

AJOS Y CEBOLLAS COMO DETECTIVES DE TOXICIDAD: Las alteraciones de la división celular muestran fácilmente sustancias tóxicas.

Definición, objetivo y recomendaciones previas.

Los tejidos de un organismo crecen gracias al proceso de **división celular**, en el que una célula duplica su material genético y el contenido del citoplasma y se divide en dos células genéticamente idénticas entre sí e idénticas a la célula de la que se originaron. En las plantas, los tejidos donde sucede la división celular se denominan **meristemos**. En este trabajo se observarán meristemos de raíz.

El **objetivo** del trabajo es evaluar las posibles alteraciones de la división celular y efectos clastogénicos (roturas cromosómicas) producidos por diversas sustancias de uso común.

Los alumnos aprenderán el **método científico** planteando una hipótesis que pueda ser puesta a prueba experimentalmente; asimismo aprenderán la importancia del **diseño de un experimento científico**, asegurando minuciosamente la comparación de tratamientos y controles. Obtendrán **los resultados y los analizarán comparativamente**. Si el nivel de conocimientos es suficiente, los datos se analizarán estadísticamente.

Posteriormente deberán **redactar un pequeño artículo científico** que conste de resumen, introducción, material y métodos, resultados, discusión y bibliografía.

El conocimiento de la división celular es importante porque constituye la base de la reproducción en organismos unicelulares y del crecimiento en pluricelulares, pero a nivel práctico también es importante porque es objeto recurrente de preguntas en la EvAU.

En Internet existen multitud de recursos con figuras y vídeos sobre la división celular, pero hay que tener cuidado porque muchos contienen errores o imprecisiones. Se recomiendan los libros de texto de Puertas (1999) y Benito y Espino (2012) que explican correctamente el proceso de división celular.

Aunque la división celular es muy semejante en vegetales y animales en lo que a la duplicación y reparto del material genético se refiere, existen diferencias importantes (pared celular, huso mitótico, citocinesis, etc.) que impiden extrapolar los resultados obtenidos en células vegetales a lo que pueda ocurrir en células animales. En este trabajo se observarán vegetales porque es mucho más sencilla la manipulación de plantas y la observación de células vegetales en el laboratorio. Sin embargo, debe hacerse notar a los alumnos que los resultados que se obtengan en estos experimentos no pueden aplicarse directamente a células animales, aunque cualquier sustancia que altere la división celular vegetal, es sospechosa de afectar también a nuestras células.

Se indican varias posibilidades de experimentación y análisis para que el profesor pueda decidir cuáles puede llevar a cabo dependiendo del curso de impartición, la dotación del laboratorio del que disponga y su propia experiencia en trabajo de microscopía.

Material vegetal

Se emplearán raíces de bulbos de cebolla (*Allium cepa*) de la variedad francesa (cebolillas pequeñas) o dientes de ajo (*Allium sativum*) por su facilidad de obtención, manipulación y observación. Ambas especies poseen $2n=16$ cromosomas de tamaño grande, fácilmente observables por el microscopio.

Es muy importante que los ajos o cebollas que se adquieran no hayan sido sometidos a tratamientos de conservación. Generalmente este material, que germina fácilmente, se somete a tratamientos inhibidores que impiden el crecimiento de tallos y raíces, para aumentar su duración en el mercado, por lo que no se pueden usar en este experimento. Se deben adquirir productos ecológicos sin tratamiento o, mejor aún, acudir al agricultor que venda directamente su producto. Algunas hortalizas, a pesar de estar etiquetadas en el supermercado como ecológicas o *bio*, están tratadas con inhibidores y crecen mal. El profesor deberá comprobar la capacidad germinativa del material y determinar los días que tardan en brotar las raíces en las condiciones de su laboratorio antes de comenzar el experimento con los alumnos. En caso contrario el experimento fracasará por completo porque no brotarán raíces o brotarán insuficientes para llevar a cabo las mediciones.

En lo que sigue me referiré a dientes de ajo, que son más baratos y requieren menos espacio que las cebollitas.

Material de laboratorio

Para experimentos sin observación microscópica.

Agua destilada o agua mineral natural.

Gradillas y tubos de ensayo adecuados a las gradillas de unos 15 ml de capacidad (no es necesario que sean estériles). *Figura 1*

Cámara de cultivo a 25°. No es imprescindible, el experimento se puede realizar en condiciones ambientales.

