

# METODOLOGÍA PARA EL PROCESAMIENTO DE TEJIDO VEGETAL EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Odelsa Ancheta, María Elena Ramos,  
María Cristina de la Rosa y Sandra Rodríguez

Laboratorio de Microscopía Electrónica. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.  
Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

## ABSTRACT

A modified method for processing plant tissue is proposed. The main changes are in the prefixation, infiltration and embedding steps, using low vacuum in the first one and a resin with low viscosity for the others. This method allows us to obtain good results and a high percentage of repetitiveness.

**Key words:** low viscosity, repetitiveness, low vacuum, embedding

*Biotecnología Aplicada* 1996;13:195-196

## RESUMEN

Se propone una metodología para el estudio del tejido vegetal, donde se introducen modificaciones fundamentales a las técnicas utilizadas anteriormente. Estas modificaciones consisten en el uso de bajo vacío en el paso de prefijación y en el uso de resina de baja viscosidad en los pasos de infiltración y de inclusión. Esta metodología permite lograr resultados de calidad satisfactoria con una alta repetibilidad.

**Palabras claves:** baja viscosidad, repetibilidad, bajo vacío, inclusión

## Introducción

El estudio de las células de los vegetales ha tenido un avance lento, debido a las dificultades técnicas para su procesamiento, dadas las características de estos tejidos de ser duros, rígidos y poseer a nivel celular la pared de celulosa, la cual es una barrera para la penetración de los distintos reactivos que se utilizan.

Se estudiaron diferentes tejidos vegetales, como hojas de tabaco y tomate, utilizando los métodos conocidos de inclusión en resina Epón (1). Mediante el procesamiento de rutina los resultados fueron de muy baja calidad. Posteriormente para estudiar hojas de caña de azúcar se utilizó una combinación de resinas Araldita más Epón (2) y con este método se obtuvieron mejores resultados, pero fue muy difícil lograr repetibilidad.

Dadas estas circunstancias, hubo necesidad de desarrollar métodos de estudio de tejidos vegetales para microscopía electrónica de transmisión que nos permitieran obtener mejores resultados que los logrados hasta el momento. Para ello se modificaron los métodos de fijación y se introdujo la utilización de una resina de inclusión de baja viscosidad.

## Materiales y Métodos

### Metodología

El método se basa en lograr una buena penetración de las diferentes sustancias que se emplean en el procesamiento de tejidos duros con la utilización de bajo vacío en la prefijación y resinas de baja viscosidad en la infiltración e inclusión.

Todos los pasos de la metodología se realizaron en un local con temperatura de 20 a 22 °C y humedad relativa de 70 a 80 %. La temperatura de la es-

tufa de polimerización fue de 70 °C. Se utilizó la resina Spurr (3) por ser de baja viscosidad y penetrar con mayor facilidad en los tejidos vegetales. En el prospecto que trae el kit de resina se describen tres variantes de utilización. Recomendamos para estos tejidos la variante standard.

### Procedimiento

La muestra se procesó recién obtenida. Si fue transportada desde lugares distantes se conservó en atmósfera húmeda, lo que se logró colocando el material en una placa Petri con papel de filtro embebido en agua o envueltas en papel de filtro húmedo y colocadas en un sobre de nylon.

### Corte de la muestra

El corte se realizó en la zona afectada, la cual se seleccionó con una cuchilla o bisturí bien afilado. El corte se hizo lo más pequeño que el tejido específico permitió.

### Prefijación

Las muestras se colocaron en frascos pequeños con 3 mL de la solución prefijadora (glutaraldehído al 5 % en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4) y se introdujeron los frascos destapados en una desecadora a la que se le hizo bajo vacío durante los primeros 30 min. Después se guardó la desecadora en refrigeración (4 °C) y se conservó el vacío durante una noche (14-18 h).

### Lavado

Se lavaron las muestras varias veces en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4 por espacio de 8 h. (En este paso se puede dejar toda la noche a 4 °C).

1. Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:409.

2. Mollenhauer HH. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technol* 1964;39:1111.

3. Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969;26:31.

### Fijación

Las muestras se posfijaron en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1 % en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4 durante una noche (14-18 h).

### Lavado

Se hicieron lavados cortos con el mismo tampón por espacio de 30 min.

### Deshidratación

Se usó preferentemente acetona como agente deshidratante, ya que es más enérgico que los alcoholes. La deshidratación se hizo de forma escalonada, comenzando por acetona al 10 % y se va aumentando la concentración de acetona en pasos sucesivos de deshidratación (incrementos de 10 % en cada paso) hasta llegar a acetona absoluta.

El tiempo fue de 15 min en cada paso y en acetona absoluta 2 h con cambios cada 30 min.

La temperatura es 4 °C hasta acetona al 90 % y en acetona absoluta a temperatura ambiente.

