

MANUAL DE TÉCNICAS DE CURACIÓN Y PRESERVACIÓN PARA PREPARACIONES PERMANENTES DE HONGOS FITOPATÓGENOS



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

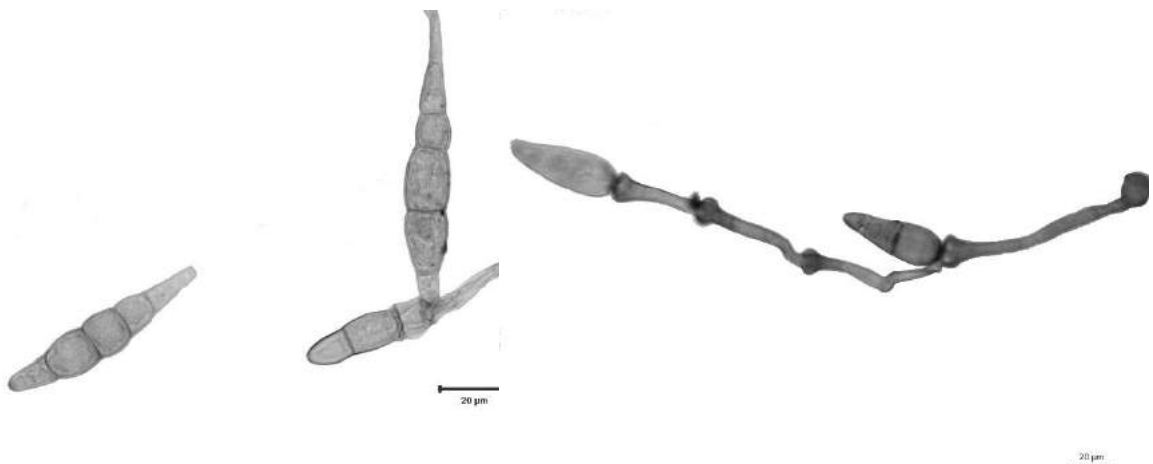
Senasica, agricultura sana para el bienestar

“Los hongos que causan enfermedades pueden ser un enemigo temible. Conocer los mecanismos con los que atacan y la forma en que éstos han evolucionado, nos ayudará a enfrentarlos más eficientemente.”

-GILBERTO MANZO, BLONDY CANTO Y ANDREW JAMES-

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Laminillas Permanentes para una Colección	3
2. Preparación de Laminillas Permanentes	5
2.1 Materiales.....	5
2.2 Proceso de Preparación.....	7
2.2.1 Revisión documental de los antecedentes que respaldan a los especímenes.....	7
2.2.2 Recuperación de especímenes de laminillas permanentes.....	7
3. Mantenimiento de Laminillas Permanentes	15
REFERENCIAS	17
GLOSARIO	18
ANEXO 1: medio de montaje	19



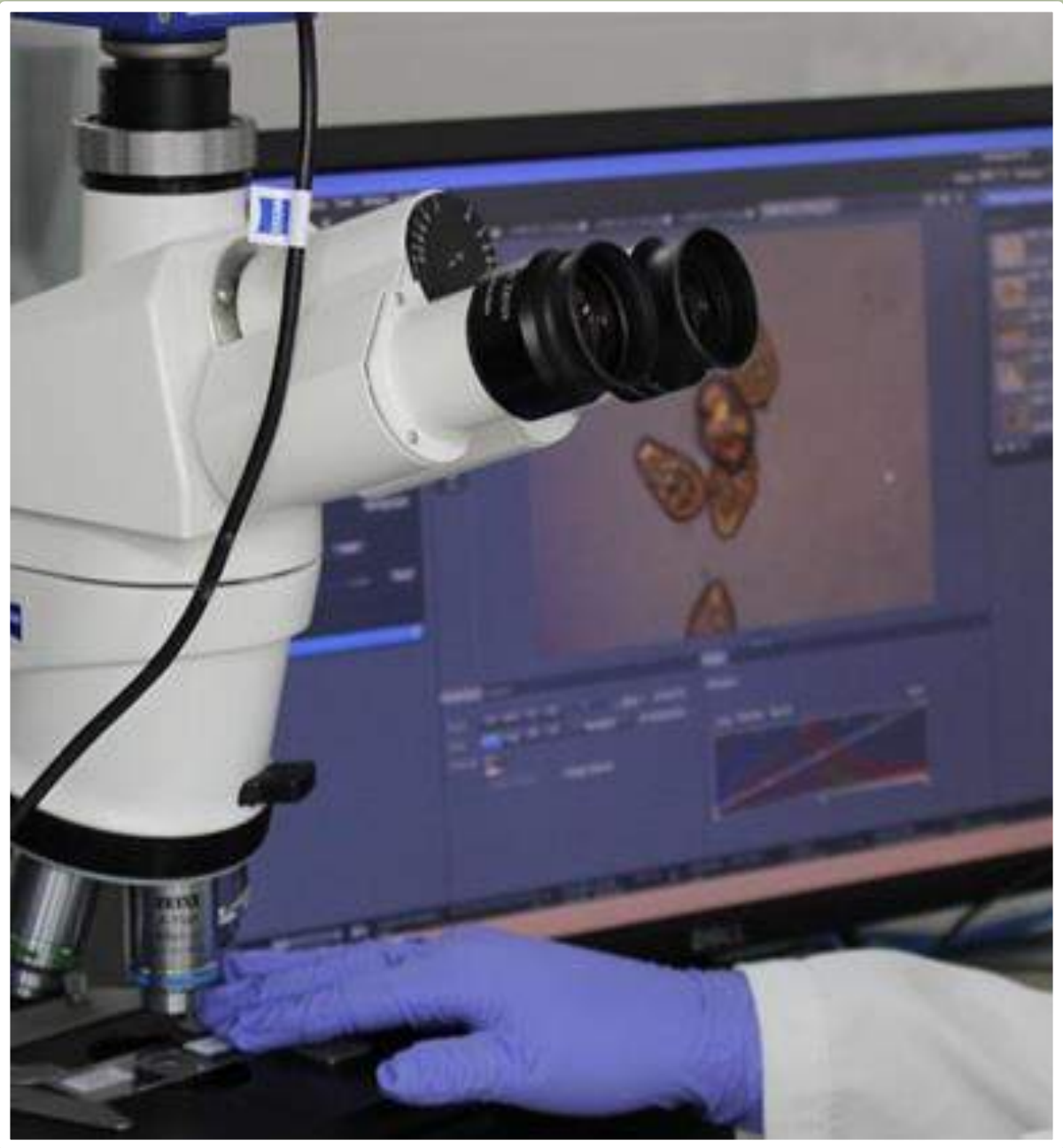
INTRODUCCIÓN

La Colección de Micología del Centro Nacional de referencia fitosanitaria (CNRF-MICO), alberga principalmente hongos fitopatógenos de importancia cuarentenaria o económica, así como hongos endofíticos y simbioses.