Rotulador resistente al agua de punta fina.

Tubos eppendorf de 2 ml de capacidad (no es necesario que sean estériles) y gradilla de su tamaño. *Figura 2*

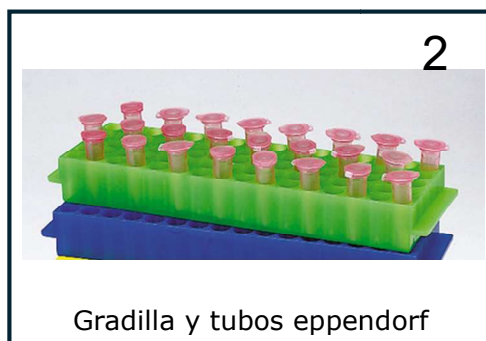
Tijeras pequeñas finas de punta recta y pinzas rectas de punta fina. *Figura 3*

Papel de filtro o toallas de papel blanco sin dibujos

Papel milimetrado

Etanol de 96°

Frigorífico para guardar las muestras.



Para experimentos con observación microscópica, además de lo anterior es necesario:

Etanol absoluto o de 96º y ácido acético en proporción 3 etanol :1 acético. Esta mezcla es mejor que la prepare el profesor, ya que el ácido acético puede producir quemaduras y molestias respiratorias (leves) si no se maneja con cuidado. Si van a manejarla los alumnos es mejor que utilicen guantes (los alumnos suelen disfrutar poniéndose guantes de laboratorio). Se guarda la solución en un frasco con gotero. *Figura 4*. Cada alumno va a necesitar al menos 5 ml de esta solución.

Guantes de nitrilo de laboratorio.

Papel de aluminio.

Lancetas de laboratorio, a ser posible con mango de madera. *Figura 3*

Hojas de bisturí.

Portas y cubres de 22x22.

Mechero de alcohol. *Figura 4*. Aunque es más caro, es mejor emplear alcohol de 96 en el mechero, pues el alcohol de quemar desprende olor desagradable, que puede llegar a marear. Los alumnos con pelo largo deben retirarse el cabello pues podrían llegar a prendérselo con el mechero de alcohol.

Para la tinción se puede emplear orceína acética, carmín acético o hematoxilina acética 1% que se pueden comprar ya preparados.

Ácido clorhídrico HCl 5N (no es imprescindible).

Microscopio óptico binocular con objetivos de 10x y 40x.

Lo ideal es que el microscopio óptico disponga de una cámara de fotos acoplada, pero se pueden obtener fotos aceptables haciendo las fotos con la cámara del teléfono móvil acoplada al ocular.



Sustancias propuestas para evaluar

El objetivo del trabajo es evaluar los posibles efectos sobre la división celular de sustancias de uso común. Para ello se necesita en primer lugar agua destilada o agua mineral natural para el control.

Se puede evaluar agua recogida de un río, tomando muestras de agua en dos o tres tramos del río para comparar posibles diferencias entre ellos. Es posible que el agua recogida en el tramo alto no altere la división celular mientras que el agua contaminada del río en tramos bajos sí que la altere. Combinar la toma de muestras de agua de río con una excursión para observación de plantas, animales o elementos geológicos, puede ser una buena actividad.

También interesa a los alumnos evaluar bebidas que ellos consuman, como Coca Cola, Red Bull etc. En mi experiencia la Coca Cola no altera la división, aunque tiñe los cromosomas, mientras que algunas falsas cocacolas de imitación sí que la alteran.

Los estudiantes pueden sugerir otras sustancias, aunque siempre deben tener en cuenta datos precisos. Por ejemplo, si se evalúa café habrá que prepararlo midiendo con exactitud la cantidad, modo de hacerlo, etc.

Dependiendo del número de alumnos que vayan a hacer el experimento, se pueden medir una o varias sustancias. Lo más seguro es emplear una sola sustancia con su control para que haya más datos comparables.

Crecimiento y tratamientos

En el presente guión me referiré a un experimento realizado con dientes de ajo tratados con Red Bull.

El siguiente proceso se realiza igual para los experimentos con o sin estudio microscópico.

Si se utilizaran cebollitas se les deben cortar todas las raíces secas e incluso raspar un poco la zona de crecimiento de las raíces para facilitar el crecimiento de raíces nuevas.

