

### III. Preparación de Muestras Vegetales para observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión

Normalmente previo al estudio de tejidos de vegetales al microscopio electrónico se realiza una observación al microscopio óptico. Una vez conocidas las estructuras a este nivel y agotadas las posibilidades de análisis se inicia un nuevo mundo para el investigador: La Microscopía Electrónica.

No obstante los beneficios que ha aportado en estos años la microscopía electrónica tiene varias limitantes para observar el material biológico. Estas tienen que ver con las características del equipo pues las muestras soportan ciertas condiciones adversas durante la observación; ésto significa resistir a la deshidratación, el vacío y el impacto del flujo de electrones sobre el tejido. Otra limitante es la capacidad de penetración de los electrones en las estructuras estudiadas. Al ser muy escasa se requieren tres tipos de preparaciones especiales para observar el material biológico: Las suspensiones, las réplicas y los cortes.

A.- Las suspensiones fueron utilizadas en botánica sobre todo al inicio de microscopía electrónica y sirve para observar formas y estructuras superficiales de algunos organismos unicelulares y otras estructuras pequeñas como granulos de polen. Estos procedimientos tienen su importancia aún para la observación de bacterias y virus. Su preparación es simple, se aplica una gota de suspensión a la membrana de soporte que se encuentra sobre la rejilla microscópica, se deja secar y después de la aplicación de la película de carbón en un equipo especial, los preparados se pueden observar.

Gracias al advenimiento del MEB, este tipo de preparaciones no tiene hoy su papel de antaño para los estudios de estructuras vegetales.

B.- Las réplicas se utilizaron mucho para observar estructuras superficiales de muestras impenetrables para los electrones. Las réplicas con películas finas se hicieron por aplicación de soluciones de materiales plásticos (sobre todo Formvar) a la superficie de las muestras. Para la observación se utilizan después sólo estas películas y la muestra se quita en muestras biológicas. Este método de preparación fué eliminado con la introducción del microscopio electrónico de barrido. Las réplicas se hacen todavía de las muestras después de la aplicación del método especial crio-grabado o crio-fractura (freeze-etching, freeze-fracturing).

C.- Los cortes, tienen hoy el papel principal para estudios ultraestructurales de material vegetal. Los cortes deben ser bastantes finos (menos de 100 nm) para dejar penetrar los electrones. Para hacer estos cortes tenemos que preparar el material: fijar, deshidratar e incluir. Este procesamiento es diferente de la preparación para observaciones anatómicas e histológicas clásicas que se usan para microscopía óptica. Las diferencias resultan de la necesidad de conservar las estructuras mucho mejor o incluir muestras en material que facilite hacer los cortes suficientemente delgados. La última restricción para las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión, resulta del contraste que debe tener el material analizado para distinguir estas estructuras.

Aproximadamente 45 años nos separan de la puesta en el mercado de los primeros microscopios electrónicos de transmisión. Durante ese tiempo, nu



merosas metodologías se han probado para estudiar las estructuras celulares con el fin de formarse una idea más cercana a la realidad, el evitar la frecuencia de artefactos en una muestra biológica fué uno de los mayores retos que enfrentaron los microscopistas. Gracias a la valiosa participación de los pioneros de la microscopía electrónica quienes nos han legado un cúmulo de conocimientos es factible, mediante un procesamiento adecuado y cuidadoso de las muestras, tener una visión clara y concisa de los organismos tal como están en la naturaleza.

En este manual no queremos dar un informe detallado de las múltiples metodologías empleadas en la microscopía electrónica ya que éstas pueden ser localizadas en otras publicaciones. Solamente queremos mencionar los procesos aplicados más frecuentemente en los laboratorios de microscopía electrónica, para estudiar mediante la preparación de cortes, las células vegetales, explicar todos los pasos y poner atención a futuras dificultades y errores.

**Todo procesamiento sigue este esquema:**

- 1.- Tomar muestras
- 2.- Fijar
- 3.- Deshidratar
- 4.- Infiltrar con medio de solución e incluir
- 5.- Hacer cortes
- 6.- Teñir
- 7.- Observar en microscopio
- 8.- Tomar fotos e imprimir
- 9.- Interpretar resultados

**1. Toma de muestras**

Esta etapa del trabajo no es tan fácil como parece. Los resultados dependen mucho de la forma como se toman las muestras, al principio tenemos que saber que la penetración de los fijadores usados tanto como las resinas para la inclusión es muy limitada con el material vegetal. Esto resulta de células con paredes gruesas y del contenido de material de reserva como el almidón que son casi impenetrables. Cada tejido que se usará es diferente y se necesitan variaciones en el tratamiento. En la primera etapa del trabajo con un material desconocido podemos escoger el procesamiento según el tipo de tejido. Entre más densas sean las células y tengan paredes más gruesas, el volumen de la muestra se reducirá; las células parenquimáticas con paredes delgadas y alto contenido de agua, no causan tantos problemas para la penetración de soluciones como las células esclerenquimáticas, las células meristemáticas, las células llenas de citoplasma y vacuolas o como en las células de tejidos de reserva con bajo contenido de agua.