Esta colección es gran importancia para el fitosanidad de México, ya que permite la conservación de recursos genéticos y de la biodiversidad; además de constituir una fuente de referencia para el diagnóstico, certificación, investigación y docencia al brindar servicios de asesoramiento y transferencia del conocimiento científico a sectores interesados.

La función principal de la CNRF-MICO es la conservación de cultivos axénicos, sin alteraciones genéticas o mutaciones, ni cambios morfológicos o fisiológicos, manteniendo las cepas en un estado estable que asegure su viabilidad, pureza, patogenicidad y virulencia a largo plazo; por lo cual, es fundamental conocer las condiciones de crecimiento y temperatura apropiadas, las propiedades bioquímicas y las necesidades fisiológicas de cada hongo para seleccionar las técnicas de curación y preservación favorables para su conservación.

En este Manual se describe el proceso curatorial que se aplica en el Laboratorio de Micología del CNRF para la preservación de hongos fitopatógenos en laminillas permanentes. Su estructura fue diseñada de forma sencilla para su fácil comprensión, los temas se explican de forma ilustrada y en pasos secuenciales. Inicialmente se mencionan los aspectos básicos de la curación de laminillas, luego se detalla el proceso; y finalmente se dan instrucciones generales sobre el mantenimiento de laminillas permanentes.



1. Laminillas Permanentes para una Colección

Las colecciones biológicas que utilizan técnicas de microscopía, se caracterizan por contener especímenes montados en superficies de vidrio de varios tamaños (portaobjetos), con una o más cavidades para el espécimen (es), usualmente con una película de poliéster o vidrio que lo cubre (NPS, 2005).

De acuerdo con Neuhaus, Schmid y Riedel (2017), de manera general, los micromontajes pueden contener ejemplares:

- Sumergidos en un medio natural o sintético de montaje líquido o resinoso, con un material alrededor del margen del medio de montaje que brinda protección a la muestra.
- Incluidos en una cera o resina sólida o semisólida (cuando el ejemplar se encuentra seccionado).
- Recubiertos con metales (aluminio, oro, aleación oro-paladio) o sustancias no metálicas (como el carbono) para mejorar la imagen de la pieza del espécimen/especímen para microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés de Scanning Electron Microscopy).
- Tratados con enzimas o sustancias químicas alcalinas que hacen que las piezas de la muestra se transparenten a la luz.
- Teñidos para diferenciar tejidos.

Las colecciones de micromontajes, también llamadas laminillas o preparaciones permanentes en portaobjetos, son útiles para montar especímenes enteros, órganos internos, organización de tejidos o alteraciones celulares. En estos casos, inicialmente puede ser necesario fijarlos en soluciones o incluirlos en materiales que permitan conservar la integridad de sus estructuras y contrastar aspectos anatómicos, bioquímicos o estructurales. El uso de estas técnicas es aplicable para colecciones entomológicas, micológicas y parasitológicas, entre otras (Neuhaus et al., 2017; NPS, 2005).

El método de preservación está determinado por el tipo y naturaleza del espécimen que se requiere conservar. El tiempo efectivo de la preservación depende en gran parte de la fijación inicial del ejemplar, la cual crea contraste entre las estructuras de interés a observar, proporciona condiciones de estabilidad, brinda protección a la muestra, evita la descomposición del tejido y aumenta su afinidad a la tinción (Arraiza, Viguria, Navarro y Ainciburu, s.f.; Iglesias Ramírez y Rodríguez Obaya, s.f.; STI, 2011; NPS, 2005).

Entre los medios de montaje más utilizados se puede mencionar al lactofenol, el glicerol y el Bálsamo de Canadá. El lactofenol permite el aclaramiento de los tejidos y puede combinarse con tinciones como el azul de algodón para contrastar estructuras de los ejemplares. El glicerol posee una presión de vapor muy baja, mantiene sus propiedades por largos periodos de tiempo, no forma cristales y es muy útil cuando se requiere preservar tejidos vegetales y fúngicos. Por su parte, el Bálsamo de Canadá brinda mayor fijación a los tejidos, por lo que se prefiere cuando se trata de montar segmentos de algún ejemplar

(Neuhaus et al., 2017). Específicamente para preparaciones de hongos con soporte de glicerol-parafina, es importante utilizar glicerol deshidratado del 40 al 50 %, con el fin de prevenir el crecimiento de bacterias.

Desde un punto de vista curatorial, el medio de montaje de especímenes biológicos debe:

1. Permitir la observación de los detalles más finos de los especímenes.
2. Secarse de manera que no se desarrollen cavidades cerca de la muestra y en la periferia de la cobertura originada por la pérdida de volumen debido a la evaporación de un disolvente.
3. No reaccionar con la muestra.
4. Permanecer estable durante décadas y especialmente no segregarse en sus componentes (sinéresis) o desarrollar grietas, cavidades, precipitaciones, cristales y un fondo granular. La cobertura no debe desprenderse.
5. Permitir que el espécimen sea remontado en caso de que el soporte de la diapositiva esté dañado.

Durante la preparación y secado de los montajes, debe tenerse cuidado con la formación de burbujas de aire, con la finalidad de evitar la deshidratación del espécimen durante su periodo de almacenamiento (NPS, 2005; Neuhaus, et al., 2017).

Por otro lado, el mantenimiento de las colecciones incluye acciones correctivas como respuesta a situaciones reales que representen un riesgo para la integridad de los especímenes, así como la revisión e implementación de acciones preventivas relacionadas con la información que respalda a cada espécimen, condiciones ambientales, saneamiento y su ubicación dentro de la colección (NPS, 2005).

6. Navaja o bisturí
7. Parafina sólida
8. Etiquetas
9. Pincel
10. Cubreobjetos
11. Portaobjetos
12. Alfiler entomológico o aguja de disección
13. Capilares
14. Etanol al 50 %
15. Etanol al 96 %
16. Mechero de alcohol
17. Plantilla para limpieza y etiquetado
18. Pinzas de relojero
19. Termo plancha
20. Microscopio óptico simple (estereoscópico)
21. Microscopio óptico compuesto
22. Aceite de inmersión
23. Papel absorbente

2.2 Proceso de Preparación

2.2.1 Revisión documental de los antecedentes que respaldan a los especímenes

Cada espécimen debe contar con información que permita su rastreabilidad y le proporcione valor agregado como referencia para el desarrollo y establecimiento de distintos tipos de estudio e investigación, así como para la planeación y desarrollo de estrategias y programas de vigilancia y manejo fitosanitario.