Se abre con cuidado la cabeza de ajos para separar los dientes y se colocan en los tubos con agua, con cuidado de que sea la parte donde van a crecer las raíces las que estén en contacto con el agua. *Figura 5*. Debemos asegurarnos de que la zona donde van a crecer las raíces esté bien empapada en el agua.

Aproximadamente 2 días después las raíces habrán alcanzado la longitud adecuada para transferirlos a la sustancia que se va a analizar. *Figura 6*. No todas las raíces crecen simultáneamente, el tratamiento se puede empezar cuando las raíces más largas tengan unos 1,5-2cm de longitud. Debe tenerse en cuenta que si las raíces se dejan crecer demasiado se observarán menos divisiones celulares.

Si no se dispone de gradillas, cada estudiante puede fabricar gradillas caseras en cajas de plástico transparente agujereando la tapa al tamaño adecuado, lo que también es formativo. Las cajas de bombones Ferrero Rocher son estupendas para ello.



Es conveniente que se inicie el experimento con más dientes de ajo de los estrictamente necesarios, porque es fácil que se estropeen algunos en el proceso. Se dispondrán al menos 4 dientes de ajo para cada estudiante para asegurarse de que haya material suficiente. Cada estudiante debe estudiar el control con el que va a comparar el tratamiento, para evitar diferencias de criterio de unos estudiantes a otros. Posteriormente también se pueden comparar los datos de unos y otros alumnos para recalcar la importancia de la toma cuidadosa de los datos.

A continuación, dividimos los ajos en dos grupos, los que van a seguir creciendo en agua y los que vamos a transferir a la sustancia que vamos a evaluar, en este ejemplo Red Bull.

Marcamos con el rotulador resistente al agua los tubos donde crecen los ajos control y los ajos tratados. Es conveniente que cada alumno trabaje con al menos 2 ajos control y 2 tratados. Para mayor seguridad podemos incluir en cada tubo un cartelito pequeño de cartulina fina blanca escrito con lápiz con los datos del ajo (control o tratado) y el nombre del alumno (Figura 8).

Si el laboratorio dispone de una cámara de cultivo, se pondrán las gradillas en la cámara a 25°C con 12 h de luz y 12 de oscuridad. Si no se dispone de cámara de cultivo se dejarán las gradillas en condiciones ambientales, pero con cuidado de que todos los tubos estén en condiciones lo más parecidas posibles; por ejemplo, que una parte de los tubos no reciban calefacción ni luz del sol directa, etc.

Tanto el agua del control como la sustancia a evaluar deben renovarse diariamente.

Si la sustancia a evaluar contiene gas, como el Red Bull, deben eliminarse las burbujas lo más posible, porque a veces la fuerza del gas empuja hacia arriba y saca el diente de ajo del tubo. Además, el volumen ocupado por el gas es grande y al disiparse se pueden quedar las raíces fuera del líquido y secarse.

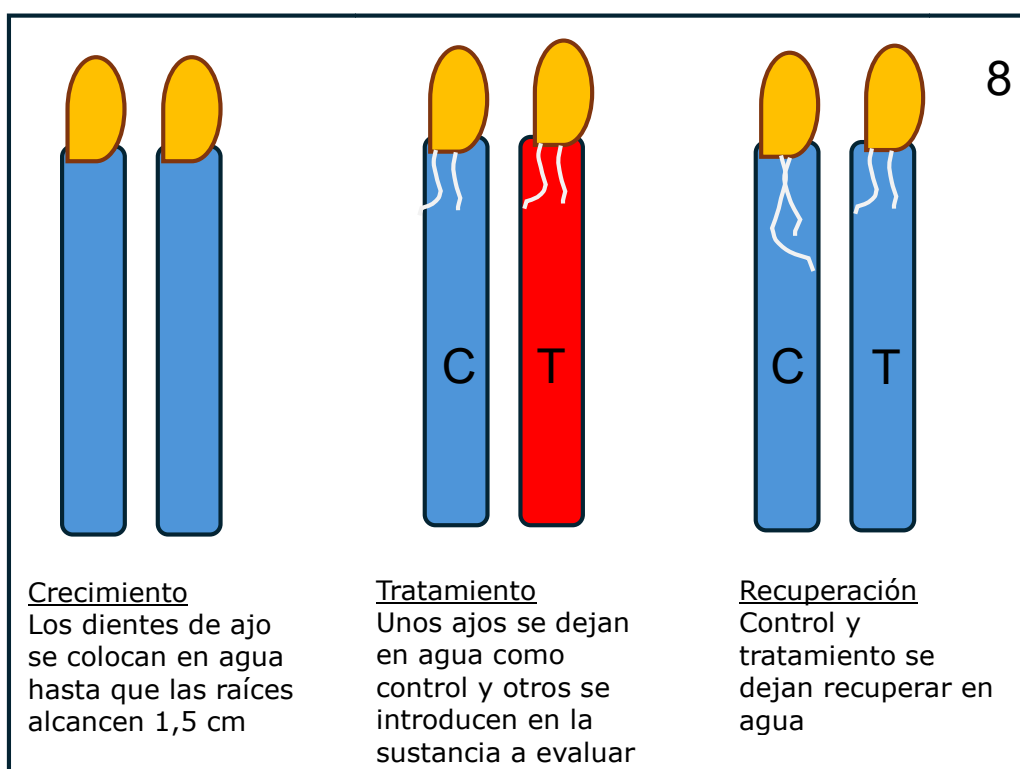
Después de un día de tratamiento se elimina el Red Bull y se vuelven a poner los ajos para recuperar en agua. Esta recuperación es esencial porque a nivel microscópico no se pueden observar los posibles daños cromosómicos en el momento en el que se producen, sino que se observan sus consecuencias en la siguiente división celular. Por ejemplo, si se