El volumen de las muestras debe ser aproximadamente de  $1 \text{ mm}^3$ . La penetración la podemos facilitar si usamos cortes de material con uno de los lados que tenga menos de 1 mm. Si cortamos algunos tejidos u órganos, aunque pequeños, podremos eliminar por lo menos de un lado tejidos superficiales protectores de órganos vegetales que dificultan la penetración de los reactivos.

Para elegir adecuadamente las muestras al procesar, debemos conocer la estructura anatómica de los órganos que vamos a estudiar y saber en que dirección los queremos cortar, longitudinalmente o transversalmente. Normalmente se usan navajas nuevas lavadas con alcohol. Se debe cortar material fresco para fijar. Nunca se transporta y guarda el material sin previa fijación. Tomemos



en cuenta que se trabaja a nivel ultraestructural y toda manipulación errónea del material se expresa en las estructuras observadas. El material empleado para las observaciones anatómicas al microscopio óptico generalmente no se puede utilizar para el microscopio electrónico. Cuando se obtiene material vegetal de su habitat natural --directamente en el campo-- se toman las muestras y se colocan inmediatamente al fijador, anotando todas las condiciones imperantes en ese lugar, --así como las formas de corte. El manejo de las muestras se hace con cuidado, usando una aguja --inoxidable y sin presionar las muestras.

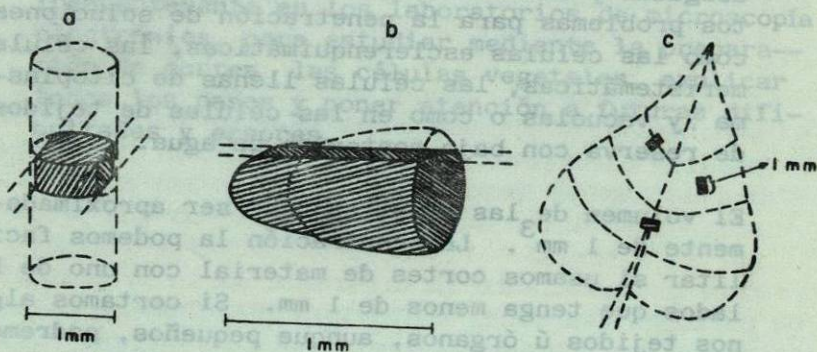


FIG. 1. Forma como se toman las muestras para facilitar la penetración de soluciones.  
 a) de órganos cilíndricos  
 b) de estructuras apicales  
 c) de hojas

## 2. Fijación

La fijación sirve para dar muerte a las células -- con un cambio mínimo de las estructuras y estabiliza los componentes químicos para que no se pierdan durante el tratamiento. Sabemos que la penetración de los fijadores a los tejidos vegetales es muy lenta y frecuentemente las células superficiales tienen una fijación muy diferente a las células localizadas más al interior de la muestra.

Los fijadores usados para microscopía electrónica de transmisión tienden a conservar las estructuras celulares sin coagular las proteínas; además, estos fijadores aumentan el contraste de las estructuras por la adición de las moléculas impermeables a los electrones. Por el contrario cuando se emplean los fijadores más comunes en microscopía óptica, como el alcohol o el ácido acético (solos o combinados), se provocan daños irreversibles para los tejidos haciendo que estos queden inservibles para estudios ultraestructurales.

Los fijadores más empleados en microscopía electrónica son dos: El glutaraldehído y el tetróxido de osmio, la fijación se hace en cierto pH, osmolaridad y temperatura. Estas condiciones junto con el tiempo de fijación y concentración del fijador influyen mucho en los resultados. Para estabilizar el pH se usan varias soluciones amortiguadoras, la más común es el fosfato. Para aumentar la osmolaridad de la solución del fijador se usa algunas veces sacarosa. La temperatura durante la fijación, varía según el autor, al principio se usaban mucho las temperaturas bajas ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Esta temperatura, sin embargo, disminuye la velocidad de penetración de los fijadores dentro de los tejidos, además ciertas estructuras como los microtúbulos no se pueden observar después de una fijación a temperaturas bajas. Por esta ra-



zón la mayoría de los autores recomiendan usar - temperaturas de laboratorio (20°C) para este pro- pósito.