Es necesario constatar que los antecedentes documentales contengan información mínima como: nombre del sitio de colecta, fecha de colecta, nombre de colector, hospedante vegetal y georreferenciación del sitio de colecta. Asimismo, el etiquetado previo de las laminillas debe señalar el nombre completo del espécimen, nombre del determinador y una clave interna que permita su rastreabilidad.

De la misma manera, debe asegurarse que la identificación del espécimen señalada en el etiquetado previo de la laminilla corresponda con el ejemplar, y que ésta contenga la taonomía actual acorde con el ejemplar; para lo cual es necesario auxiliarse de literatura de referencia (**Figura 2**).



Figura 2. Revisión documental de los antecedentes de las laminillas.

2.2.2 Recuperación de especímenes de laminillas permanentes

Se parte de una preparación permanente que al ser observada con microscopio óptico compuesto, se detecta que su espécimen presenta las siguientes situaciones:

- Se encuentra ligeramente embebido en la parafina.
- Su posición no permite la adecuada observación de sus estructuras.
- Presenta esporas o estructuras de otro hongo.
- Contiene basuras o pelusas.
- Tiene burbujas que dificultan su observación y comprometen la preservación.

Otros factores a considerar para la recuperación de especímenes, son los referentes al soporte y medio de montaje:

- Portaobjetos dañados, rayados o rotos.
- Medio de montaje saturado con colorantes que dificultan la observación y diferenciación de las estructuras del espécimen.
- Presencia de dos montajes en un mismo portaobjeto que dificultan su observación o etiquetado de la laminilla.

El procedimiento para la recuperación de los especímenes en laminillas permanentes se describe a continuación:

Paso 1. Ubicar dentro de la preparación la posición del espécimen que se requiere recuperar. Se puede señalar la ubicación con marcador indeleble sobre el cubreobjetos o por la parte de abajo del portaobjeto. La recuperación se inicia trabajando la laminilla bajo la luz del microscopio estereoscópico, ubicando el espécimen a recuperar (**Figura 3**).

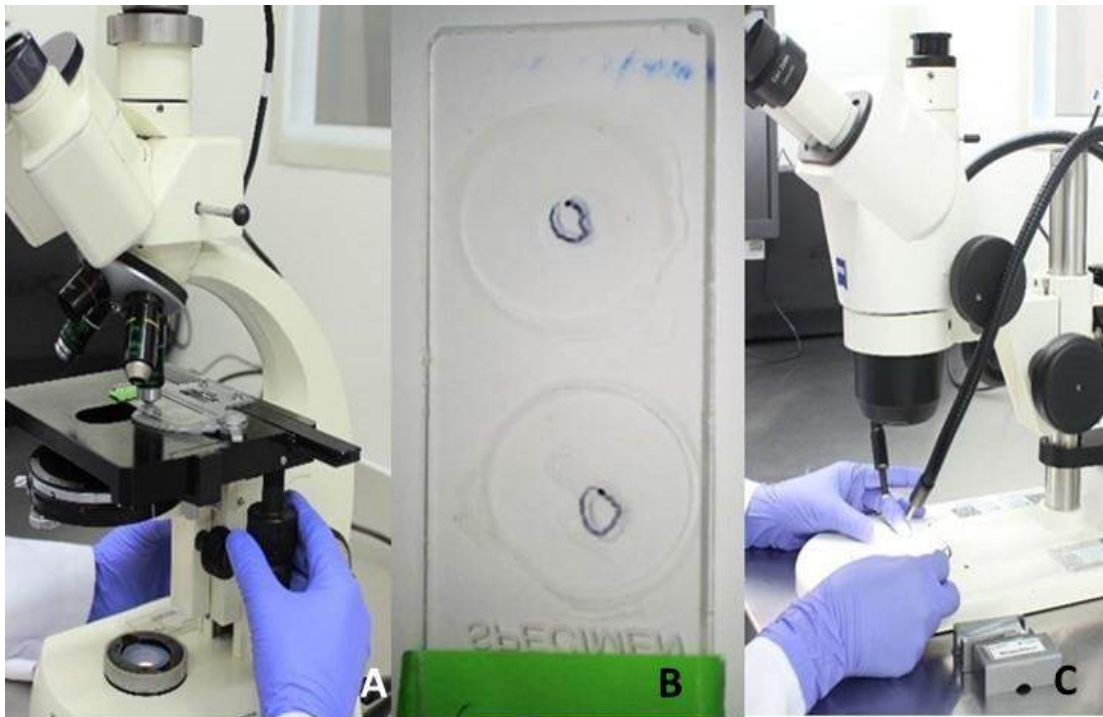


Figura 3. Inicio del proceso para curación de laminillas permanentes. A) Observación de la preparación que contiene el espécimen a recuperar. B) Marcado de la ubicación del ejemplar en el montaje, C) Observación de la laminilla con microscopio estereoscópico con la ubicación del espécimen a recuperar.

Paso 2. Bajo la luz del microscopio estereoscópico, separar el cubreobjetos del portaobjetos, utilizando una navaja o un bisturí, teniendo cuidado de no dañar al espécimen. Después, sujetar el cubreobjetos con pinzas de relojero para desprenderlo completamente del anillo de parafina a fin de liberar la gota de medio de montaje y tener acceso directo al espécimen que se desea recuperar (**Figura 4**)