produce una rotura cromosómica durante la replicación del ADN, no se observará en ese momento, sino que se hará visible como fragmento cromosómico en la siguiente división.

Si los ajos germinan correctamente, esta fase de crecimiento y tratamientos dura aproximadamente 5 días, así que se puede empezar el lunes, hacer los tratamientos el miércoles, recuperar el jueves y recoger las raíces el viernes. Según el esquema que se muestra en la *tabla 1* y *Figura 8*. Sin olvidarse de renovar diariamente el líquido en el que crezcan las raíces.

Tabla 1 Esquema del experimento.

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Ajos control en agua	Ajos control en agua	Ajos control en agua	Ajos control en agua	Fijar raíces en 3:1
Ajos para tratamiento en agua	Ajos para tratamiento en agua	Ajos en sustancia a estudiar	Ajos tratados en agua	Fijar raíces en 3:1



Cuando termina el proceso se deben cortar con tijeras y completamente al ras todas las raíces de cada ajo y ponerlas con las pinzas en tubo eppendorf que marcaremos igualmente.

Se recogerán todas las raicillas de cada diente de ajo con las pinzas, secándolas levemente en papel de filtro, colocando todas las raicillas del mismo diente de ajo en el mismo tubo eppendorf de 2 ml y se rellenarán con, aproximadamente, 1,5 ml de etanol:acético 3:1 para el estudio con microscopio o con etanol de 96º si sólo se va a medir la longitud de las

raicillas. Asegurarse de que las raíces se quedan totalmente sumergidas. Marcar los tubos eppendorf con el rotulador en la tapa, colocarlos en una gradilla y guardarlos en frigorífico. Es mejor envolver la gradilla en papel de aluminio para evitar que se extienda el olor a acético por el frigorífico.

Cada tubo debe estar marcado con el nombre del estudiante y el tipo de experimento. Para mayor seguridad, además de la marca en la tapa, se puede introducir en el eppendorf un cartelito escrito con lápiz indicando las raíces que contiene.

En ambos casos los tubos se guardan en frigorífico a 4º donde pueden conservarse varios meses, incluso de un curso al siguiente.

Es muy conveniente que el profesor haga una prueba de la duración del experimento en las condiciones de su laboratorio antes de comenzar con los alumnos.

Medición de la longitud de las raíces

Muchas veces se produce una diferencia de crecimiento en la longitud de las raíces visible a simple vista entre el control y el tratamiento, como en el caso de las raíces tratadas con Red Bull. *Figura 7.*

En caso de que las raíces estén guardadas en etanol de 96º, cada alumno tomará con las pinzas las raíces de una en una, las secará un poco con papel de filtro y la colocará sobre papel milimetrado para medir la longitud alcanzada.

Anotará los datos y obtendrá la longitud media de las raíces de los ajos tratados y los controles. El número de raíces varía de unos ajos a otros, es suficiente con medir 4 raíces por cada diente de ajo. Todos los alumnos deben ponerse de acuerdo, por ejemplo, para elegir las 4 raíces más largas de cada tubo.