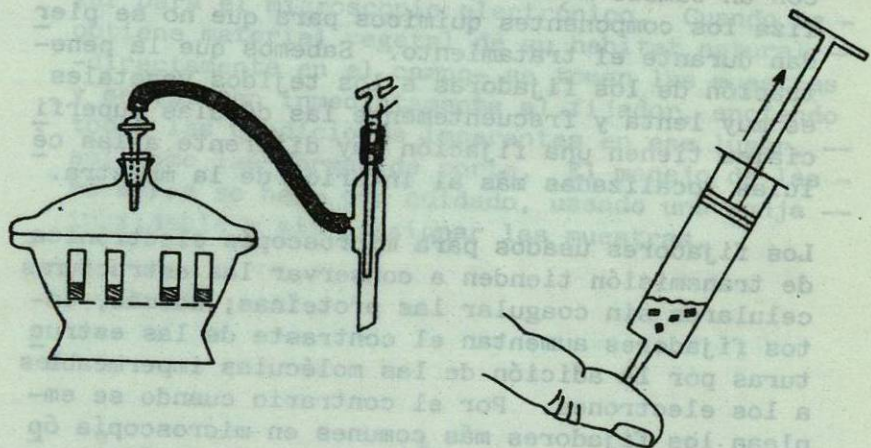


FIG. 2. Utilización de baja presión durante la fijación con una trampa de vacío y del vacío hecho con una jeringa.

La fijación la hacemos en viales pequeños. Estos son tubos de aproximadamente 1 cm de diámetro y 5 cm de longitud que debemos marcar por fuera, - sin agregar papel con el número de la muestra -- dentro del fijador debe ser como mínimo 20 veces más que el de las muestras. Generalmente, un mi- lilitro de fijador es suficiente para cada una - de ellas. Para facilitar la penetración del --- reactivo se recomienda agitar las muestras duran- te la fijación, usando una agitadora o un aparato similar. Otro proceso que se usa con éxito - en nuestro Laboratorio es la utilización de baja

presión (vacío) hecho con una trampa de vacío. - No es necesario el vacío durante todo el tiempo de fijación, ya que parece que los cambios de -- presión atmosférica facilitan más la penetración. El alto vacío con bomba rotatoria no es recomen- dable porque puede destruir las estructuras celu- lares finas. Cuando deseemos disminuir la pre-- sión atmosférica de las muestras colectadas en - el campo y facilitar la penetración de los fija- dores podemos hacer el vacío con una jeringa.

## 2.1. Fijadores:

### - Glutaraldehído

El glutaraldehído es un dialdehído y para micros- copia electrónica se necesita un reactivo limpio y nuevo. Se obtiene comercialmente en concentra- ciones de 25%, 50% y 70%, especialmente prepara- do para su uso en microscopía electrónica. Las soluciones se guardan en el refrigerador a 4°C. Para la fijación se prepara solución de 3% o 5% con amortiguador. El glutaraldehído fija muy -- bien la matriz de los organelos y el citoplasma, conservando bien ribosomas, microtubulos, etc. - su desventaja es un bajo contraste de las estruc- turas, sobre todo membranas, por eso se usa prin- cipalmente en combinación con otros fijadores. El tiempo de fijación es de 3 hasta 5 horas.

### - Tetraóxido de osmio

Este excelente fijador para microscopía electró- nica se consigue en forma de cristales amarillos protegidos en tubos de vidrio o también en solu- ción acuosa al 4%, bajo nitrógeno contenido en - la misma ampolleta. Para la fijación se emplean soluciones al 1% o al 2%. Disolver los cristales de tetraóxido de osmio en el agua destilada tar-



da mucho tiempo recomendándose preparar la solución con un día de anticipación a su empleo. Para guardar esta solución se deben usar recipientes de vidrio color ambar que hayan sido lavados perfectamente con mezcla crómica (ac. sulfúrico y ac. crómico). Las ampolletas que contienen el tetraóxido de osmio se lavan también perfectamente en mezcla crómica y se enjuagan en agua destilada antes de romperse. Utilizando un lápiz diamante o una lima se rayan las paredes de la ampolla y se deposita ésta en el recipiente de color ambar. Una vez dentro se rompe la ampolla con un agitador o se provoca el choque de la ampolla contra las paredes del recipiente.

El tetraóxido de osmio es peligroso y tóxico, ataca la mucosa nasal, bucal, etc. siendo obligado trabajar con extractor o al aire libre. Si queremos guardar el resto de la solución que no utilizamos inmediatamente, es mejor preparar soluciones al 4% y guardar esta en tubos preferentemente bajo solución de 1% o 2% para uso inmediato; el  $\text{OsO}_4$  además de conservar bien todas las estructuras celulares aumenta el contraste de ellas y estabiliza los aceites. El tiempo de fijación recomendado es de 1 a 2 horas en refrigeración o a temperatura de laboratorio.

#### - Permanganato de Potasio ( $\text{KMnO}_4$ )

Este reactivo se usó mucho al principio de la microscopía electrónica. Su empleo en estos años es muy limitado. Se utiliza aún para la demostración de las membranas. Con  $\text{KMnO}_4$  no se conserva la matriz de los organelos, ni el contenido del núcleo y se pierden los ribosomas. Las gotas de aceite cambian su estructura y forman artefactos y las vacuolas se modifican. Se puede utilizar para la demostración de estructuras membranosas de las células vegetales como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

#### - Formaldehído

La fijación con formaldehído es similar a la fijación con glutaraldehído, aunque generalmente no se obtienen resultados tan buenos. El formaldehído comercial no es lo bastante limpio para su uso en microscopía electrónica, empleándose una solución acuosa alcalinizada con polvo para formaldehído a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Amortiguadores

Para estabilizar el pH de las soluciones empleadas para preparar los fijadores en microscopía electrónica se usan soluciones amortiguadoras. El amortiguador más frecuentemente usado con tejidos vegetales es el de fosfatos, también se utilizan otros tipos como el amortiguador de veronalcetato y de cacodilato sódico.

#### Amortiguador de fosfatos (0.2M)

Solución A: fosfato sódico monobásico

$(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ -----	31.2 gr.
$(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$ -----	27.8 gr.
agua -----	1000 ml.

Solución B

fosfato sódico dibásico

$(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ -----	71.7 gr.
$(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ -----	53.6 gr.
agua -----	1000 ml.

Amortiguador de pH 7.2

se prepara mezclando 28 ml. de solución A con 72 ml. de solución B.



Amortiguador de veronalacetato (0.28M)Solución A

veronal sódico (Barbitol 2.89 gr.)

acetato sódico hidratado 1.90 gr.

acetato sódico anhidro 1.15 gr.

agua destilada 100 ml.

Solución B (0.1N HCl)

ácido clorhídrico concentrado (36-38%) 8.6 ml.

agua destilada ----- 1000 ml.

Se mezclan 2 volúmenes de solución A con 2 volúmenes de solución B y un volumen de agua, el pH se ajusta agregando ácido clorhídrico 0.1N.

Amortiguador de cacodilato (0.2M)Solución A

cacodilato sódico ----- 42.8 gr.

agua destilada ----- 1000 ml.

Solución B

HCl concentrado (36%-38%) ----- 10 ml.

agua destilada ----- 603 ml.

amortiguador de pH 7.2

Se prepara mezclando 50 ml. de solución A con 4.2 ml. de la solución B, (se afora con agua a 200 ml.)

**2.3 Esquema de fijación.**

- 1.- Fijación con glutaraldehído diluido del 3% - al 5% en amortiguador de fosfatos de 0.1 M, pH 7.2 a temperatura de laboratorio (20°C) de 3 a 5 horas.
- 2.- Lavar con el amortiguador de fosfatos. Cambiar la solución 10 veces con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. Se puede quedar en amortiguador otro día.

3.- Se hace una postfijación con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador de fosfatos con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. a temperatura de laboratorio.

4.- Lavar con el amortiguador de fosfatos. Cambiar la solución 10 veces con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. Se puede quedar en esta solución hasta otro día.

NOTA: Es muy importante eliminar los restos del fijador porque éstos pueden formar artefactos o precipitados en el tejido. Los cambios de soluciones se pueden hacer bien con una jeringa y una aguja fina, para no perder las muestras.

**3. DESHIDRATAACION**

El agua de los tejidos vegetales se elimina y substituye por el reactivo empleado para disolver las resinas empleadas en la inclusión; excepto cuando empleamos resinas hidrosolubles que son de uso poco común en la mayoría de los laboratorios de microscopía electrónica. Los deshidrantes más comunes son el alcohol, la acetona y el óxido de propileno. Igual que en microscopía electrónica la deshidratación se realiza aumentando gradualmente la concentración de acetona o alcohol y disminuyendo el contenido de agua. Este proceso no debe hacerse con lentitud porque se extraen algunos componentes celulares.

Para la inclusión de Durcupan se usa la acetona con las siguientes concentraciones y tiempos:

1	30%	15 min.
2	50%	30 min.
3	70%	30 min.