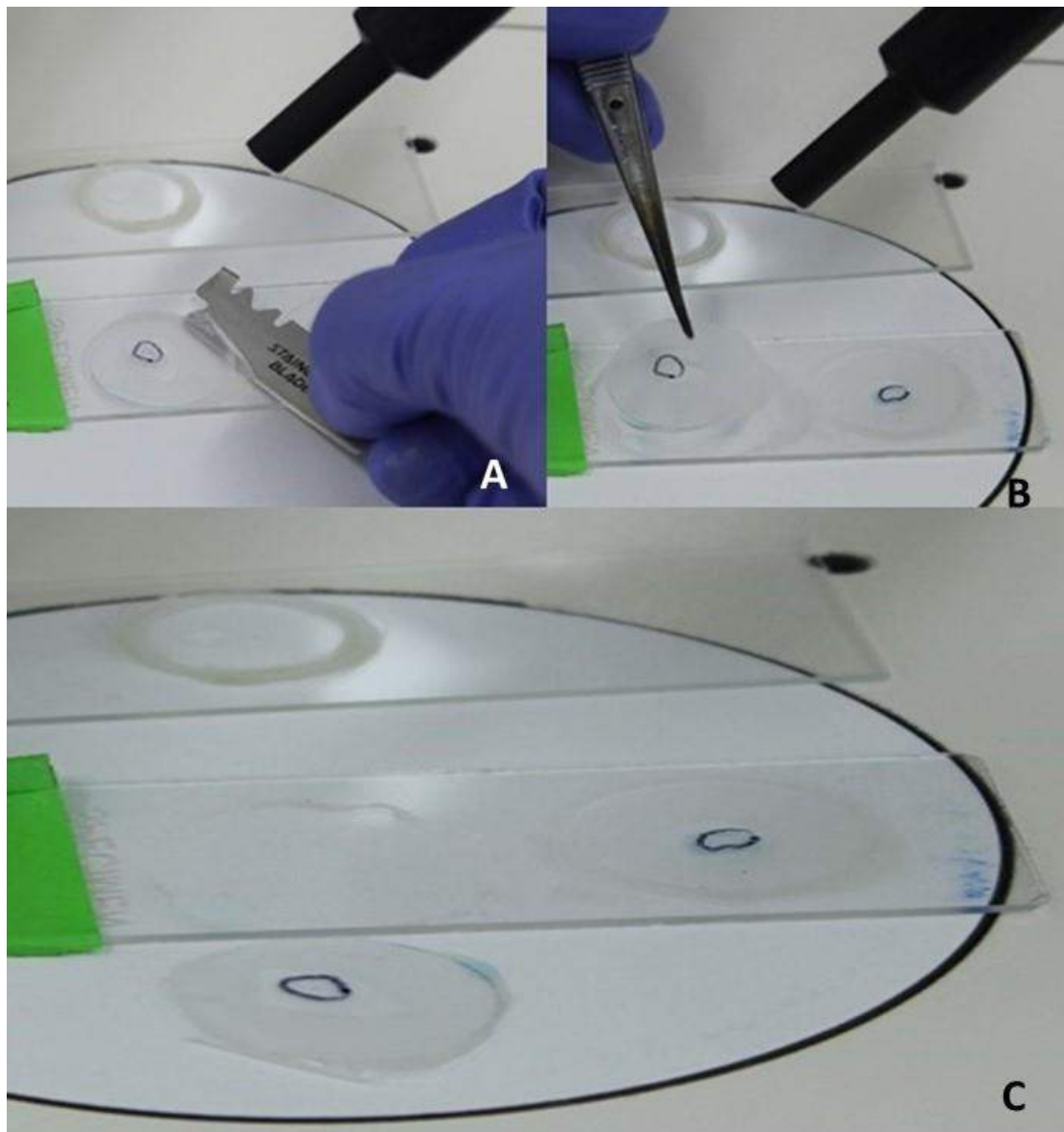


Figura 4. Liberación del espécimen para su captura. **A)** Separación del cubreobjetos de la parafina y portaobjetos, **B)** Desprendimiento total del cubreobjetos con pinzas de relojero. **C)** Acceso directo al espécimen a recuperar.

Paso 3. Con la ayuda de un capilar o un gotero, colocar sobre un portaobjetos nuevo una gota de medio de montaje que puede ser glicerina deshidratada al 5 % con azul de Nilo o cualquier otro que permita el contraste y observación de las estructuras de interés (**Anexo 1**). La gota debe ser muy pequeña a fin de que el espécimen quede delimitado a la menor superficie posible sin ser dañado y permita su ubicación con mayor facilidad al momento de observarlo.

Paso 4. Una vez colocada la gota de medio de montaje, marcar un anillo con parafina. Para ello se debe exponer el sacabocados al calor del fuego de un mechero,

una vez caliente, sumergir en parafina sólida, sacar y colocar sobre el portaobjetos de manera que el anillo encierre a la gota del medio de montaje (**Figura 5**).

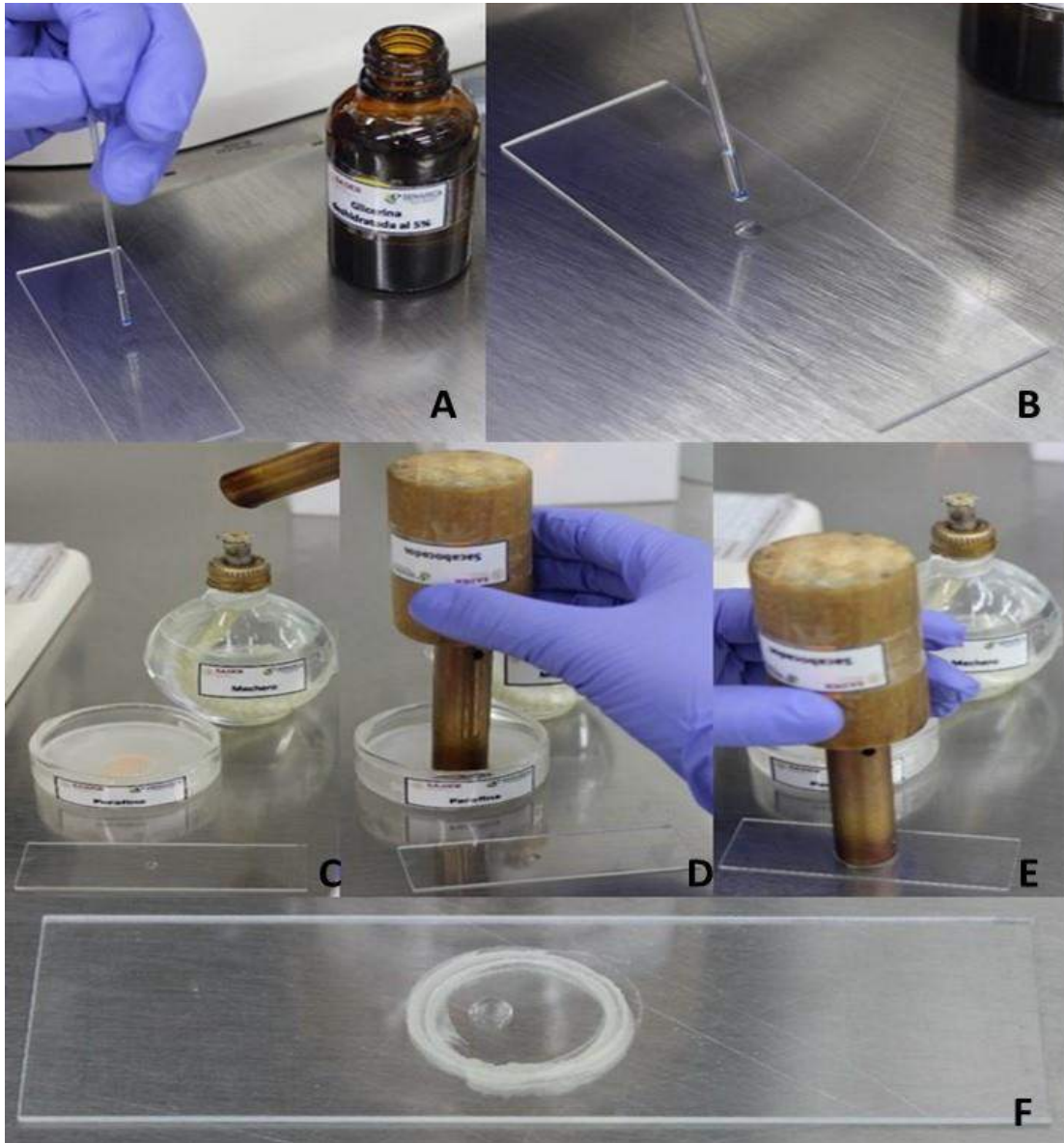


Figura 5. Preparación del portaobjetos para la nueva laminilla. **A y B)** Colocación de la gota de medio de montaje, **C, D y E)** Formación del anillo de parafina. **F)** Portaobjetos con medio de montaje rodeado por un anillo de parafina.