Se puede seguir el ejemplo de la *tabla 2*:

Tabla 2. Longitud de las raíces en milímetros

	Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3	Raíz 4	Valor medio
Ajo 1 control					
Ajo 2 control					
Ajo 1 tratado					
Ajo 2 tratado					

Si no se va a realizar análisis microscópico, las raíces estarán guardadas en etanol y se desecharán después de medirlas.

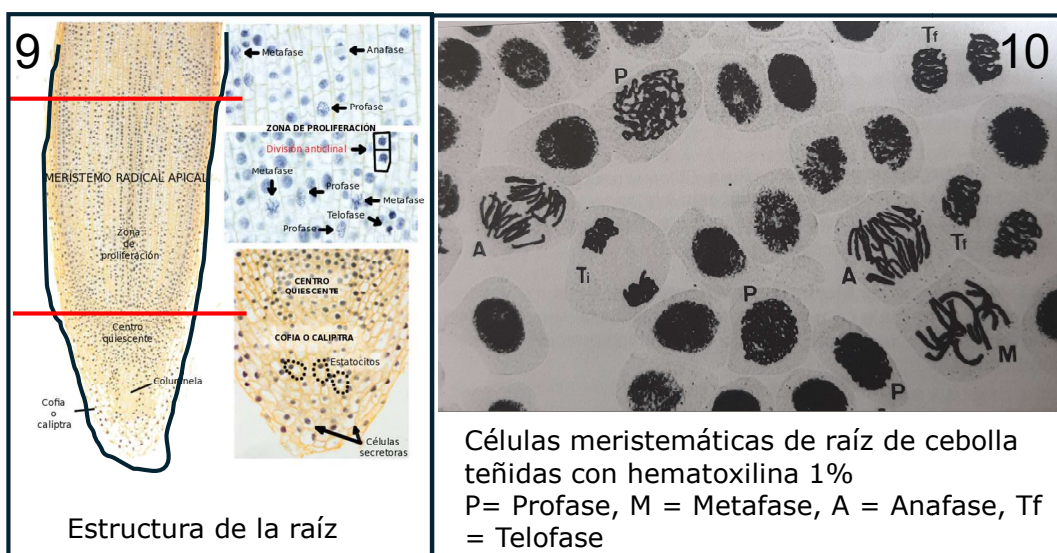
Si se va a realizar posteriormente el análisis microscópico, las raíces estarán guardadas en 3:1. Se sacarán las 4 raíces a la vez (para no medir dos veces la misma raíz), se secarán un poco en papel de filtro, se pondrán rápidamente en papel milimetrado, se medirán y se volverán a meter en el eppendorf con 3:1. Es muy importante realizar la medición muy

rápidamente para que las raíces no se sequen, por lo que es conveniente hacer esto por parejas. Uno apunta medidas y el otro maneja los tubos.

Los alumnos también pueden hacer fotos con su móvil poniendo los ajos sobre fondo oscuro para que se destaquen las raíces, como en la figura 7, para ilustrar los resultados con figuras.

Después compararán la longitud media de las raíces tratadas y los controles. El tipo de comparación dependerá del nivel académico de los alumnos, para hacer t de student, análisis de varianza o sencillamente ver a ojo la diferencia entre las medias de longitud de las raíces. Los alumnos analizarán sus propios datos y los del conjunto de todos los alumnos. Incluso se pueden analizar las diferencias entre las medidas tomadas por diferentes alumnos, lo que también es ilustrativo sobre lo que pueden llegar a influir las diferencias de criterios de observación.

El experimento realizado con Red Bull muestra que esta bebida prácticamente detiene el crecimiento de las raíces, por lo que es un buen ejemplo para realizar en clase (*Figura 7*).



Observación microscópica

Es importante que el profesor tenga experiencia en la realización de preparaciones para poder ayudar a los alumnos, porque no es fácil realizarlas bien.

Para mejorar la calidad de las preparaciones es conveniente lavar las raíces en agua destilada, introducirlas en una solución de HCl a concentración 5N durante 20 minutos y lavarlas nuevamente en agua destilada antes de iniciar la preparación. Este paso ablanda la raíz y mejora la tinción.

El HCl concentrado es peligroso, por lo que en ningún caso deben utilizarlo los alumnos. El profesor deberá dárselo preparado. O bien se puede eliminar este paso, aunque las preparaciones salgan un poco peores.

