per i quali il reattivo di Schiff è un colorante specifico.

---

## COME ELABORARE I DATI

---

Per quanto riguarda il riconoscimento delle varie fasi della mitosi, si possono raccogliere immagini di cellule in profase, metafase, anafase e telofase o cellule in citodieresi e provare a sistamarle in sequenza.

Si può provare a calcolare l'indice mitotico, ricavabile dalla formula

$$\text{Indice Mitotico} = \frac{\text{numero di cellule in divisione nel campo visivo}}{\text{numero totale di cellule nel campo visivo}}$$

Altro dato che può essere ottenuto è la percentuale di cellule che si trovano in interfase, profase, metafase, anafase e telofase.

---

**BIBLIOGRAFIA / LINK DI RIFERIMENTO**

---

[http://media.collegeboard.com/digitalServices/pdf/ap/bio-manual/Bio\\_Lab7-CellDivisionMitosisandMeiosis.pdf](http://media.collegeboard.com/digitalServices/pdf/ap/bio-manual/Bio_Lab7-CellDivisionMitosisandMeiosis.pdf)

[http://www.csdim.unical.it/scienzeformazione/programmi/ultima\\_parte.pdf](http://www.csdim.unical.it/scienzeformazione/programmi/ultima_parte.pdf)

[https://www.ifom.eu/media/PDF/conoscere-la-scienza/vivi-la-ricerca/provaci-tu!/botanica/microscopia-vegetale/web\\_cipolla\\_apici\\_radicaliys.pdf](https://www.ifom.eu/media/PDF/conoscere-la-scienza/vivi-la-ricerca/provaci-tu!/botanica/microscopia-vegetale/web_cipolla_apici_radicaliys.pdf)

<http://www.istologia.unige.it/page1/page31/page31.html>