Paso 5. Enseguida, recuperar el espécimen de la gota de medio de montaje, ya sea que haya quedado sobre el portaobjetos o sobre el cubreobjetos, capturándolo con un alfiler entomológico y un pincel. Posteriormente, depositarlo dentro de la gota de medio de montaje del nuevo portaobjetos (**Figura 6**).

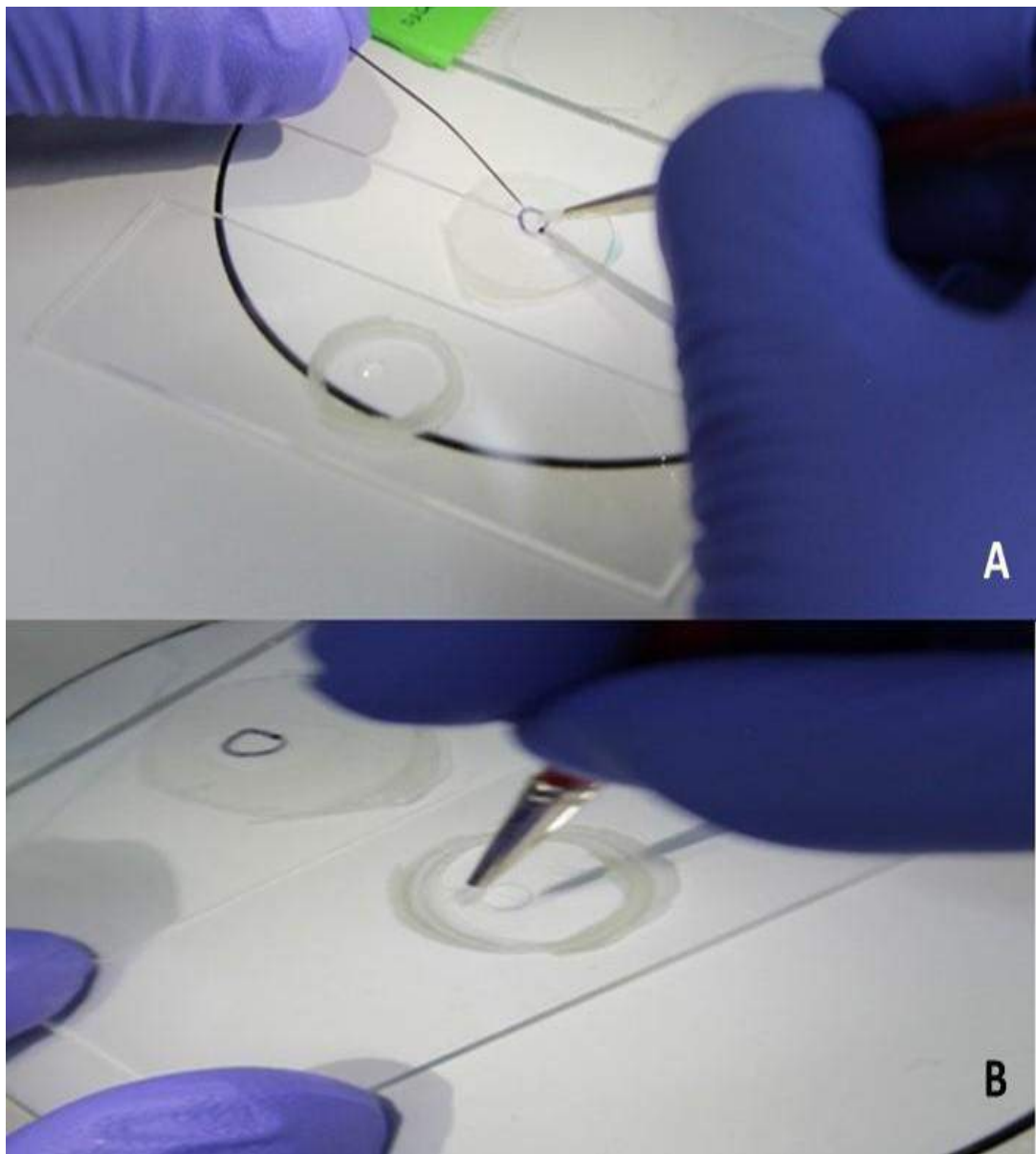


Figura 6. Recuperación del espécimen para transferirlo a una nueva laminilla. **A)** Captura del espécimen. **B)** Transferencia del espécimen al nuevo portaobjetos.

Paso 6. Con un microscopio óptico compuesto, verificar la integridad de las estructuras del espécimen en la gota. Asimismo, revisar que no existan burbujas en el medio de montaje y proceder a colocar un cubreobjetos sobre el anillo de cera.

Paso 7. Para sellar el montaje es necesario exponer la preparación al calor por periodos muy cortos de exposición a la flama de un mechero de alcohol o durante varios segundos sobre una termoplancha para que se derrita la parafina hasta cubrir la superficie del cubreobjetos libre del medio de montaje. Posteriormente, retirar la preparación para permitir que se enfríe y selle (**Figura 7**).