Se toma con las pinzas una raíz del tubo eppendorf y se coloca sobre el porta. Se apunta en el porta la procedencia de la raíz (control o tratamiento). Se observa que la raíz tiene una parte con el blanco más intenso y opaco, que corresponde al meristemo (*figura 9*). Con el bisturí o la lanceta se corta todo lo que no sea meristemo, se intenta eliminar la cofia y sobre todo se elimina la parte elongada más transparente.

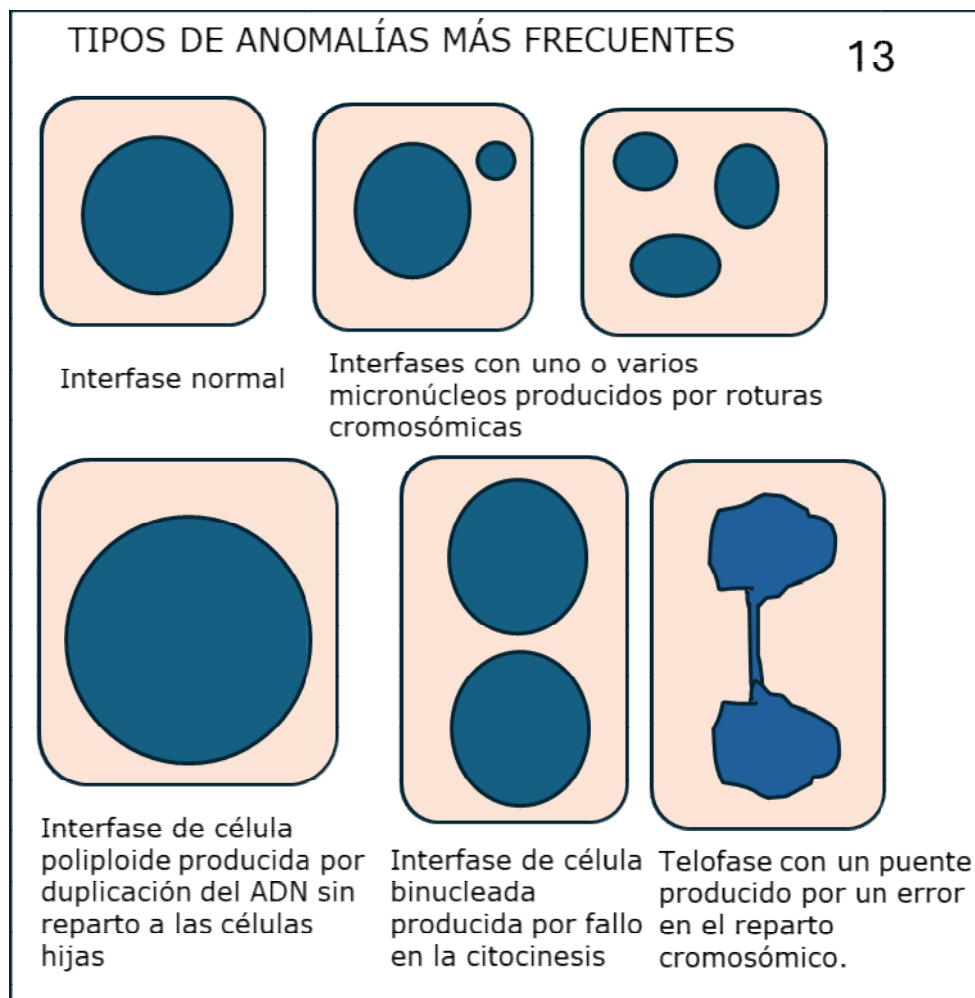
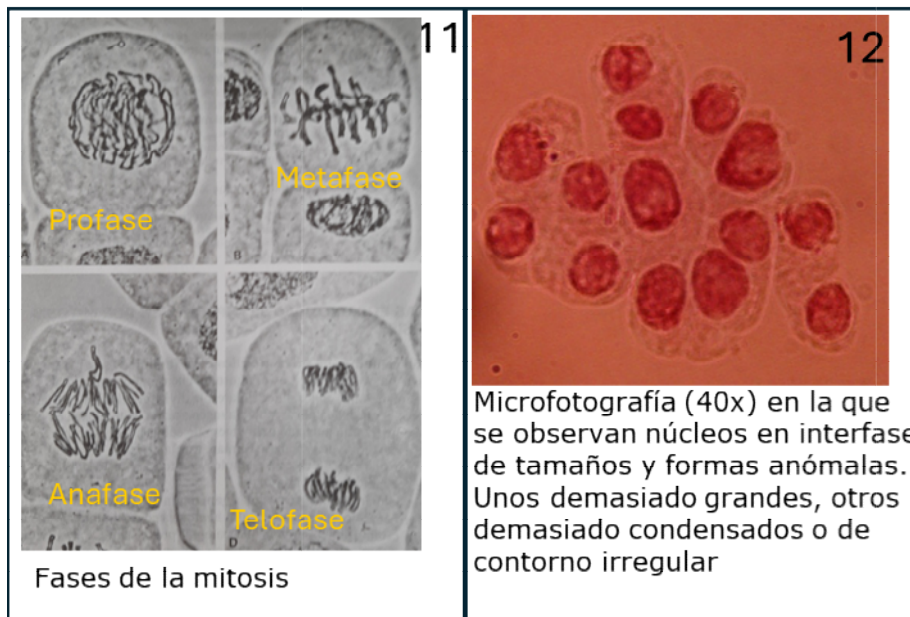
Hay que convencer al alumno de que se necesita muy poco material. Los alumnos tienden a poner demasiado, lo que hace que se vean células amontonadas, imposibles de analizar y que además se introduzca aire entre porta y cubre, lo que también arruina la preparación.

