

Protocolo de tinción de suberina (Sudan Red)

Cortes anatómicos de raíz para la tinción de suberina

Para estudios anatómicos, las raíces deben conservarse en etanol al 70% y almacenarse a 4°C hasta su uso.

Seccionamiento utilizando bloques de agarosa (o agar) como medio de Soporte

Las raíces se pueden incrustar en agarosa (o agar) y luego seccionarse. El agar (5-10%)

1. Utilice un molde donde se puedan verter la solución de agarosa (o agar) y raíces.
2. Prepare una solución de agarosa al 3% (V) vertiendo agarosa en agua hirviendo o mediante ráfagas cortas de calor en un microondas. Agite continuamente para evitar burbujas. vierta la solución en el molde. Coloque la sección de la raíz lo más recta posible con el agar caliente y que no quede muy superficial.
3. Deje que la agarosa se endurezca y después de eso, forme el molde de pequeños rectángulos que contenga las raíces y colóquelos en nevera por algunas horas.
4. Con la ayuda del vibratomo realice secciones transversales consecutivas y numerosas a lo largo de la raíz.
5. Coloque las secciones en portaobjetos con pequeñas gotas de agua para evitar la deshidratación de las muestras.
6. Elimine la agarosa (si es posible) con una aguja de disección y seleccione secciones delgadas y uniformes para ver bajo el microscopio o procesamiento posterior de las secciones.

Estamos interesados en la detección de la suberina en los tejidos de la raíz, ya que están involucrados en las respuestas de las raíces a su entorno. La suberina se deposita en las células de la exodermis y la endodermis.

Sudan Red 7b para la detección de suberina

Sudán Red 7B es la tinción más efectiva, no fluorescente, para los lípidos (Brundrett et al, 1991).

1. Prepare la solución 1: 1 de polietilenglicol 400 (PEG-400) y glicerol (90%).

2. Disuelva 0.01 g de Sudan Rojo 7B en 50 ml de solución 1.
3. Caliente la solución a 90°C durante 1h, para esto utilice una plancha con agitación constante.
4. Coloque una ligera capa de albumina de meyer sobre el portaobjeto. Las secciones transversales se montan directamente y se ponen en una plancha con un poco de calor para que los cortes se queden pegados, luego se pone la solución de tinción en pequeñas gotas y se dejan durante 3 horas.
5. Después de 3 horas el tinte se enjuaga con agua, luego se lava con dodecilsulfato de sodio al 1% (p/v) (Soukup et al, 2002). Dodecilsulfato de sodio minimiza la precipitación del colorante en las secciones (Soukup et al, 2002) y finalmente se lava con etanol al 96%.
6. Después de lavar, monte las secciones transversales en una gota de glicerol (> 30%), coloque un cubreobjeto y haga un encuadre con pintañas transparente para fijar.
7. Las secciones están listas para su examen bajo microscopía de campo brillante. Las paredes suberizadas se teñirán de rojo.

Citas bibliográficas

Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or Fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry*. 66: 111–116.

Tomáš Soukup., Gisela Zacharová and Vika Smerdu(2002).Fibre type compositionof soleus and extensor digitorum longus musclesin normal female inbred Lewis rats. *Acta histochem*. 104(4) 399-405.