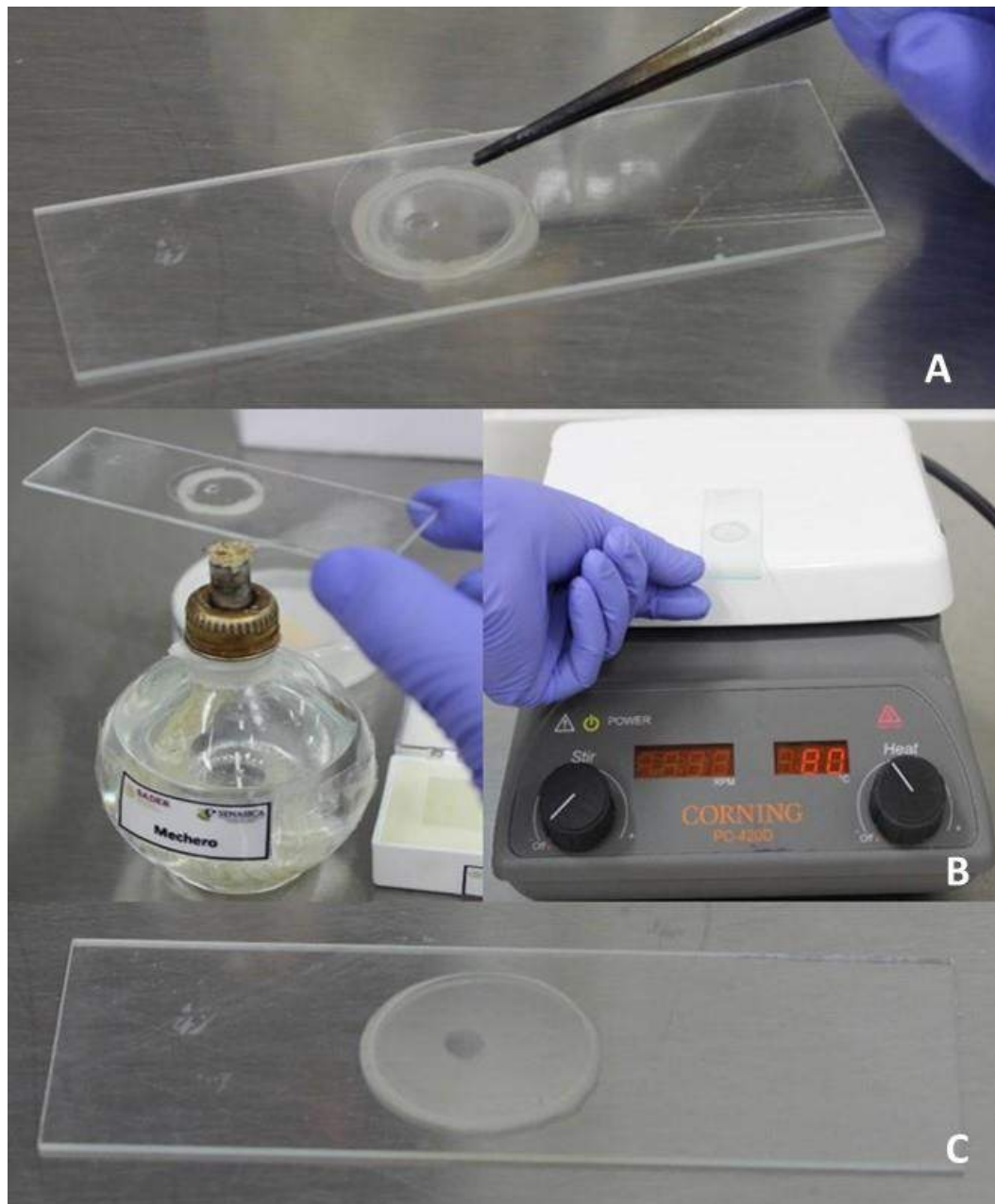


Figura 7. Sellado del montaje con anillo de parafina. **A)** Sobre posición de cubreobjetos al anillo de parafina. **B)** Calentamiento para derretir la parafina. **C)** Enfriamiento y sellado con parafina.

Paso 8. Es necesario corroborar con un microscopio óptico compuesto que el espécimen se encuentre íntegro y en posición adecuada para su observación. En caso de que no sea así, iniciar nuevamente la recuperación del mismo siguiendo los pasos anteriormente descritos.

Paso 9. Si el espécimen se encuentra adecuadamente montado, se procede a limpiar la laminilla, retirando la parafina que queda fuera del cubreobjetos. Para ello, utilizar una navaja de afeitar o bisturí para rebanar la parafina de la superficie del portaobjetos, así como etanol al 50 % y un paño de papel para retirar los residuos de parafina y limpiar los cristales del portaobjetos y cubreobjetos (**Figura 8**).

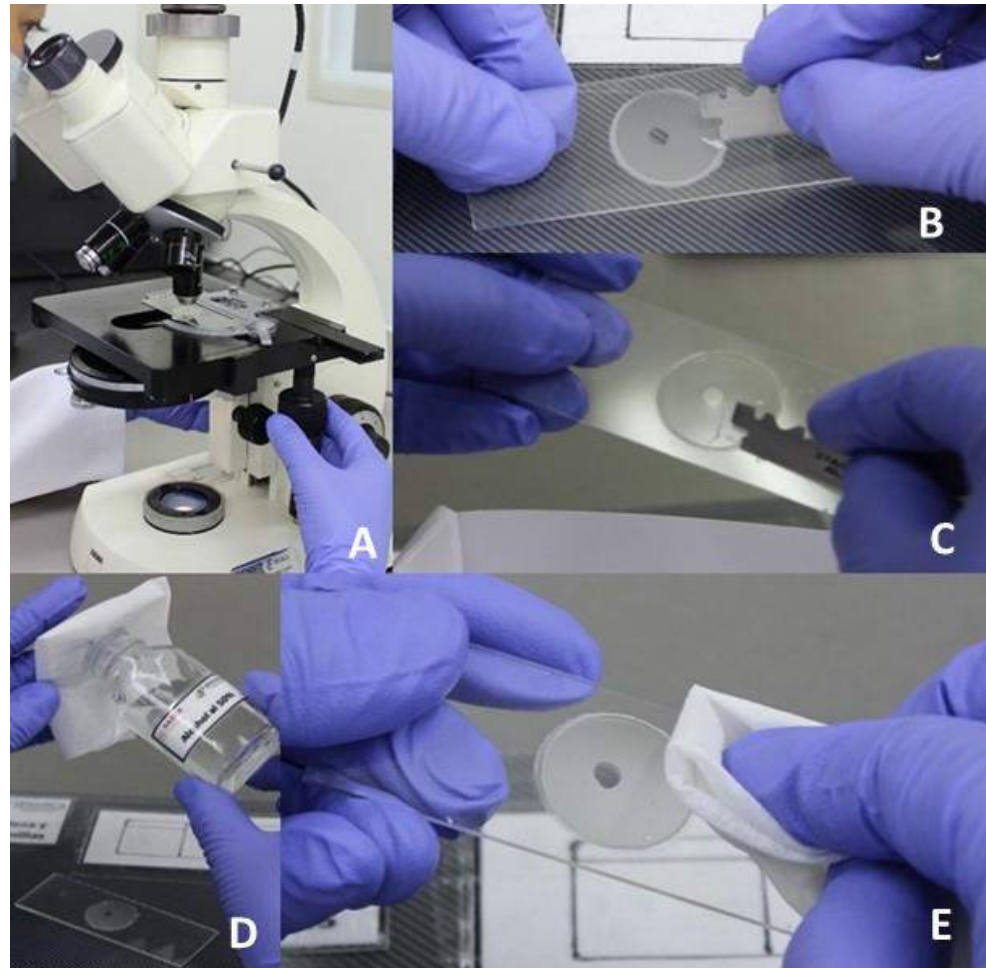


Figura 8. Limpieza de laminilla. **A)** Observación del estado y ubicación del espécimen. **B y C)** Raspado de parafina. **D y E)** Limpieza con alcohol al 50 %.