Una vez tenemos en el porta el trocito de meristemo le ponemos una gota pequeña de carmín acético. Cortamos con el bisturí el trocito de meristemo en partes lo más pequeñas posibles y procedemos a calentar la gota muy poco a poco en la llama del mechero de alcohol (atención, los cabellos largos deben estar recogidos). No debe hervir. Con paciencia pasamos el porta varias veces por la llama cuidando de no inspirar los vapores de acético que se desprenden al calentarlos. Si la gota de carmín acético se hace muy pequeña podemos añadir otra gota, pero siempre poca cantidad. Ponemos el cubre y aplastamos con el mango de la lanceta dando golpecitos para que el material se disgregue lo más posible sin que el cubre se rompa ni se deslice sobre el porta. Podemos sujetar con un dedo (con guantes) una esquina del cubre para que no resbale. Tenemos en cuenta que las células no deben estar rotas ni amontonadas. Después secaremos el exceso de colorante aplastando con fuerza la preparación dentro de una almohadilla de papel de filtro. El ideal es que las células queden como en las *figuras 10, 11*. Obviamente, no saldrá al primer intento, pero a la tercera o cuarta preparación ya debe salir la preparación con la suficiente claridad como para permitir hacer el recuento.

Buscaremos una zona de la preparación que sea adecuada con el objetivo de 10x y haremos el recuento con el de 40x, con cuidado de no pasar más de una vez por la misma zona.

Contaremos unas 150-200 células contando interfases, profases, metafases y anafases + telofases (a veces no es fácil distinguir entre ambas).

La evaluación de los posibles daños cromosómicos se realizará tanto en mitosis (puentes anafásicos, roturas cromosómicas, formación de cromosomas con más de un centrómero, husos multipolares, etc.), como en interfase (células multinucleadas, micronúcleos) (*Figura 13*), haciendo el recuento del número de células anómalas frente a las normales en cada tratamiento. Se compararán los datos de las raíces tratadas con el control de células de raíces crecidas en agua destilada en las mismas condiciones de luz, aireación y temperatura.



Los datos de las observaciones se resumirán en tablas semejantes a estas:

Tabla 3 Número de células observadas en el control y en el tratamiento

	Nº total de células observadas	Interfase normal	Interfase con micronúcleos	Interfase multinucleada	Otras anomalías	Nº de células en mitosis
Raíz 1 control						
Raíz n control						
Raíz 1 Trat.						
Raíz n Trat.						

Tabla 4 Número de células observadas en mitosis en el control y en el tratamiento

	Nº de células en profase		Nº de células en metafase		Nº de células en anafase y telofase	
	Normal	Anómala	Normal	Anómala	Normal	Anómala
Raíz 1 control						
Raíz n control						
Raíz 1 Trat.						
Raíz n Trat.						

Se hará la descripción y fotos de las anomalías encontradas.
Datos de un experimento realizado con Red Bull.

El tratamiento 1 consistió en 48h de Red Bull y un día de recuperación. El tratamiento 2 consistió en 24h de Red Bull y 24h de recuperación.