### Infiltración

La infiltración se realizó a temperatura ambiente. Se comenzó con una mezcla de una parte de resina y tres partes de acetona durante 1,5 h, se cambió a una mezcla de resina y acetona a partes iguales durante 1,5 h. Posteriormente se pasó a una mezcla de tres partes de resina y una de acetona durante una noche.

Al día siguiente se sustituyó esta mezcla por resina pura y se dejó en ella durante una noche.

### Inclusión

La orientación de la muestra en las cápsulas de inclusión se hizo de acuerdo con el tejido o la zona del tejido objeto de estudio.

Se añadió a las cápsulas la resina de inclusión y se colocaron en la estufa a 70 °C durante 24 h para su polimerización.

## Resultados y Discusión

La ultraestructura del tejido vegetal se observó con nitidez y con un alto por ciento de buena conservación, lo cual no ocurre con los métodos utilizados con anterioridad a esta metodología (Figura 1).

En nuestros resultados se observó la pared celular con sus características bien delimitadas. Los núcleos presentaron claramente sus componentes cromatina y nucleolo, así como la doble membrana que los rodea. Los plastidios mostraron con muy buena definición sus sistemas de membrana, así como los gránulos que contienen. Las mitocondrias, el complejo de Golgi, el retículo endoplásmico y los ribosomas presentaron su morfología claramente definida. En las vacuolas se apreció el tonoplasto, así como su contenido (Figuras 2 y 3).

Con la utilización de esta metodología se obtuvo además una alta repetibilidad de los buenos resultados técnicos (4-7), lo cual no se logra aplicando los

métodos clásicos, que fueron diseñados fundamentalmente para estudiar el tejido animal.



Figura 1. Muestra de hoja de caña de azúcar procesada con el método de Mollenhauer. Se observa poco definidos los componentes celulares; p) pared; m) mitocondrias; t) tonoplastos y en) envoltura nuclear. 11 000 X.

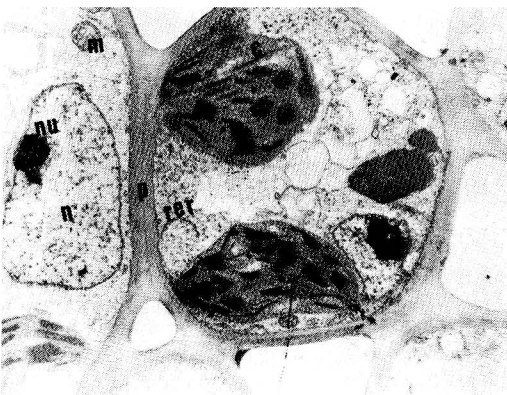


Figura 2. Muestra de hoja de caña de azúcar procesada por la metodología propuesta. Se observa buena conservación del tejido y definición de los componentes celulares; p) pared; m) mitocondrias; c) cloroplastos; n, nu) núcleo y nucleolo y rer) retículo endoplásmico rugoso. 9 000 X.

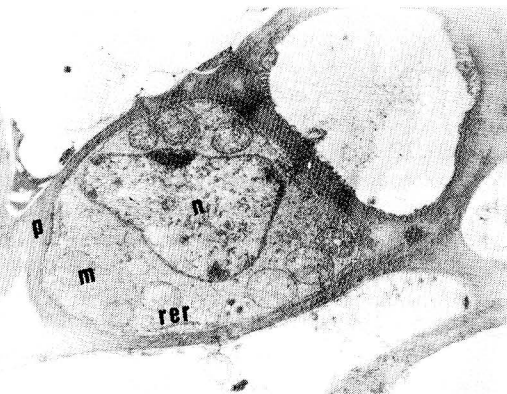


Figura 3. Muestra de hoja de cítricos. Se observa con muy buena definición los componentes celulares; n) núcleo; m) mitocondrias y rer) retículo endoplásmico rugoso. La pared celular (p) presenta su estructura característica. 15 000 X.

4. Díaz E, Maribona R, Komeva S, Ancheta O. Osmotic behaviour of protoplasts of sugar cane. Presentado en Biotecnología Habana'92 C. Habana, Cuba 1992.

5. García María E, Rodríguez S, Ramos María E. Características ultraestructurales del grano de polen en dos variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Presentado en: IV Simposio de Botánica. C. Habana, Cuba 1993.

6. Mondéjar C, Rodríguez S, Ancheta O. Ultraestructura de la embriogénesis somática en caña de azúcar. Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de la Habana 1993.

7. Zavaro C, Rodríguez S, Ramos María E, de la Rosa María C, Barreto A. Estudio de una teratología en los frutos de *Fimbristylis dichotoma* (L) Vahl (Cyperaceae) Fontqueria 1993;36:273.