

Aplicación de técnicas de microscopía de luz para la observación de tejido vegetal.

Verver y Vargas Cortina A., León-Ramírez C.G., Ruiz-Herrera J y Cabrera-Ponce J.L. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Ingeniería Genética de Plantas. Libramiento Norte Carretera Irapuato-León. Apartado postal 629. e-mail: averver@ira.cinvestav.mx.

La microscopía es la técnica que sirve para producir imágenes visibles de estructuras o detalles demasiado pequeños que no pueden ser percibidos a simple vista. El ojo humano no logra distinguir objetos de menos de 50 micras de diámetro ni consigue resolver dos líneas separadas por menos de 100 micras es por ello la necesidad de utilizar este tipo de tecnología para llevar a cabo el análisis a nivel celular.

En los sistemas de regeneración de plantas es importante conocer el estadio de diferenciación celular, permitiendo así realizar los subcultivos sucesivos y promover de esta manera una regeneración de plantas completa. La herramienta más adecuada sería la visualización de las células vegetales en microscopía de luz ya que en nuestro grupo contamos con estos aparatos y las técnicas microscópicas serán los métodos más adecuados para poder hacer este tipo de estudio.

Una de las bondades de los sistemas de cultivo *in vitro* de material vegetal es mantener a las células en estadios específicos dependiendo de los estímulos con diferentes medios de cultivo suplementados con diferentes tipos de reguladores del crecimiento a los que son sometidas las células para llevarlas al punto de interés, las condiciones microscópicas para determinar estos estadios aún no están establecidas dado que son particulares dependiendo del material vegetal en cuestión. Si nosotros conjuntamos los productos de ambos métodos conoceremos con solo ver las muestras vegetales al microscopio cual sería el siguiente paso al cuál hay que someter las células en los diferentes medios de cultivo para proseguir en el proceso de regeneración de la planta.

En estos momentos se está llevando a cabo trabajo experimental con los siguientes modelos vegetales: frijol, maíz, árbol del paraíso, paulownia, etc. Para todo esto es muy importante tomar en cuenta las características de las muestras que se requieren trabajar para así seleccionar la técnica microscópica más apropiada. En nuestro caso específico es necesario observar células totipotentes no diferenciadas de embriones somáticos y otras estructuras meristemáticas de diferentes muestras vegetales para poder observar claramente la organización de las células que conforman la estructura en cada etapa de su desarrollo y diferenciación que comprende, desde la formación de los embriones hasta la aparición de órganos que formarán una planta.

Hasta el momento no se conoce una técnica repetitiva y confiable de tinción diferencial de material vegetal que nos permitan observar al microscopio las diferentes características celulares que muestre los cambios de las células diferenciadas como de las no diferenciadas.

En nuestro laboratorio se establecieron condiciones óptimas en las cuales los callos embriogénicos de frijol, maíz, árbol del paraíso, paulownia, presentan sus mejores características, logrando obtener cortes homogéneos de 8 μ m de grosor. Con respecto a la estandarización de la técnica de tinción nos ha permitido observar diferencia a nivel de núcleo ya que las células diferenciadas muestran un núcleo prominente que abarca aproximadamente el 80% de su volumen celular mientras que aquellas que aún conservan su estadio totipotente su núcleo es pequeño y bien delimitado. Otra de los métodos de observación diferencial que logramos establecer es aquella que nos permitió ver zonas jóvenes de activo crecimiento en tonos azules (proteína) y estados más avanzados de maduración en tonos rosas (carbohidratos) a dicha técnica le hemos denominado PASSNBB (no descrita) que es, una modificación y readaptación de la técnica del PASS aniline blue black (Donald 1968, Clark 1981).

Literatura:

Donald, B. Fisher. Histochemic. 16, 92-96, 1968

Clark, G. Staining Procedures. Fourth edition. 1981. pp 323-324