Paso 10. Etiquetar la laminilla limpia. Se recomienda contar con una plantilla que permita colocar las etiquetas equidistantes al cubreobjetos a fin de tener simetría en la preparación. Se pueden emplear pinzas de relojero para depositar la etiqueta sobre el portaobjetos.

Nota: el etiquetado debe contener información sobre la clave de identificación del espécimen dentro de la colección, nombre científico y estructuras del espécimen que pueden apreciarse, lugar y fecha de colecta, así como fecha y nombre del determinador.

Paso 11. Con la finalidad de contar con soporte fotográfico de la colección, se deben tomar fotografías de las estructuras contenidas en las laminillas permanentes y guardarlas en una carpeta bien identificadas (**Figura 9**).

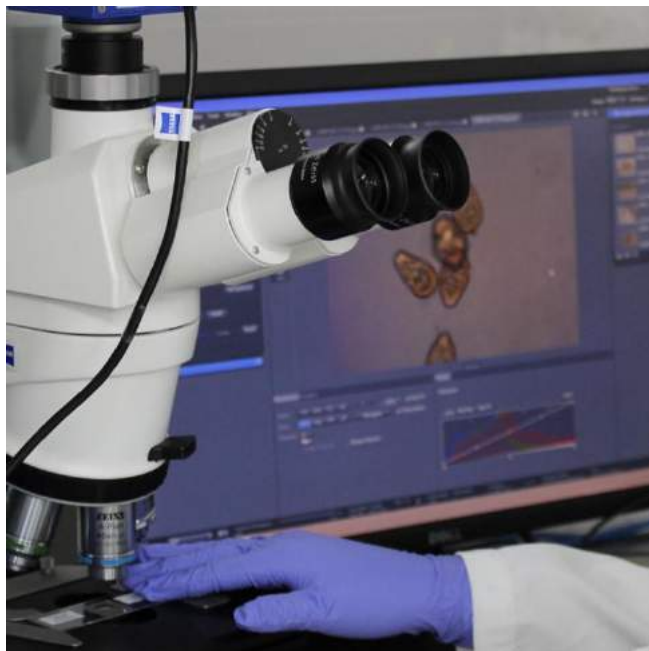


Figura 9. Respaldo fotográfico de las estructuras del hongo a partir de laminillas permanentes

Paso 12. Finalmente, se debe colocar la laminilla en su lugar correspondiente como parte de la colección (**Figura 10**).

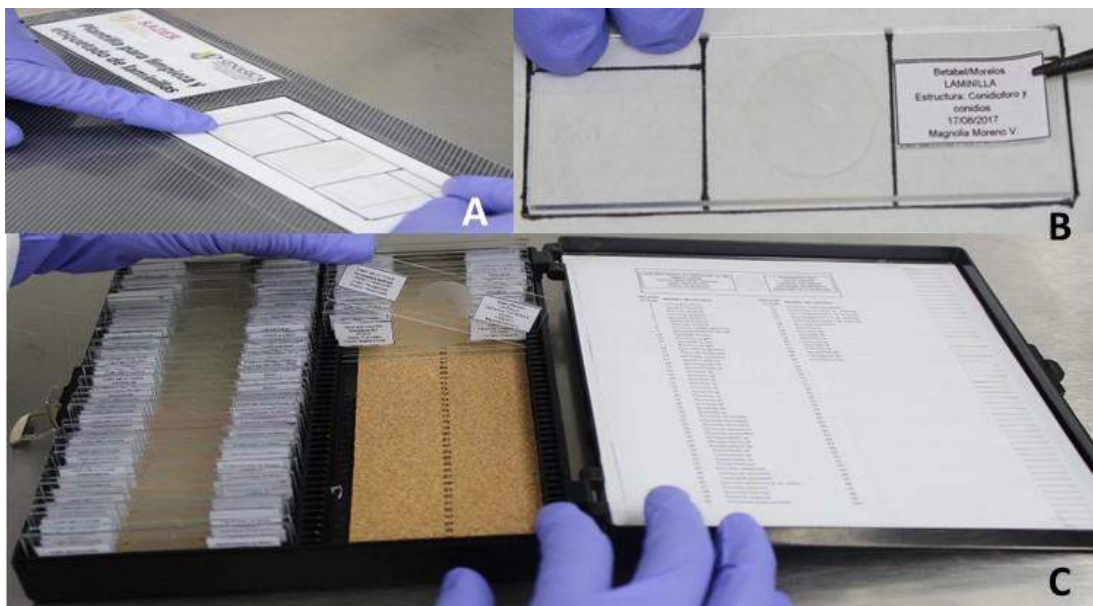


Figura 10. Etiquetado y guardado de la laminilla. **A y B)** Etiquetado de la laminilla. **C)** Colocación de la laminilla dentro de la colección

3. Mantenimiento de Laminillas Permanentes

El mantenimiento de laminillas permanentes consiste en brindar limpieza o cambio de superficie de montaje a los especímenes.

Durante la limpieza, se debe eliminar cualquier residuo de polvo, partículas de vidrio provenientes del desgaste de los portaobjetos, escamas de la piel del personal que realiza la curación de los ejemplares, fibras de ropa, huellas dactilares, grasa y restos de aceite de inmersión; para ello, puede utilizarse un soplador de polvo, un cepillo fino, paños de laboratorio secos o humedecidos con agua destilada o etanol. Solo en casos extremos deberá optarse por la eliminación de recubrimientos dañados, rehidratación o cambio del medio de montaje y cambio de etiquetas ilegibles o dañadas (Neuhaus, et al., 2017).

La integridad de los ejemplares puede verse afectada debido a la ruptura de los vidrios que las soportan, temperatura y humedad muy elevadas o muy bajas que deterioren el soporte o el medio de montaje, prolongada exposición a fuentes de luz rica en radiación ultravioleta, contaminantes gaseosos que favorezcan la oxidación del medio o soportes de montaje, capacitación insuficiente del personal involucrado en el manejo, falta de información sobre los componentes de la colección o inadecuado control de plagas (Arraiza et al., s.f.; NPS, 2005).