	Interfase	Profase	Metafase	Ana/telofase	Total células
Control	108	28	12	4	152
Tratamiento 1	100				100
Tratamiento 2	141	11	6	6	164

Los alumnos pueden realizar múltiples análisis comparando los datos.
Índice mitótico= número de células en mitosis / número total de células

Índice de fase = número de células de cada fase/ número total de células en mitosis

Por ejemplo, el tratamiento 1 con 2 días de Red Bull fue muy agresivo para las células que detienen el crecimiento y además parece que van a degenerar como se observa en la *Figura 12*.

El tratamiento 2 permite la recuperación de las células, pero disminuye el índice mitótico, ya que pasa de 40,02 en el control a 17,06 en las tratadas

El profesor estimará los análisis adecuados, según los resultados obtenidos y el nivel académico de los alumnos.

Cuestiones para los alumnos

Para alumnos de Educación Primaria

¿Qué es un meristemo?

¿En qué otras partes de la planta, además de en las raíces, crees que hay meristemos?

¿Qué es lo que más te ha gustado hacer de un experimento científico?

¿Por qué decimos que este experimento es un experimento científico?

¿Cuáles han sido las mayores dificultades a las que te has enfrentado?

Si repitieras el experimento, ¿en qué puntos pondrías mayor atención?

Para los alumnos de ESO y Bachillerato

¿Has comprendido el método científico?

¿Cuál era la hipótesis que queríamos poner a prueba?

¿Te ha parecido sencillo diseñar el experimento?

¿Te han parecido concluyentes los resultados obtenidos? ¿Por qué?

Una vez analizados los resultados los alumnos deben escribir un pequeño artículo que contenga las partes tradicionales de un artículo científico: Título, Resumen, Introducción, Material y métodos, Resultados, discusión y bibliografía.

Recursos bibliográficos y de Internet

Benito, C., Espino, F.J. 2013 Genética. Conceptos esenciales. Editorial médica Panamericana ISBN-13. 978-8498354072 (ver Capítulo 4)

Guerra, M. 1999 Hematoxylin: a simple, multiple use dye for chromosome analysis. Genet. Mol. Biol. 22:77-80 (para la *figura 10*)

Puertas, M.J. 1999 Genética. Fundamentos y perspectivas. McGraw-Hill Interamericana ISBN-10 : 8476157983 (ver Capítulo 12, figura 12.1)

Mitosis under microscope

Imágenes y Videos que muestran las fases de la mitosis

<https://www.youtube.com/watch?v=5-ur7bWqIDQ>

Video que explica cómo hacer preparaciones de raíz de ajo de modo semejante a como se describen en este proyecto.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#inbox/QgrcJHsbcVCTFCwlzDKMSdZXQmXIWFnRpqB?projector=1>

Video que explica cómo hacer preparaciones de raíces de cebolla

<https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#inbox/QgrcJHsTnPsvTDwWmGSxNNkKLzHJKnxsMFg?projector=1>

Video muy interesante donde se observa la división celular en vivo. Célula vegetal, célula donde se ve el huso mitótico y célula animal, para comparar la diferencia entre la citocinesis vegetal y animal

<https://www.uam.es/uam/investigacion/cultura-cientifica/noticias/selectividad-division-celular>

Evalúan las preguntas sobre división celular en las pruebas de acceso a la universidad

Referencias de figuras tomadas de Internet

Las referencias a páginas web indican las páginas de donde se han copiado las imágenes. No son recomendaciones de los vendedores de esos productos.

Figura 1 Gradillas y tubos de ensayo

<https://megalada.com/items/Agujeros-2-Piezas-Pl-stico-Para-Laboratorio-O-Escuela/862493>

Figura 2 Gradilla y tubos eppendorf

<https://labotaq.com/producto/gradilla-80-tubos-eppendorf>

Figura 3

<https://www.girodmedical.es/tijeras-punta-fina-de-diseccion.html>
<https://www.auxilab.es/es/productos-laboratorio/pinza-punta-fina-105mm/>
<https://www.weboryx.com/es/equipamiento/material-de-campo-para-cientificos-profesionales-y-aficionados/entomologia-frascos-y-material-de-diseccion/lanceta-con-mango-metalico>

Figura 4

<https://quercuslab.es/mecheros-de-alcohol/552-mechero-de-alcohol.html>

Figura 9 Estructura de raíz

<https://mmegias.webs.uvigo.es/1vegetal/vimagenesgrandes/imagenes/meristemoprimario-todo.jpg>