Por lo anterior, para asegurar la adecuada preservación de colecciones para microscopia por largos periodos de tiempo, deben considerarse factores ambientales y de manejo de los ejemplares, tales como:

- Temperatura
- Humedad
- Luminosidad
- Fuentes contaminantes
- Negligencia y manipulación.

Por ejemplo, la temperatura debe estar en un rango de 16.6 a 22.2 °C y la humedad relativa entre el 40% y el 50% (NPS, 2005).

Algunos de los aspectos que deben considerarse para determinar la necesidad de cambio de soporte o laminillas para el rescate de los especímenes son:

- Deterioro o ruptura de los soportes.
- Fuga o desecación de medios de montaje.
- Presencia de burbujas en el medio de montaje.
- Presencia de residuos de aceites de inmersión en el portaobjetos para microscopio.
- Deterioro y ruptura del etiquetado (Magro, 2002).

Por otra parte, uno de los aspectos más importantes que hay que cuidar en una colección es la identificación del espécimen, ya que ésta permite contar con una identidad del ejemplar dentro de la colección. Dicha identificación considera un acrónimo único e irrepetible, el cual deberá estar ligado a información referente a la colecta, características, manejo y ubicación del espécimen dentro de la colección (Neuhaus, et al., 2017).

Partiendo de que todos los ejemplares cuentan con una identificación, para el manejo de la colección es necesario asegurarse de que la disposición de cada ejemplar permita el acceso a especímenes seleccionados sin poner en peligro los demás (Neuhaus, et al., 2017).

Los almacenes o gabinetes que contengan la colección deben estar diseñados de tal forma que permitan que las laminillas se ubiquen de forma horizontal y plana, sobre todo cuando se utilizan medios de montaje que pudieran fluir hacia el borde y causar daños a los especímenes. Se recomienda la revisión periódica, al menos cada cinco años, y el almacenamiento de las laminillas en posición horizontal (NPS, 2005).

REFERENCIAS

- Arraiza, N., Viguria, P.M., Navarro, J. y Ainciburu, A. (s.f.). **Manual de microscopia. Historia, descripción y uso del microscopio óptico.** Recuperado de <https://pagina.jccm.es/museociencias/otras%20actividades%20web/material%20c%20nr%20web/manual%20de%20microscopia.pdf>
- Iglesias Ramírez, B. Z. y Rodríguez Obaya, T. (s.f.). **Métodos de estudio en histología.** Recuperado de <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/metodos.pdf>
- Magro, R. (2002). **Técnicas de preparación microscópica, tinción e inclusión para dermatopsias en los lepidópteros** (Insecta: Lepidoptera) [versión electrónica]. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 31: 205-216.
- Neuhaus, B., Schmid, T. y Riedel J. (2017). **Collection management and study of microscope slides: Storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations.** Auckland, Nueva Zelanda: Magnolia Press.
- NPS. National Park Services. (2005). **The Museum Handbook, Part I: Museum Collections.** Recuperado de <https://www.nps.gov/museum/publications/MHI/MHI.pdf>
- STI. Servicios Técnicos de Investigación. (2011). **Preparación de muestras para microscopía óptica.** Recuperado de <https://ssyf.ua.es/en/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/tema-4.pdf>
- Ulloa, M. y Hanlin, R. T. (2006). **Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología.** Minesota, Estados Unidos: APS Press.
- CLEU. Colegio Libre de Estudios Universitarios (s.f.) **Montaje.** Recuperado de <http://cleuadistancia.cleu.edu.mx/cleu/flash/PAG/lecturas/pelosyfibras/Montaje.pdf>
- Vocabulary. (2019). **Diccionario.** Consultado en línea en <https://www.vocabulary.com/dictionary/syneresis>

GLOSARIO

E.....

Espécimen: muestra o parte típica de un grupo o un todo, que pertenece a una categoría particular, pero en razón de una característica individual distintiva (Ulloa y Hanlin, 2006).

M.....

Medio de montaje: solución en la que se incrusta una muestra bajo la cubierta del cubreobjetos. Puede ser un líquido simple como el agua o glicerol o compuestos que se endurecen como el bálsamo de Canadá o gelatina. En general, debe contener un índice de refracción cercano al vidrio, no ser reactivo con la muestra y presentar estabilidad en el tiempo para no cristalizarse u oscurecerse (CLEU, s.f.).

Microscopía óptica: la microscopía óptica es una técnica empleada para ver de cerca una muestra con el aumento de una lente con la luz visible. Puede ser simple o compuesta, con distintas fuentes de luz y configuraciones (campo claro, campo oscuro, contraste de fases, de polarización, fluorescencia, etc.) (Arraiza et al., s.f.).

Microscopio óptico simple: provisto de una lente o sistema de lentes convergentes que proporcionan una imagen virtual, derecha y mayor que el objeto situado entre la lente y el foco. Puede utilizarse para la disección de objetos pequeños o para la disociación de sus piezas (Arraiza et al., s.f.).

Microscopio óptico compuesto: combina dos lentes o sistemas de lentes convergentes de amplificación de imagen, colocados uno en el extremo del tubo denominado objetivo, situado más cerca del objeto a observar y otro, el ocular, más cerca del ojo del observador (Arraiza et al., s.f.).

P.....

Preservación: conservar calidad y condición, previniendo el deterioro.

S.....

Sinéresis: separación de la fase líquida de un gel causada por la contracción de éste.

ANEXO 1: medio de montaje

Glicerina deshidratada al 50 %

Glicerina	50 mL
Agua destilada	50 mL

Procedimiento: mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina. Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.

DIRECTORIO

Dr. Víctor Manuel Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE SADER

SENASICA

Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga
DIRECTOR EN JEFE DEL SENASICA

Ing. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dr. José Abel López Buenfil
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL REFERENCIA FITOSANITARIA

M. en C. José Gustavo Torres Martínez
SUBDIRECTOR DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

Elaborado por:**Laboratorio de Micología**

M. en C. Adrián González Saucedo

Ing. Jire Ajeleth Muñoz Jaimes

M. en C. Lervin Hernández Ramos

Dra. Magnolia Moreno Velázquez

Ing. Nayeli Carrillo Ortíz

Revisión:**Grupo DiaFi**

Dra. Berenice Calderón Pérez

Dr. Johan Rodríguez Mendoza

Fotografía:

Las fotografías que ilustran este manual fueron tomadas por personal técnico del Grupo DiaFi y el Laboratorio de Micología.

Diseño y Edición:**Grupo DiaFi**

M. en C. Ariana G. Robles Zárate

Forma recomendada de citar:

Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2019). *Manual de Técnicas de Curación y Preservación para Preparaciones Permanentes de Hongos Fitopatógenos* [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

www.gob.mx/sader

www.gob.mx/senasica

 **SENASICA SADER**

 **@SENASICA**

 **SENASICA SADER**

"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa".