



TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA VEGETAL

Manual Teórico - Práctico

2024

**Natalia Delbón, Sofía Machado,
Verónica Cabrera, Pía Wiemer,
Franco Chiarini, Marisa Matesevach,
Valentina Saur Palmieri**





Universidad
Nacional
de Córdoba



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS y NATURALES



Técnicas de Histología Vegetal: Manual Teórico - Práctico

Prof. Adjunta: Dra. Natalia Delbón

Prof. Asistentes: Dra. Ana Sofía Machado, Dra. Verónica Cabrera,
Dra. Ana Pía Wiemer, Dra. Ana Marisa Matesevach y Dr. Franco Chiarini

Prof. Ayudante A: Biól. Valentina Saur Palmieri

**LABORATORIO DE MORFOLOGÍA VEGETAL. FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y
NATURALES. ESCUELA DE BIOLOGÍA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

E-mails de contacto: natalia_delbon@unc.edu.ar - sofia.machado@unc.edu.ar

Redes: www.facebook.com/MorfologiaVegetal - @morfologia_vegetal_fceyn_unc

La presente guía se encuentra bajo licencia CC BY-NC (*Atribución-NoComercial*)

Técnicas de histología vegetal : manual teórico-práctico.

Natalia Delbon Ana Sofía Machado, Verónica Cabrera, Ana Pía Wiemer, Ana Marisa Matesevach,
Franco Chiarini Y Valentina Saur Palmieri - 1a ed - Córdoba : Carezzano, 2024.

Memoria USB, PDF

ISBN 978-631-00-3158-3

1. Histología. 2. Anatomía Vegetal.

ISBN 978-631-00-3158-3



9 786310 031583

PRÓLOGO DE LA EDICIÓN

La primera versión de este Complemento de Técnicas de Histología Vegetal fue elaborada en el año 1974 por la Dra. T. E. Di Fulvio, Profesora de la Cátedra de Morfología Vegetal de la FCEFYN, Universidad Nacional de Córdoba.

Posteriormente, en el año 1998, se incorporaron nuevas técnicas y se actualizaron otras. Colaboraron en la Segunda Edición los Profesores de la Cátedra: Nilda Dottori, María Teresa Cosa, Gloria Bruno, Laura Stiefkens, Nora Perícola y Miriam Hadid.

En la tercera versión del año 2014, se ampliaron y actualizaron todos los capítulos, se agregaron ilustraciones, se incluyeron nuevas técnicas y contenidos mínimos de células y tejidos vegetales, se detallaron normas generales de seguridad en el laboratorio y se incorporaron guías de actividades para los Trabajos Prácticos. Participaron de esta nueva edición los siguientes Profesores: María Teresa Cosa, Nilda Dottori, Laura Stiefkens, Miriam Hadid, Marisa Matesevach, Natalia Delbón, Pía Wiemer, Sofía Machado, Verónica Cabrera, Cristina Costa. Además, colaboraron las Técnicas Principales de CONICET, Adriana Pérez y Alejandra Trenchi.

En esta cuarta versión, del año 2024 se corrigieron y actualizaron los contenidos teóricos y las técnicas. Se eliminó de este complemento teórico la guía de trabajos prácticos, quedando este como un cuadernillo aparte. Además, se agregaron en cada capítulo microfotografías propias, fruto del trabajo de los docentes de la cátedra, tesis y pasantes de grado y postgrado. Se incluyen en la bibliografía las publicaciones científicas de las que se extrajeron las fotografías.

Participaron en esta edición los docentes de la Cátedra de Morfología Vegetal: Natalia Delbón, Sofía Machado, Verónica Cabrera, Pía Wiemer, Franco Chiarini, Marisa Matesevach y Valentina Saur Palmieri.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE HISTOLOGÍA	2
CAPÍTULO 2: GENERALIDADES SOBRE CÉLULA, TEJIDOS y ÓRGANOS	6
CAPÍTULO 3: INSTRUMENTAL UTILIZADO PARA LAS OBSERVACIONES	21
CAPÍTULO 4: FIJACIÓN, COLORACIÓN Y MONTAJE	34
CAPÍTULO 4: EJECUCIÓN DE PREPARADOS TEMPORARIOS	40
CAPÍTULO 6: EJECUCIÓN DE PREPARADOS PERMANENTES O DEFINITIVOS	46
CAPÍTULO 7: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DE LA EPIDERMIS	54
CAPÍTULO 8: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DEL LEÑO	59
CAPÍTULO 9: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DEL POLEN	64
CAPÍTULO 10: PRUEBAS HISTOQUÍMICAS	74
ANEXO: FIJADORES, REACTIVOS, COLORANTES, ADHESIVOS Y MEDIOS DE MONTAJE	79
BIBLIOGRAFÍA	83

INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante de la investigación científica lo constituye el conocimiento de la anatomía e histología vegetal, campo de estudio de gran importancia para el reconocimiento preciso de las especies vegetales, desde el punto de vista del proceso de desarrollo de sus tejidos y órganos. Así, la histología vegetal adquiere relevancia en el estudio de especies de interés en investigaciones biotecnológicas; sirve de apoyo científico a las investigaciones relacionadas con la conservación y uso de los recursos vegetales, permite identificar especies maderables, conocer problemas de adulteraciones, contaminaciones y diversas patologías; además de determinar el contenido polínico de mieles, la dieta de herbívoros y contribuir a dilucidar problemas de medicina forense, etc.

Para la caracterización los distintos tejidos y órganos vegetales se requiere del uso de técnicas especializadas, lo que involucra la aplicación de procedimientos apropiados de colecta, fijación, corte, tinción y montaje para la obtención de preparaciones permanentes o temporales.

Este Complemento de Técnicas fue elaborado para las Materias “Técnicas de Histología Vegetal Aplicadas a la Resolución de Diversos Problemas” e “Histotecnología aplicada al procesamiento de material biológico” dictada para la carrera de Biología de la FCEFN - UNC, y para el Curso de Posgrado, “Aplicación de Técnicas de Histología Vegetal a la Resolución de Diversos Problemas”, de la misma facultad.

Tiene por objetivo dar al alumno nociones sobre preparación de materiales botánicos, las técnicas más usadas cuando se analizan las distintas estructuras vegetales, las normas de seguridad a tener en cuenta en el laboratorio, el instrumental a utilizar y la representación gráfica de los elementos observados. El uso de técnicas histoquímicas y otras especiales, facilitará la interpretación de estructuras vegetales y la resolución de numerosos problemas.

Asimismo, nuestro objetivo último es poner a disposición nuestro conocimiento sobre el estudio de los vegetales, para que esta información sea pública y libre, y llegue a todos los que gustan de esta disciplina.

Invitamos a todos a sumergirse en el maravilloso mundo microscópico.

CAPÍTULO 1: NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE HISTOLOGÍA

CONSEJOS GENERALES

- No entrar en el laboratorio sin que esté presente el docente o persona responsable.
- Seguir las instrucciones del profesor o persona a cargo.
- Estudiar cada experimento o técnica antes de llevarla a cabo.
- Mantener una actitud responsable, no realizar bromas, no correr, no gritar.
- No comer, no beber, no fumar en el laboratorio.

VESTIMENTA

- ❖ Utilizar guardapolvo de manga larga y mantenerlo abrochado.
- ❖ Debe evitarse el uso de lentes de contacto.
- ❖ Quienes tienen cabello largo, deberán llevarlo recogido.
- ❖ No se deben llevar pulseras, colgantes, aros o prendas sueltas.
- ❖ No llevar sandalias o calzado que deje el pie al descubierto.
- ❖ En caso de presentar alguna herida, esta debe estar cubierta, aunque se utilicen guantes para trabajar.
 - ❖ Proteger las manos con guantes.
 - ❖ Obligatorio el uso de lentes (gafas) de seguridad, para proteger los ojos.

HÁBITOS DE TRABAJO

- ★ Comprobar la ubicación del material de seguridad como extintores, duchas de seguridad, lavaojos, botiquín, salidas de emergencias, etc.
- ★ Seguir el protocolo de trabajo indicado por el responsable de las prácticas (ver los PET).
- ★ Evitar mezclas que no sean las indicadas.
- ★ Leer siempre la etiqueta y consultar la ficha de datos de seguridad de los productos antes de su utilización.

PRECAUCIONES

- No utilizar ningún reactivo que no tenga etiqueta.
- Se debe etiquetar los frascos y recipientes que contengan mezclas, identificando su contenido.
 - No oler las sustancias.
 - No tocar ni probar los productos.
 - No trabajar nunca solo en el laboratorio.
 - No realizar actividades no autorizadas o no supervisadas.
 - Utilizar campana de extracción de gases para todas las operaciones en las que se manipulen sustancias tóxicas o volátiles.
 - No trabajar lejos de la mesada, ni colocar objetos en el borde de la misma.
 - Cuando se deba calentar los tubos de ensayos, esto se realizará de lado, utilizando pinzas para sujetar el tubo de ensayo.

- No se debe mirar el interior del tubo de ensayo, ni dirigir la boca del tubo de ensayo hacia otro compañero ni hacia uno mismo.
- En la dilución de ácidos, añadir siempre el ácido sobre el agua y no al revés, podría provocar una proyección sumamente peligrosa.
- Para pipetear usar siempre pro-pipetas, nunca con la boca.
- Asegurarse de que los materiales estén fríos antes de tomarlos con las manos.
- Recoger materiales, reactivos o equipos presentes en las mesadas de trabajo y que no se están utilizando, para evitar acumulaciones innecesarias.
- Los recipientes de productos químicos deben cerrarse después de su uso.
- Al terminar el trabajo asegurarse del cierre de las conexiones de agua, gas y de desenchufar los aparatos eléctricos.
- Desechar el material de vidrio que presente defectos.
- No forzar la separación de vasos, recipientes que estén obturados. Esta tarea la debe realizar el profesor responsable.

DERRAMES

- Para la eliminación de residuos utilizar los recipientes destinados a tal fin.
- Está prohibido desechar líquidos inflamables, tóxicos, corrosivos, peligrosos para el medio ambiente como material biológicos por las piletas o sanitarios.
- No tirar productos, ni papeles impregnados en los cestos para papeles.
- Si por accidente se originase un vertido en la pileta, añadir siempre agua en forma abundante.

ACCIDENTES

Salpicaduras en los ojos y sobre la piel

1. Sin perder un instante lavarse con agua durante 10 a 15 minutos, empleando si es necesario la ducha de seguridad; quitarse la ropa y objetos previsiblemente mojados por el producto químico.
2. Si la salpicadura es en los ojos, emplear el lavaojos durante 15-20 minutos, sobre todo si el producto es corrosivo o irritante.
3. No intentar neutralizar y acudir al médico lo más rápidamente posible con la etiqueta o ficha de seguridad del producto.

Quemaduras térmicas

Lavar con abundante agua fría para enfriar la zona quemada.

Intoxicación digestiva

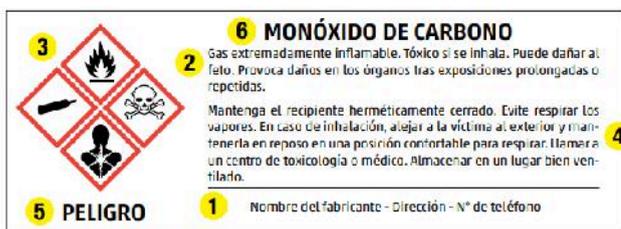
Debe tratarse en función del tóxico ingerido, para lo cual se debe disponer de información a partir de la etiqueta y de la ficha de datos de seguridad.

ETIQUETA DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS

El Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos - SGA (su sigla en inglés GHS por Global Harmonized System) es un sistema integral de comunicación de peligros de alcance internacional, cuyo uso es obligatorio en el ámbito del trabajo. (Resolución SRT N° 801/15 y modificatorias). El SGA forma parte de un marco de acción reconocido a nivel mundial que implica la adopción de un etiquetado claro y uniforme.

Es fundamental observar y comprender las indicaciones que poseen los envases de los productos químicos utilizados en el laboratorio. A continuación se presentan algunos ejemplos de etiquetas y pictogramas de peligrosidad.

Ejemplo de etiqueta del SGA



Referencias

1. Identificación del fabricante / proveedor / distribuidor.
2. Indicaciones de peligro.
3. Pictogramas.
4. Consejos de prudencia.
5. Palabras de advertencia.
6. Nombre del producto químico.



Etiqueta de productos químicos y Pictogramas de peligrosidad. En las etiquetas de algunos reactivos pueden encontrarse 1 o 2 pictogramas, estos símbolos muestran gráficamente el grado de peligrosidad de la sustancia etiquetada. Tomado de la Superintendencia de riesgos del trabajo, Ministerio de trabajo empleo y seguridad social, Presidencia de la Nación.

PICTOGRAMAS DE PELIGROSIDAD: EXPLICACIÓN DE LOS TÉRMINOS

Corrosivos: las sustancias y preparados que en contacto con tejidos vivos puedan ejercer una acción destructiva de los mismos.

Irritantes: las sustancias y preparados no corrosivos que por contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas puedan provocar una reacción inflamatoria.

Tóxicos: las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades puedan provocar efectos agudos o crónicos, o incluso la muerte.

Muy tóxicos: las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea en muy pequeña cantidad puedan provocar efectos agudos o crónicos o incluso la muerte.

Inflamables: las sustancias y preparados líquidos cuyo punto de ignición sea bajo. Identifica a aquellas sustancias que se inflaman por un contacto breve con una fuente de ignición y después de haberse separado de dicha fuente de ignición continúan quemándose.

Fácilmente inflamables: las sustancias y preparados que puedan calentarse e inflamarse en el aire a temperatura ambiente sin aporte de energía, o sólidos que puedan inflamarse fácilmente tras un breve contacto con una fuente de inflamación y que sigan quemándose o consumiéndose una vez retirada dicha fuente, o en estado líquido cuyo punto de inflamación sea muy bajo, o que en contacto con agua o con aire húmedo desprendan gases extremadamente inflamables en cantidades peligrosas.

Extremadamente inflamables: las sustancias y preparados líquidos que tengan un punto de inflamación extremadamente bajo y un punto de ebullición bajo, y las sustancias y preparados gaseosos que a temperatura y presión normales sean inflamables en el aire. Identifica a aquellas sustancias que a temperatura ambiente y en contacto con el aire arden espontáneamente.

Explosivos: las sustancias y preparados sólidos, líquidos, pastosos o gelatinosos que, incluso en ausencia de oxígeno del aire, puedan reaccionar de forma exotérmica con rápida formación de gases y que, en condiciones de ensayo determinadas, detonan, deflagran rápidamente o explotan bajo el efecto del calor en caso de confinamiento parcial. Identifica a aquellas sustancias que pueden hacer explosión por efecto de una llama, choque o fricción.

Comburentes: las sustancias y preparados que en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica.

Nocivos: las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan provocar efectos agudos o crónicos, o incluso la muerte.

Peligrosos para el medio ambiente: las sustancias o preparados que en contacto con el medio ambiente, presenten o puedan presentar un peligro inmediato o futuro para uno o más componentes del medio ambiente.

CAPÍTULO 2: GENERALIDADES SOBRE CÉLULA, TEJIDOS y ÓRGANOS

La célula es la unidad morfológica y funcional que constituye a los seres vivos. Las células vegetales y animales poseen amplias similitudes y numerosas estructuras en común. Sin embargo, las células vegetales poseen características particulares que les confieren sus capacidades únicas, entre ellas las más importantes son las vacuolas, los plástidos, en especial los cloroplastos y la presencia de pared celular.

VACUOLAS

Son orgánulos limitados por una membrana simple denominada tonoplasto, bastante más fina que la membrana plasmática. Su origen es variable, ya sea a partir del retículo endoplásmico, de los dictiosomas o de invaginaciones del plasmalema. El tamaño y número de las vacuolas en una célula varía con la edad de la misma, una célula joven posee numerosas vacuolas pequeñas, pero a medida que la célula envejece, muchas vacuolas pequeñas confluyen constituyendo una grande. En una célula parenquimática diferenciada, por ejemplo, llega a ocupar el 90% del espacio celular.

El contenido vacuolar es de composición variable, siendo el agua el principal componente (90%) en el que se hallan disueltas sustancias orgánicas como hidratos de carbono, proteínas, ácidos orgánicos, taninos o pigmentos solubles en agua. Por su parte, las vacuolas pueden contener sustancias inorgánicas como iones de calcio, potasio, sodio y fosfato. Estos forman sales minerales, Oxalato de Calcio, el Carbonato de Ca y el Anhídrido de Si, que son los depósitos inorgánicos más comunes en células vegetales. Si la concentración de dichas sales es elevada, se forman cristales simples o reunidos en estructuras compuestas. Por ejemplo, los rafidios tienen forma de agujas y se presentan adosadas lateralmente formando manojos. Otras veces los cristales se agregan en drusas, o se agrupan en grandes cantidades formando areniscas cristalinas.

La función de la vacuola depende del tipo de célula en la que se encuentre. En general, representan el lugar donde se almacenan agua y productos celulares o intermediarios metabólicos durante el crecimiento de la célula. Gracias a eso y a la semipermeabilidad del tonoplasto, crean un gradiente osmótico otorgando la turgencia necesaria que contribuye al sostén de la planta. Por su parte, la vacuola también participa en la regulación del pH de la célula; tiene un papel preponderante en aquellas plantas que tienen metabolismo CAM; son responsables de la digestión de otros componentes celulares (autofagia); entre otros.

Por último, las vacuolas pueden contener pigmentos hidrosolubles que les dan colores a los órganos, antocianinas para colores vivos (azules, violetas, rojos purpúreos) y antoxantinas para colores más pálidos (amarillos, marrones). Por ejemplo, las células de pétalos y frutos cuentan con vacuolas que almacenan estos pigmentos, contribuyendo a la atracción de insectos y otros animales que intervienen en la polinización y la dispersión de semillas.

PLÁSTIDOS

Son orgánulos limitados por doble membrana, que contienen su propio genoma y son capaces de autoduplicarse. Su forma, número, tamaño y función es variable según el tipo celular. En su interior se encuentran el estroma o matriz y un sistema de membranas que

pueden ser laminillas o tilacoides.

Los plástidos adultos pueden ser de tres tipos:

Coloreados por la presencia de pigmentos y fotosintéticamente activos: Los cloroplastos presentan principalmente clorofila que les da un color verde; los feoplastos presentan xantófila o fucoxantina y son pardos (en algas pardas); los rodoplastos poseen principalmente ficoeritrina que les confiere color rojo y ficocianina color azul (en algas rojas).

Los Cloroplastos son los plástidos más complejos y frecuentes en las plantas y los de mayor importancia biológica, ya que constituyen el lugar donde se realiza la fotosíntesis. Son orgánulos abundantes en las hojas, pero se encuentran distribuidos en todas las partes verdes de los vegetales.

Los cloroplastos están rodeados por una doble membrana plasmática. En las plantas superiores, presentan un sistema de laminillas que cruza el estroma formando tabiques horizontales denominadas laminillas estromáticas y pilas de laminillas cortas o tilacoides que se disponen unas sobre otras como monedas, constituyendo los grana (grana es el plural de granum = grano en latín). En este sistema de laminillas se disponen las moléculas de clorofila y de otros pigmentos accesorios, como los carotenos (anaranjados o rojizos) y los xantófilos (amarillos), ocultos por el color verde de la clorofila. Las moléculas de clorofila a y b son los dos tipos de pigmentos complementarios en la absorción de la energía solar; la clorofila a es el fotorreceptor directo en la fotosíntesis y los otros pigmentos son capaces de ceder la energía absorbida a la de la clorofila a.

Coloreados por la presencia de pigmentos, pero fotosintéticamente inactivos: Los cromoplastos son cloroplastos modificados que por acumulación de pigmentos distintos de la clorofila, como caroteno, xantofilas y licopeno, y adquieren colores anaranjado, amarillo o rojo. El licopeno da color al tomate y el caroteno otorga color naranja a la zanahoria. Estos pigmentos no intervienen en la fotosíntesis y durante la transformación de cloroplastos en cromoplastos, se acumulan formando cristales o asociados a glóbulos de lípidos.

Por ser responsables de los colores de los frutos maduros, de las flores y brácteas, ayudan en la atracción de animales, generalmente insectos o aves, encargados de facilitar la polinización y diseminación.

Plástidos sin pigmentos o incoloros y, por lo tanto, no fotosintéticos: Los Leucoplastos son plástidos que no poseen pigmentos, pero si acumulan sustancias de reserva como aceites, proteínas o más comúnmente almidón. En este último caso reciben el nombre de amiloplastos siendo frecuentes en semillas y órganos reservantes como el tubérculo de *Solanum tuberosum* L. "papa". El almidón se denomina almidón de reserva y se produce y acumula en el estroma del leucoplasto, es sintetizado allí a partir de los azúcares generados en los cloroplastos durante la fotosíntesis. El almidón puede ser simple o compuesto según se forme uno sólo o muchos granos de almidón respectivamente en cada amiloplasto. La polimerización se realiza en los granos a partir de un punto inicial llamado hilo, esto puede realizarse en capas concéntricas como el almidón de semillas de cereales o en capas excéntricas como el almidón de los tubérculos.

PARED CELULAR

Una de las más significativas características de las células vegetales es la presencia de una cubierta semirrígida que rodea al plasmalema. La pared celular es gruesa, resistente y organizada; su espesor varía entre 0,1 μm hasta muchos micrómetros y está estrechamente adosada a la superficie externa de la membrana plasmática de la célula. Su función es dar forma a la célula y proteger al citoplasma, confiriendo solidez al cuerpo de la planta. Está constituida por dos fases: la fase fibrilar y la fase amorfa o matriz.

La fase fibrilar es inerte, rígida, discontinua, formada por fibrillas entrecruzadas constituidas por largas moléculas de celulosa en la mayoría de los vegetales o de xilanos en pocas algas. La celulosa es el principal hidrato de carbono que compone la pared celular y es un polisacárido (fórmula empírica: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_{15}$) formado por cadenas lineales de monómeros de glucosa repetidos. Estas cadenas lineales no se hallan dispuestas al azar, sino orientadas según un sistema cristalográfico por lo que se comporta como una sustancia cristalina ante la luz polarizada. Un pequeño conjunto de moléculas de celulosa alineadas constituye una micela. El conjunto de micelas constituye una microfibrilla. Estas se pueden asociar en haces formando las macrofibrillas.

La fase amorfa es una fase continua interfibrilar, constituida por sustancias pécticas y hemicelulosas (es decir, sustancias no celulósicas). Los compuestos pécticos son carbohidratos, formados por la unión de numerosas moléculas lineales de ácido galacturónico. Debido a la presencia de grupos carboxilos, forman sales de calcio y magnesio que son insolubles en agua. Constituyen sustancias coloidales amorfas y plásticas. Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de carbohidratos como xilanos, glucanos y mananos, que se diferencian de la celulosa por su solubilidad.

Otras sustancias pueden formar parte de la pared celular y según su localización son sustancias incrustantes y sustancias adcrustantes.

Sustancias incrustantes

Son las que impregnan la matriz de la pared celular como la lignina, taninos y sustancias minerales.

Lignina: Es uno de los más importantes componentes de la pared secundaria y, después de la celulosa, el polímero vegetal más abundante. Es una sustancia carbonada, pero no un hidrato de carbono, sino un polímero del alcohol coniferílico. Se deposita en células que han terminado de alargarse. Comúnmente la lignina no ocupa toda la matriz, sino que puede ser incrustada por taninos o sustancias minerales. La lignina da a la pared celular resistencia a la fuerza de compresión. Puede incrustar no sólo la pared secundaria sino también al cemento péctico y a la pared primaria. Sucede lignificación en células del esclerénquima y del xilema principalmente.

Taninos: Son grupos heterogéneos de compuestos fenólicos. Se los encuentra comúnmente en hojas pero también incrustando la matriz celular en el leño tardío y en el duramen, en la peridermis y en el tegumento de muchas semillas. Son sustancias insolubles y coloreadas, causantes del sabor amargo de muchos frutos y del té.

Sustancias Minerales: Son principalmente sílice y carbonato de calcio. La deposición de estas sustancias se hace en forma pasiva, son simplemente sustancias minerales que quedan como restos al producirse la evaporación del agua.

Sustancias adcrustantes

Son las que se depositan sobre la pared celular ya sea por dentro o por fuera de ella.

Calosa: Es un hidrato de carbono formado por moléculas de glucosa dispuestas helicoidalmente (a diferencia de la celulosa, donde la disposición es lineal), ello hace que estas sustancias tengan distintas características y propiedades. Se deposita con gran rapidez, siempre que sea necesario aislar temporariamente una o más células. Por ejemplo, después de dañada la corteza de un tallo se forma rápidamente en las puntuaciones, bloqueando la conexión entre los tejidos sanos y los dañados. Se encuentra en las placas cribosas del floema o en los tubos polínicos cuando crece a través del estilo.

Mucílagos: Se distinguen mucílagos celulósicos que contienen microfibrillas y mucílagos pécticos que son amorfos. Frecuentemente son productos de la desorganización de paredes celulares hidrolizadas. Se encuentran en el lado externo de la pared celular en células epidérmicas de la mayoría de las plantas acuáticas y en el tegumento de muchas semillas.

Ceras: Se hallan asociadas con la suberina y la cutina o son secretadas sobre la superficie de las paredes aéreas de un vegetal incluyendo frutos y semillas.

Cutina: Se deposita sobre la pared externa de las células epidérmicas, junto con la hemicelulosa forma varias capas cuticulares; la cutícula queda en contacto con el exterior.

Suberina: Como la cutina, es una sustancia impermeable, pero la suberina puede ser disuelta por soluciones acuosas de álcali en ebullición. Además, la suberificación tiene lugar hacia adentro y la cutinización hacia afuera de la pared primaria. Se deposita asociada a la celulosa principalmente en células de la peridermis que constituyen el súber o corcho. En estas células, por dentro de la pared secundaria con suberina, hay deposición de celulosa, que puede ser interpretada como pared terciaria.

Esporopolenina: Es un polímero de carotenoides y probablemente el compuesto orgánico más resistente que existe. Se encuentra recubriendo los granos de polen y otras esporas, protegiéndolas de la descomposición, lo que ha permitido su perfecta conservación en restos fósiles.

ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR

La pared celular está compuesta de afuera hacia adentro de la célula por: laminilla media, pared primaria, pared secundaria y pared terciaria, en pocos casos.

Laminilla media, sustancia intercelular o cemento péctico: Une las células contiguas, su estructura es amorfa careciendo de fibrillas.

Pared primaria: Está siempre presente, es la primera pared formada por la célula y es depositada a uno y otro lado de la laminilla media por células contiguas. Consta de una capa formada por fase fibrilar y amorfa. La pared primaria se deposita cuando la planta está en desarrollo y aumenta en superficie a medida que la célula crece. Todas las células meristemáticas tienen pared primaria y también, las células maduras poco diferenciadas que aún conservan contenido vivo.

Pared secundaria: No todas las células presentan pared secundaria. Esta se forma después que la célula ha completado su elongación y por lo tanto, es más rígida se deposita sobre el lado interno de la ya existente pared primaria, hacia el lumen celular. Está formada por fase fibrilar y amorfa, pero la hemicelulosa tiene relativamente menos importancia que en la pared primaria. El número de capas de la pared secundaria es variable. Así, en traqueidas de Coníferas encontramos tres capas que presentan fibrillas paralelas entre sí, pero la orientación difiere entre cada una de las tres capas. En tubos laticíferos de *Euphorbia splendens*, la pared secundaria presenta muchas capas, difiriendo cada una de ellas en la orientación de las fibrillas. Está generalmente bien desarrollada en células muertas al completar su diferenciación, tal como esclereidas, fibras y elementos de vasos. La pared secundaria proporciona resistencia mecánica a la célula. Una sustancia incrustante que frecuentemente se deposita en ella es la lignina. La lignificación puede comenzar en la pared primaria o en la laminilla media.

Pared terciaria: Se forma por dentro de la pared secundaria hacia el lumen celular. En traqueidas de Coníferas constituye la llamada capa verrugosa, probablemente no celulósica, aunque para otros autores la capa verrugosa es la última deposición en la pared secundaria. En células del súber puede formarse una pared terciaria celulósica, por dentro de la pared secundaria con suberina.

ORIGEN Y FORMACIÓN DE LA PARED CELULAR

En la telofase mitótica se origina en el plano ecuatorial del fragmoplasto, la placa celular. Esta se forma por vesículas que derivan de los dictiosomas y del retículo endoplasmático; el contenido de estas vesículas origina la laminilla media y fase amorfa de la pared primaria y la membrana de dichas vesículas formarán el plasmalema. Los orgánulos citoplásmicos involucrados en la formación de la pared celular son: retículo endoplasmático, dictiosomas y microtúbulos.

La pared primaria se deposita hacia el interior de las nuevas células, entre la laminilla media y el plasmalema. La síntesis de microfibrillas de celulosa (fase fibrilar) es llevada a cabo por enzimas situadas en el plasmalema, la cual se ha sugerido que ocurren en forma de rosetas. Cada roseta origina una microfibrilla. En la pared primaria las rosetas se disponen de manera desordenada. En los dictiosomas se ensamblan los complejos de rosetas que son liberados a nivel del plasmalema mediante vesículas.

La pared secundaria se deposita hacia el interior de la primaria, pero, en este caso, las rosetas se disponen de manera ordenada.

La pared celular crece en espesor y en longitud. El crecimiento en espesor es ocasionado por aumento de matriz y nueva deposición de fibrillas, lo cual puede hacerse de dos formas: por aposición y por intususcepción. Por aposición, las nuevas fibrillas se disponen encima de

las ya existentes. Por intususcepción, las nuevas fibrillas se intercalan entretejiéndose con las que se formaron anteriormente. Se considera que la formación de paredes primarias se realiza principalmente por el mecanismo de aposición.

CONEXIONES INTERCELULARES

Por la existencia de la pared celular rígida, el intercambio de sustancias entre células vecinas se haría difícil y los citoplasmas estarían aislados, si no hubiera conexiones especiales que comunican todas las células de un vegetal.

Podemos diferenciar los siguientes tipos de conexiones intercelulares:

1) Plasmodesmos

Son conexiones citoplásmicas entre células adyacentes. Prolongaciones del retículo endoplasmático, que atraviesan la pared celular formando un sistema de membranas que ponen en comunicación núcleos de células vecinas.

La porción del retículo endoplasmático que atraviesa el centro del plasmodesmo y tiene forma tubular se llama desmotúbulo.

En sección transversal los plasmodesmos muestran una doble membrana rodeando el lumen. La unidad de membrana externa corresponde al plasmalema y la interna es la membrana del retículo endoplasmático. Entre ambas hay una matriz citoplásmica y el lumen está ocupado por enquilema. Pueden encontrarse distribuidos al azar o agrupados en zonas de la pared primaria adelgazada constituyendo un campo de puntuación primaria. En el límite del campo de puntuación primaria, las fibrillas de la pared primaria se disponen circularmente formando un anillo más engrosado a su alrededor.

Se presentan en células que sólo tienen pared primaria, como las células meristemáticas y las derivadas poco diferenciadas que no forman pared secundaria; por ejemplo, algunos tipos de células parenquimáticas.

2) Puntuaciones

Son discontinuidades en la deposición de la pared secundaria, a nivel de un campo de puntuación primaria sobre el que pueden formarse en número de una o más, o también, diferenciarse en zonas donde no hubo campos de puntuación.

En una puntuación podemos distinguir: la membrana de cierre, formada por la laminilla media y pared primaria adelgazada; la cámara de la puntuación, formada por la discontinuidad de la deposición de pared secundaria, a veces tapizada por una capa verrugosa y la abertura de la puntuación, que es el orificio de comunicación entre la cámara de la puntuación y el lumen celular. Cuando el espesor de la pared secundaria es grande, hay un canal de la puntuación, donde pueden distinguirse una abertura interna, que se halla hacia el lumen de la célula y una abertura externa hacia la membrana de cierre.

Se distinguen dos tipos principales de puntuaciones: puntuaciones simples y puntuaciones rebordeadas o areoladas.

Puntuaciones simples: Son aquellas cuyos bordes terminan bruscamente, careciendo por lo tanto de reborde. Se presentan en ciertas células parenquimáticas, en fibras libriformes y esclereidas. Si el engrosamiento de la pared secundaria es muy grande, la cavidad de la puntuación tiene forma de canal que va desde el lumen celular hasta la membrana de cierre. A

veces este canal que presenta una sola abertura hacia el lumen celular, puede asociarse durante su recorrido con los canales de dos o más puntuaciones constituyendo un canal ramificado; en este caso se forma una puntuación simple ramificada.

Puntuaciones areoladas o rebordeadas: Son aquellas en las que la pared secundaria forma un reborde sobre la cámara de puntuación. Son de estructura más compleja y más variable que las simples. Se presentan principalmente en fibrotraqueidas y elementos conductores del xilema (vasos y traqueidas). Las aberturas interna y externa pueden diferir en tamaño y forma: la interna es más bien lenticular o lineal y la externa más pequeña y circular. La forma de la abertura puede concordar o no con el contorno de la cámara.

La típica puntuación areolada puede presentar modificaciones. Con el aumento en espesor de la pared, la abertura interna llega a ser tan larga en una dirección que puede alcanzar lateralmente los límites de la cámara e incluso sobrepasarlos. Si la abertura interna es relativamente grande y de contorno lineal o lenticular y la externa es pequeña y circular, el canal tiene forma de embudo aplanado. Este tipo de puntuación con reborde reducido es común en fibrotraqueidas. Los vasos de Angiospermas tienen a menudo puntuaciones rebordeadas ovaladas cuya abertura es también oval.

En "Gimnospermas", las puntuaciones areoladas presentan toro. La pared primaria a la altura de la cavidad de la puntuación está diferenciada en un espesamiento central, el toro y una zona marginal más delgada, el margo u orla. El toro es un engrosamiento de la pared primaria cuyo diámetro es ligeramente mayor que el poro o abertura de la puntuación. En la parte central del toro, las fibrillas de la pared primaria están dispuestas irregularmente. Limitando al toro las fibrillas se disponen en forma de anillo y en la zona del margo, la disposición es radial.

En elementos conductores, el paso del agua de una célula a otra se realiza a través de la puntuación interviniendo el toro en la regulación de dicho mecanismo. Cuando el toro está en posición media, el agua pasa libremente a través del margo que presenta poros. Cuando el toro se halla adosado a una de las aberturas de la puntuación, actúa como un obturador impidiendo el paso del líquido. Cuando la célula deja de funcionar, el toro queda apoyado en una de las aberturas.

3) Perforaciones

Una perforación es un orificio en la pared celular con interrupción de la pared secundaria, primaria y laminilla media. Se presenta en los miembros de vasos del xilema y elementos cribosos, donde constituyen la placa perforada y la placa cribosa, respectivamente.

TEJIDOS EN PLANTAS SUPERIORES

Se entiende por tejido a una asociación de células, estrechamente relacionadas entre sí desde su origen. Está formado por células semejantes entre sí o bien, por células diferentes, al estado adulto, pero que tiene un origen común y se especializa para cumplir una función determinada.

Tejidos meristemáticos

Están integrados por células no diferenciadas. Las células meristemáticas tienen normalmente pared delgada con campos de puntuaciones primarias. Generalmente, son ricas

en citoplasma, los plástidos se encuentran en estado de proplástidos, las vacuolas son pequeñas y repartidas en todo el citoplasma, tienen menor cantidad de retículo endoplásmico, la estructura interna de las mitocondrias es poco compleja, están desprovistas de material de reserva y cristales. La relación entre el tamaño de las células y del núcleo (relación cito-nuclear) varía considerablemente.

Tejidos adultos

Son todos los tejidos cuyas células han perdido el carácter embrionario debido a la diferenciación, sufriendo transformaciones en las características de las células que afectan al núcleo, al citoplasma y a la pared celular, en mayor o menor grado.

Entre las primeras podemos mencionar: aumento en número y tamaño de vacuolas; acumulación de sustancias ergásticas (taninos, almidón, sustancias minerales, etc.); desarrollo de plástidos y adquisición de pigmentos; pérdida de algunos componentes del núcleo y citoplasma o su total desaparición (en células muertas).

Los cambios en la pared celular abarcan: aumento en superficie y en espesor de la pared, que puede realizarse de dos maneras, por intususcepción y por aposición. El primero se realiza por la disposición de nuevas fibrillas de celulosa entre las que ya estaban con anterioridad. El segundo por el depósito de capas de fibrillas sobre las ya existentes, se realiza hacia el interior de la célula, disminuyendo su volumen interno (lumen). Paralelamente, ocurren cambios en su composición química por agregado de sustancias incrustantes y adcrustantes.

Clasificación de los tejidos adultos

Según su origen, pueden agruparse en 3 sistemas de tejidos:

Sistema dérmico: derivado de la protodermis o el felógeno.

Sistema fundamental: originado del meristema fundamental.

Sistema vascular: formado por el procámbium o el cámbium.

Las estructuras secretoras constituyen una categoría aparte, no forman un tejido determinado, sino que se encuentran dentro de otros o en la superficie de la planta.

1) Tejidos del sistema dérmico

Son los que recubren superficialmente el cuerpo de las plantas, estableciendo el límite con el exterior (ver Capítulo de Epidermis). Comprende la epidermis, que recubre el cuerpo primario de la planta y cuyas células están recubiertas externamente por la cutícula. Está compuesta por células epidérmicas propiamente dichas, que generalmente son aplanadas y células especializadas con gran diversidad de formas, por ejemplo las oclusivas de los estomas, encargadas de regular el intercambio gaseoso entre el exterior e interior de la planta; los tricomas o pelos que tienen por función proteger y limitar la transpiración, secretar sustancias, o en el caso de los pelos radicales realizar la absorción.

En los tallos y raíces con crecimiento secundario, la epidermis es comúnmente sustituida por la peridermis. Se origina en el felógeno, que aparece cerca de la superficie de estos órganos, formando: súber o corcho hacia fuera y felodermis hacia adentro. Las células suberosas son más o menos, prismáticas y de paredes suberificadas. Las de la felodermis son parenquimáticas.

2) Tejidos del sistema fundamental

Son el parénquima, el colénquima y el esclerénquima.

Las células parenquimáticas son generalmente isodiamétricas, vivas con núcleo y citoplasma y conservan la capacidad de dividirse. La pared celular es delgada, primaria, aunque en algunos casos, puede estar engrosada e incrustada con distintas sustancias. Cumplen diferentes funciones, tales como la fotosíntesis, almacenamiento, secreción, etc. Son asiento de todas las actividades vitales de la planta.

El colénquima y el esclerénquima se especializan como tejidos de sostén o mecánicos y dan resistencia y solidez a las plantas.

El colénquima es un tejido vivo, formado por células prismáticas. La pared celular presenta peculiaridades que son características de este tejido. Se encuentran en ella espesamientos de naturaleza celulósica, con abundantes sustancias pécticas y agua. Posee gran plasticidad, debido al alto contenido en pectinas y agua. Esta característica se relaciona con la presencia de este tejido en órganos en crecimiento ya que permite que las células se estiren a medida que crece el órgano. En cuanto al contenido celular, son células vivas al estado adulto. Presentan a veces tanino o almidón. En general, puede decirse que son muy parecidas a las células parenquimáticas.

El esclerénquima está por lo general constituido por elementos muertos en la madurez. Por esta razón, no puede seguir creciendo y aparece exclusivamente en los lugares de la planta que han concluido su alargamiento. Las células se caracterizan por el fuerte engrosamiento de las paredes, que frecuentemente son lignificadas. De acuerdo a la forma se distinguen dos tipos de células: las fibras (en forma de huso), células fusiformes y las esclereidas de variadas formas.

3) Tejidos del sistema vascular o conductor

En el cuerpo primario de la planta está compuesto por el xilema y el floema primarios. Ambos son tejidos complejos que desempeñan las siguientes funciones:

- a) conducción de agua y solutos (el xilema) y de sustancias orgánicas (el floema).
- b) sostén y c) almacenamiento.

Estas funciones variadas se traducen en una complejidad estructural, interviniendo en su composición células conductoras, de sostén y de almacenamiento.

El xilema primario, tejido conductor de savia bruta presenta como elementos conductores los miembros de vasos y las traqueidas. Los primeros son células muertas, con paredes celulares secundarias, generalmente lignificadas y con pares de puntuaciones areoladas. Son alargados y a veces anchos y se ponen en comunicación por sus extremos mediante las placas perforadas formando en conjunto largos tubos denominados vasos. Las traqueidas también son células muertas, son igualmente gruesas y lignificadas, más largas que los miembros de los vasos y poseen únicamente puntuaciones areoladas, careciendo de placas perforadas. Las células de sostén son fibras y esclereidas. Las de almacenamiento son parenquimáticas.

El floema primario, tejido conductor de savia elaborada, posee miembros de tubo criboso o las células cribosas como células conductoras. Los miembros de tubos cribosos son células vivas, alargadas, con citoplasma modificado y mezclado con el contenido del núcleo y las vacuolas. La pared celular está provista de zonas especializadas denominadas placas cribosas, con perforaciones que ponen en comunicación los miembros de tubos cribosos por sus extremos, formándose de esta manera los tubos cribosos. Las células cribosas son menos especializadas, generalmente conservan su núcleo y poseen áreas cribosas en las paredes terminales y laterales. Otras células del floema que se presentan asociadas a los miembros de

tubos cribosos son las células acompañantes. Además, se encuentran fibras y parénquima como elementos de sostén y almacenamiento, respectivamente.

En Dicotiledóneas y “Gimnospermas” que poseen crecimiento secundario, se agregan al sistema vascular primario, el xilema y floema secundarios. Éstos se caracterizan por la ordenación de sus células en un sistema vertical, con los mismos tipos de células que el xilema y floema primarios, derivado de las células iniciales fusiformes del cámbium y un sistema horizontal, que consta especialmente de células parenquimáticas derivadas de las iniciales radiales del cámbium (ver capítulo de leño).

4) Estructuras secretoras

No forman un tejido sino que se presentan dentro de otros tejidos como estructuras especializadas en la secreción. Se distinguen: a) Las estructuras secretoras externas, cuando vierten el producto de secreción al exterior de la planta, y b) las estructuras secretoras internas que contienen a la secreción y no la vierten al exterior.

Las estructuras secretoras externas, pueden ser de origen exclusivamente epidérmico o estar formadas, además, con la intervención de parénquima y tejidos vasculares. Las internas, están incluidas en los tejidos fundamentales y en los conductores.

ÓRGANOS VEGETATIVOS ESTRUCTURA DE HOJA

Epidermis: Las hojas carecen de crecimiento secundario, por lo que la epidermis persiste durante toda su vida como tejido de protección. Por lo general, hay una sola capa de células epidérmicas, pero la epidermis pluriestratificada se presenta con cierta frecuencia en hojas (ver Capítulo de Epidermis).

Mesofilo: está representado por la mayor parte del tejido fundamental de la hoja. Éste se caracteriza por la abundancia de cloroplastos y por la presencia de un gran sistema de espacios intercelulares predominantemente esquizógenos que señalan a la hoja como órgano fotosintetizante.

El mesofilo puede ser relativamente homogéneo o puede estar diferenciado en un parénquima en empalizada y un parénquima esponjoso. El parénquima en empalizada está formado por células altas, alargadas en sentido perpendicular a la superficie de la hoja. El parénquima esponjoso, en cambio, consiste de células de varias formas, frecuentemente irregulares, alargadas en igual dirección que las células en empalizada y conectadas entre sí por expansiones laterales, o bien, con mayor frecuencia alargadas paralelamente a la superficie de la hoja.

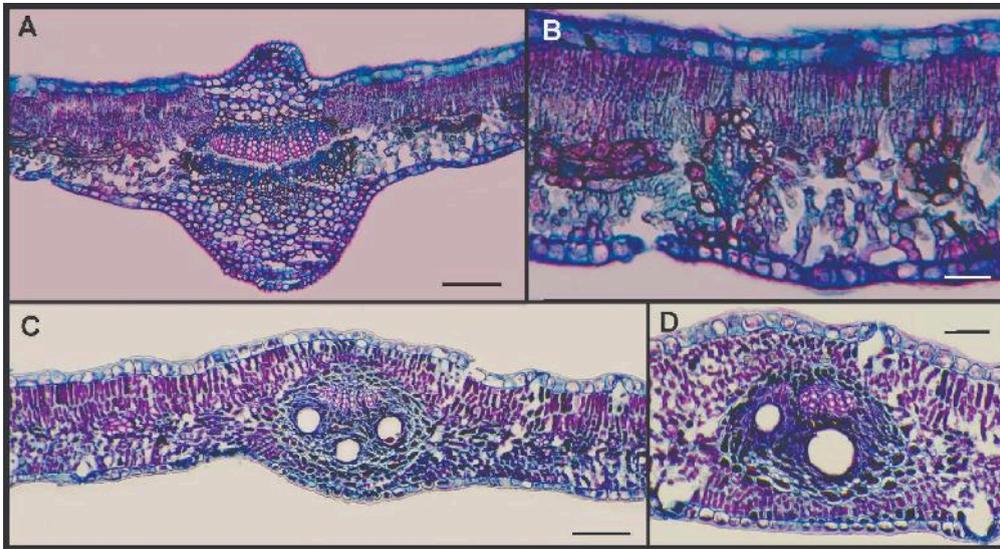
Según el tipo de clorénquima y su disposición en el mesofilo, la estructura foliar puede ser **dorsiventral o bifacial, isolateral, Kranz y homogénea.**

Como tejido de sostén encontramos típicamente colénquima, por debajo de la epidermis en la vena media y a menudo en el borde del limbo. Muchas hojas presentan esclereidas en el mesofilo. En hojas de Monocotiledóneas, se forma relativamente gran cantidad de esclerénquima en asociación con los haces vasculares o en cordones separados.

Sistema vascular: las hojas presentan un sistema de haces conductores cuya estructura casi siempre, se corresponde con la que presentan en el tallo. Pueden ser colaterales, con xilema hacia la superficie adaxial y el floema hacia la abaxial o bicolaterales. En Eudicotiledóneas, los haces conductores se hallan incluidos en vainas de células parenquimáticas alargadas dispuestas en forma paralela al curso de los mismos: es la vaina del haz.

Sin embargo, en muchos casos estas células no se diferencian por su tamaño y/o contenido del parénquima del mesofilo. A veces, células similares a las de la vaina se extienden hasta la epidermis, hacia una o ambas caras de la hoja, constituyendo las extensiones de la vaina. Tanto la vaina como las extensiones, toman parte activa en los procesos de conducción.

En Monocotiledóneas también, existen vainas en los haces; puede haber una sola o doble vaina bordeando los haces. En el último caso, la vaina interna o mestomática, limita con el tejido vascular y posee células de paredes relativamente engrosadas sin cloroplastos y la vaina externa es parenquimática, rodea a la anterior y sus células poseen cloroplastos.



Hoja. corte transversal por A: vena media y B: mesofilo de *Kageneckia lanceolata* Ruiz & Pav. C: vena media y D: detalle de *Schinus fasciculatus* (Griseb.) I. M. Johnst. Escala: A y C: 100 μ m. B y D: 50 μ m.

TIPOS DE ESTRUCTURA FOLIAR

Estructura dorsiventral o bifacial: Con parénquima en empalizada en la cara adaxial y parénquima esponjoso en la abaxial.

Estructura isolateral: Con parénquima en empalizada en ambas caras y parénquima esponjoso en el centro.

Estructura Kranz: El parénquima en empalizada se dispone concéntricamente en una o más capas alrededor de la vaina del haz. Por dicha característica, este tipo de estructura se conoce como tipo "Kranz" Las células de la vaina del haz son grandes y cilíndricas; poseen

abundantes cloroplastos.

Estructura homogénea: Carecen de parénquima en empalizada desarrollado; la mayoría del tejido fotosintético es clorénquima esponjoso.

ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA RAÍZ

La estructura primaria de la raíz presenta: epidermis o rizodermis, corteza y cilindro central.

Epidermis: Es típicamente uniestratificada. En la zona pilífera forma pelos absorbentes que se originan de tricoblastos. Un ejemplo de epidermis pluriestratificada es el velamen de las raíces aéreas de orquídeas y de Aráceas epífitas.

Corteza: Constituida por tejido parenquimático, que usualmente carece de clorofila excepto en las raíces de algunas plantas acuáticas y epífitas. En aquellas plantas que no poseen crecimiento secundario puede diferenciarse esclerénquima. Algunas raíces presentan una capa cortical externa con características parecidas a la endodermis que se llama exodermis.

Endodermis: Está en el límite entre corteza y cilindro central. Tiene células prismáticas, con un engrosamiento en forma de banda, ubicado en las paredes anticlinales, que recibe el nombre de banda de Caspary.

Cilindro central: Constituido por sistema vascular (floema y xilema) y parénquima asociado (periciclo y médula cuando existe).

Periciclo: Está formado por células parenquimáticas que se disponen por dentro de la endodermis, pudiendo ser uni o pluriestratificado. En Espermatófitas posee actividad meristemática y sus funciones son originar raíces laterales, formar el felógeno en la mayoría de las raíces y originar parte del cámbium.

Sistema vascular: Constituido por cordones de xilema y floema primario que alternan entre sí, originados por el procámbium. Generalmente, el metaxilema ocupa todo del centro de la raíz por lo que no hay médula. El xilema es exarco, es decir, el protoxilema se localiza cerca del periciclo. El metaxilema se forma hacia el centro, por esto la diferenciación es centrípeta. La diferenciación en el floema es también centrípeta, es decir, que el protofloema queda hacia afuera y el metafloema se forma hacia el centro.

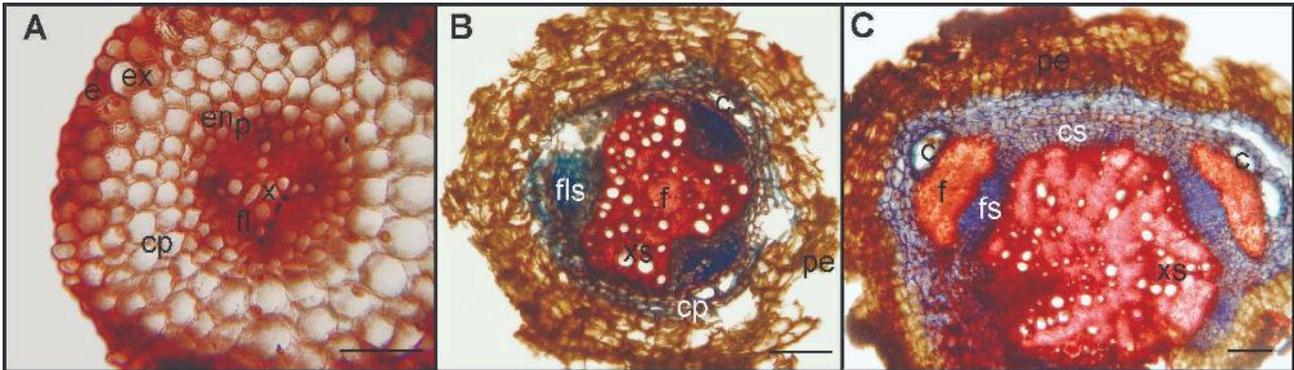
Según una raíz tenga uno, dos, tres, cuatro o más cordones o polos de protoxilema, se dice que es monarca, diarca, triarca, tetrarca o poliarca. En Monocotiledóneas, las raíces son comúnmente poliarcas; en Eudicotiledóneas son triarcas o tetrarcas; en *Pinus* sp. se observaron raíces poliarcas y en Araucariáceas se encontraron raíces monarcas.

ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA RAÍZ

El crecimiento secundario se produce por la actividad de los meristemas laterales cámbium y felógeno. El cámbium se forma como una banda ondulada, por dentro del floema a partir del procámbium, y por fuera del xilema por divisiones periclinales del periciclo. Produce hacia adentro xilema secundario y hacia afuera floema secundario, y adquiere pronto un contorno circular debido a que su actividad es mayor frente al floema, produciendo allí una mayor cantidad de xilema secundario. El xilema primario queda en el centro; mientras que el floema

primario aplastado queda hacia afuera, permaneciendo a veces sólo las fibras. Aparecen radios xilemáticos a partir de las células radiales del cámbium.

La epidermis es comúnmente sustituida por la peridermis. El felógeno tiene su origen en el periciclo y produce súber o corcho hacia fuera y felodermis hacia adentro. El resto de los tejidos más externos, corteza y epidermis mueren y caen constituyendo el ritidoma. El crecimiento secundario es característico de "Gimnospermas" y Angiospermas leñosas. Algunas Monocotiledóneas pueden presentar crecimiento secundario, pero este es a partir de células de la corteza que readquieren actividad meristemática.



RAÍZ. Preparados temporarios de corte transversal por raíz embrionaria. A: Estructura primaria. B: Comienzo del crecimiento secundario. B: Raíz con crecimiento secundario. *Austroflourensia thurifera* (Molina) J.C. Ospina & S.E. Freire. Escala A: 100µm.. B y C: 200µm.

ESTRUCTURA PRIMARIA DEL TALLO

La disposición de los tejidos primarios en el eje del brote varía en las plantas vasculares y determina las características propias de la estructura primaria del tallo. Las principales variaciones se deben a diferencias en la distribución relativa de los tejidos fundamental y vascular.

El sistema fundamental forma una zona periférica bien diferenciada, la corteza, que contiene típicamente mucho parénquima con espacios intercelulares y colénquima y/o esclerénquima como tejido de sostén.

El sistema vascular y el tejido fundamental asociado al mismo, constituyen una unidad denominada estela (columna). Según la disposición de los tejidos vasculares y fundamentales, se pueden diferenciar básicamente tres tipos de estela: **protostela; sifonostela y atactostela.**

1) **Protostela:** Es el tipo más simple de estela. Consta de una columna central sólida de tejido vascular, no hay médula. Presentan protostela los tallos de helechos y licofitos basales y de algunas Angiospermas acuáticas.

2) **Sifonostela:** Presenta médula. El sistema vascular se dispone a su alrededor como un cilindro entero o seccionado. Según la distribución del xilema y del floema y la presencia de un parénquima interfascicular se distinguen las siguientes variedades:

Sifonostela ectofloica: Con xilema hacia adentro y floema externo. Se presenta en

helechos, licofitos y Eudicotiledóneas.

Sifonostela anfibloica: Con floema externo e interno, es decir por fuera y por dentro del xilema. Este tipo de estela lo encontramos en helechos y grupos afines y Eudicotiledóneas.

Eustela: Cuando el cilindro vascular hueco se presenta seccionado en partes por la presencia de un parénquima interfascicular, quedando determinados cordones o hacecillos que se distribuyen en un anillo alrededor de la médula. Dichos hacecillos son abiertos porque poseen cambium. Pueden ser colaterales, si el floema se encuentra hacia afuera del xilema, con el cámbium entre ambos; o bicolaterales, si hay floema a ambos lados del xilema, con cámbium entre éste y el floema externo, y a veces también entre el xilema y el floema interno. La eustela con hacecillos colaterales es característica de Eudicotiledóneas y Coniferophyta y grupos afines. La eustela con hacecillos bicolaterales se presenta en unas pocas familias de Eudicotiledóneas.

Dictiostela: Es un tipo de estela en que los hacecillos son concéntricos anficribales, es decir, con xilema en el centro y floema alrededor. Se presenta en helechos y licofitos.

3) **Atactostela:** Es la estela en la que el sistema vascular se presenta constituido por numerosos hacecillos cerrados, es decir, sin cámbium, dispersos uniformemente en el tejido fundamental formando varios ciclos concéntricos. Los hacecillos de mayor tamaño son generalmente los del centro. Estos hacecillos pueden ser colaterales o concéntricos anfigasales, es decir, con floema en el centro rodeado por xilema. En este tipo de estela es característica de Monocotiledóneas y no es posible distinguir una médula, pudiendo los tallos ser sólidos o huecos.

ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL TALLO

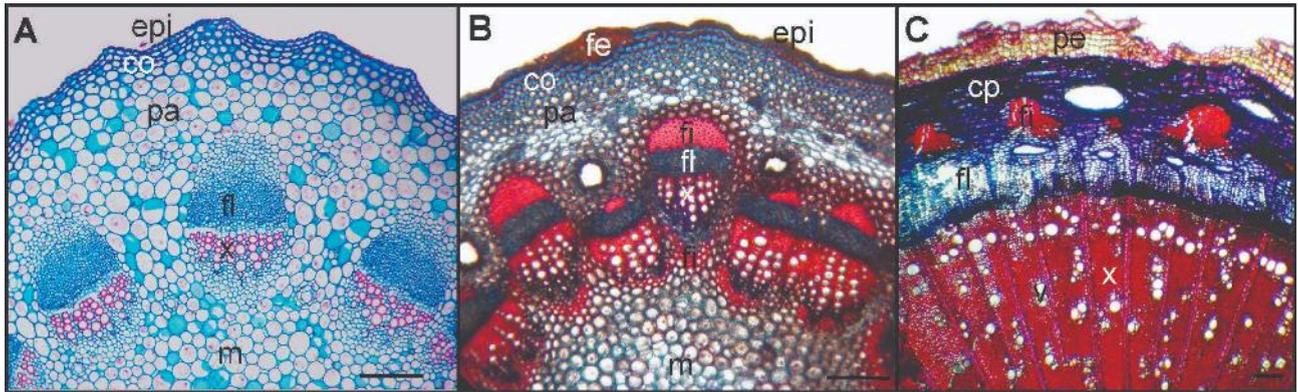
En Gimnospermas y Eudicotiledóneas leñosas presentan un aumento del grosor del tallo o crecimiento secundario, producido por la actividad de los meristemas secundarios o laterales: cámbium vascular y felógeno o cámbium suberógeno.

Cámbium vascular: Si todas las células procambiales se diferencian convirtiéndose en tejidos vasculares primarios, el tallo carece de la capacidad de experimentar un ulterior crecimiento del sistema vascular. Pero, si una parte del procámbium permanece en estado meristemático luego de completado el crecimiento primario, éste se convierte en el cámbium. Cuando comienza el crecimiento secundario el cambium produce floema y xilema secundarios.

Felógeno o cámbium suberógeno: En la mayoría de los casos, la epidermis no está capacitada para acompañar al crecimiento en espesor del tallo y, por consiguiente, se rompe, debiendo ser reemplazada por tejido protector secundario. Éste se desarrolla por actividad del felógeno que se forma a veces de la epidermis misma, o más frecuentemente, de un estrato más interno de la corteza. La formación del felógeno se realiza al comienzo del crecimiento secundario en grosor, pero a veces, comienza antes.

Por divisiones periclinales o tangenciales, el felógeno forma hacia el exterior, estratos de células de paredes suberificadas que reciben el nombre de súber, corcho o felema. En menor cantidad, se producen células sin suberificar hacia el interior que constituyen la felodermis. El

corcho, el felógeno y la felodermis, en conjunto se denominan peridermis.



Tallo. Corte transversal por tallo. A: Preparado permanente de tallo con crecimiento primario. B: Preparado temporario de tallo con comienzo de crecimiento secundario. C: Tallo con estructura secundaria. *Austroflourensia thurifera* (Molina) J.C. Ospina & S.E. Freire. Escala: 150 μ m.

CAPÍTULO 3: INSTRUMENTAL UTILIZADO PARA LAS OBSERVACIONES

El instrumental a utilizar en la observación de estructuras vegetales dependerá del tamaño de las mismas y del poder de resolución que necesitemos para poder distinguirlos. De esta forma, para realizar disección de flores, frutos o cortes por semillas pequeñas se utilizará una lupa o microscopio estereoscópico. En las observaciones histológicas de rutina será necesario utilizar el microscopio óptico (MO); mientras que, para observaciones especiales de determinadas estructuras muy pequeñas se empleará el microscopio electrónico de transmisión (MET) o de barrido (MEB).

A continuación se detallan estos tres instrumentos.

MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO

Los microscopios estereoscópicos modernos están compuestos por dos tubos ópticos independientes, de forma tal que los ojos del microscopista observen la imagen proyectada por un objetivo común con ángulos ligeramente distintos obteniéndose de esta forma una imagen aumentada y estereoscópica (3D) de la muestra.

La lente objetivo se encuentra montada en el interior de un revólver tubular y se caracteriza por tener un bajo poder de aumento (1x a 4x). Los oculares poseen un aumento que oscila entre 5x a 10x, lo que le proporciona al instrumento una magnificación total que va desde 5x a 40x.

Los microscopios estereoscópicos están conformados por una base de 4 ó 5 cm de altura que le sirve de platina, en cuya porción central se encuentra un orificio de diámetro variable cubierto por un cristal transparente.

El sistema de iluminación consiste en dos lámparas. Una de ellas se encuentra en la base del microscopio, sus rayos atraviesan el cristal de la platina, proporcionando una iluminación que es capaz de atravesar la muestra, utilizándose por lo tanto para la observación de especímenes transparentes. La otra fuente de luz está ubicada externamente al aparato y proyecta la luz en dirección oblicua sobre el objeto dando la posibilidad de observar cuerpos opacos. El foco de este microscopio se maneja mediante un tornillo único, articulado a una cremallera, que se utiliza para aproximar o alejar al lente objetivo del objeto a examinar.

Debido a que la distancia de trabajo de este instrumento es muy grande, se favorece la observación de grandes especímenes y la manipulación de los mismos en los trabajos de disección.

El uso del microscopio estereoscópico está basado en su capacidad directa de aumento, por lo que la imagen ampliada se observará en el campo del microscopio en el mismo plano que el objeto real, no invirtiendo su posición como sucede con el microscopio óptico compuesto.

MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO

El microscopio óptico compuesto forma una imagen del objeto magnificado en dos etapas mediante la utilización de dos sistemas de lentes. El primer sistema, denominado objetivo (funciona como un proyector de imágenes) produce una imagen aumentada del objeto y el segundo, denominado ocular, magnifica la imagen producida por el objetivo de la misma manera que lo haría una lupa. El resultado final es una imagen aumentada, virtual e invertida del objeto bajo estudio.

COMPONENTES DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO

El microscopio óptico está integrado por tres tipos de componentes:

1) Componentes Mecánicos.

Son aquellos que sirven de sostén, movimiento y sujeción de los sistemas ópticos y de iluminación así como de los objetos que se van a observar.

Base o pié. Es un soporte metálico, amplio y sólido en donde se apoyan y sostienen los otros componentes del microscopio.

Brazo, estativo o columna. Permite la sujeción y traslado del microscopio. Soporta al tubo óptico, a la platina y al revólver.

Platina. Superficie plana de posición horizontal. En ella se apoya la preparación que se sujeta a la platina mediante *pinzas*. Un sistema de engranajes permiten el movimiento de la preparación (derecha, izquierda, adelante,atrás).

Tubo óptico. Consiste en un cilindro metálico que suele medir 160mm o 170 mm de longitud (dependiendo del fabricante del microscopio) el cual en un extremo, está conectado al revolver o portaobjetivos y en el otro se relaciona con el (los) ocular(es).

Revolver o portaobjetivos. Es un componente que gira alrededor de un eje con la finalidad que los objetivos que sostiene coincidan de manera perpendicular con la platina. En su superficie inferior posee varios agujeros donde se atornillan los objetivos.

Tornillos macrométrico y micrométrico. Generalmente están situados en la parte inferior del brazo o columna. Ambos tornillos permiten el desplazamiento de la platina hacia arriba y hacia abajo con la finalidad de acercar o alejar la preparación hacia los objetivos y así conseguir un enfoque óptimo de la imagen.

Cabezal. Es un componente situado en relación con el tubo del microscopio que alberga principalmente prismas o espejos que sirven para acondicionar en él dos o más oculares, o sistemas mecánicos que soportan cámaras fotográficas, de vídeo o sistemas de proyección de la imagen.

2) Componentes ópticos

Son los objetivos, los oculares y los prismas que están interpuestos en el camino óptico desde la fuente luminosa hasta el sistema de detección (ojos o cámara).

Objetivos. Llamados así por estar próximos al objeto observado; dan una imagen real, invertida y aumentada del objeto. Los objetivos son considerados los elementos más importantes en la formación de la imagen, ya que establecen la calidad de la imagen en cuanto a su nitidez y a la capacidad que tiene para captar los detalles del objeto real (**poder de resolución**).

Los objetivos están constituidos por un sistema de lentes convergente y divergente que magnifican y corrigen una serie de aberraciones (cromáticas y esféricas) que afectan la calidad de las imágenes formadas. Dichas lentes se encuentran dispuestas dentro de una envoltura cilíndrica metálica, en cuyo exterior están inscritas una serie de anotaciones numéricas que indican las características del objetivo como por ejemplo, el aumento, la apertura numérica, el tipo de material con que están tallados las lentes, el grado de corrección para determinadas aberraciones de las lentes (acromáticos, apocromáticos, aplanáticos, etc.) o si se debe usar líquidos de inmersión.

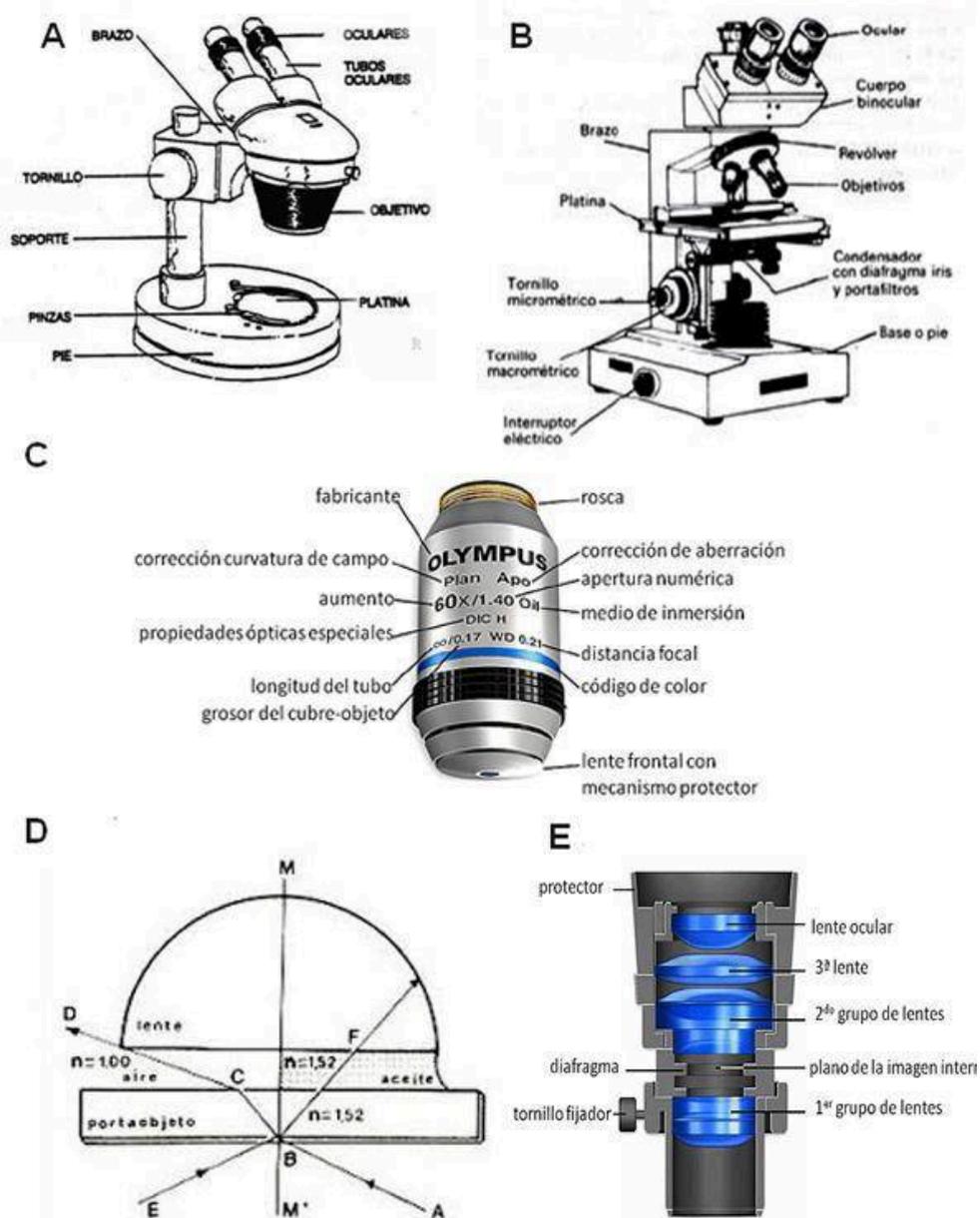


Fig. 2.1: Microscopio óptico. *A: Constitución del microscopio estereoscópico, lupa binocular o macroscopio; B: Constitución del microscopio óptico compuesto; C: Objetivo; D: Apertura numérica en objetivos secos y de inmersión; E: Ocular en corte longitudinal.*

La calidad del objetivo determinará la nitidez, contraste y el grado de detalle que se observará en la imagen final del objeto bajo estudio. Estos atributos de la imagen están en relación directa con el poder de resolución (PR) del sistema óptico. Se define como PR de un instrumento óptico a **la distancia mínima que debe existir entre dos puntos del objeto real para que se puedan visualizar como dos entidades separadas**. EL PR depende de la longitud de onda (λ) de la luz utilizada y la apertura numérica del objetivo, y se relacionan de la siguiente manera:

$$PR = 0,61\lambda/NA \quad (i)$$

Donde,

0,61 es la constante de Abbe

λ es la longitud de onda de la fuente de iluminación

NA es la apertura numérica del objetivo.

Apertura numérica (NA). Es una medida que indica la capacidad del objetivo de poder captar los rayos refractados por las estructuras finas de las cuales está constituido el objeto que se observa. Cuanto mayor sea la apertura numérica de un objetivo, éste tendrá una mayor capacidad de mostrar detalles finos en la imagen que forma.

$$NA = n \times \sin \alpha \quad (ii)$$

Donde: **n** representa el índice de refracción de la interfase que separa el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo.

α es la mitad del ángulo de apertura.

Los objetivos pueden clasificarse según las correcciones que presenten, el grado de magnificación (aumentos), necesidad de utilización o no de medios de inmersión entre su lente más distal y el objeto, etc.

Según la utilización de medios de inmersión en la interfaz lente/cubreobjetos, los objetivos pueden ser secos o de inmersión. En los objetivos **secos** el espacio entre el cubreobjetos y el objetivo está ocupado por aire. Los objetivos de **inmersión** están, en cambio, construidos para observar la preparación colocando entre ésta y la lente frontal del objetivo una gota de líquido, que en general es aceite. A igualdad de aumento de 2 objetivos, un objetivo de inmersión es capaz de captar más luz que uno seco. Ello se debe a que los rayos luminosos que atraviesan el objeto sufren una gran refracción al llegar al aire, y por lo tanto gran parte de los rayos emergentes de la preparación no son recogidos por el objetivo.

Tal cosa no sucede cuando se interpone entre la preparación y el objetivo, un líquido con índice de refracción muy similar al del vidrio; entonces, el preparado, la lente frontal y el medio interpuesto constituyen un medio casi homogéneo y los rayos que parten del objeto no sufren desviación sensible, penetrando casi todos en el objetivo. El índice de refracción del aire es igual a 1, por lo que la apertura numérica en los objetivos secos nunca será superior a 1 (ver ecuación ii); en cambio, en los objetivos de inmersión, la NA será mayor cuanto más alto sea el índice de refracción del líquido empleado, alcanzando valores que van desde 1,2 a 1,5. Por lo tanto, los objetivos de inmersión al presentar NA mayores poseen mayor PR (ver ecuación i).

Otra clasificación de los objetivos se refiere al tipo de corrección al que son sometidos con el fin de disminuir las aberraciones que se producen en la imagen debido a la naturaleza curva de las lentes (aberraciones cromáticas, de curvatura de campo, astigmatismo y de esfericidad).

Dependiendo de las aberraciones corregidas los objetivos pueden ser acromáticos, semi-apocromáticos o apocromáticos, siendo estos últimos los que presentan mayor grado de corrección.

Existen 2 características que hacen a la funcionalidad de los objetivos: la distancia de trabajo y la profundidad de foco. Profundidad del foco, es la propiedad de los objetivos que permite ver simultáneamente y con nitidez, los detalles del objeto situados en varios planos de la preparación. Es mayor en los objetivos de menor aumento y de menor apertura numérica. La distancia de trabajo hace referencia a la distancia que existe entre la lente frontal del objetivo y el plano en foco de la muestra. La distancia de trabajo disminuye con la magnificación y la NA del objetivo.

Ocular. Es otro componente óptico del microscopio, debe su nombre porque la imagen final se observa a través de él acercando el ojo a la lente "ocular" del componente. Es el encargado de formar una segunda imagen a partir de la imagen primaria que forma el objetivo. La imagen del ocular es de mayor tamaño, virtual y derecha. Esta imagen únicamente amplía un número determinado de veces (5x, 8x, 10x, 12x) a la imagen formada por el objetivo. No añade, por más aumentos propios que posea, ningún detalle a los generados por el objetivo. En general, los oculares están contruidos por dos lentes convergentes (planos convexos). La primera lente se denomina "de campo o frontal", está situada en la parte anterior del ocular y es la encargada de recoger y ampliar la imagen generada por el sistema de lentes del objetivo. La lente posterior, en contacto estrecho con el ojo del observador, se denomina lente "ocular" y es la responsable de aumentar nuevamente la imagen y orientarla hacia el ojo del observador.

El aumento primario del objeto es producido por el objetivo. Esta primera imagen aumentada del objeto se forma en el plano focal del ocular, donde se realiza el aumento final. El aumento total de un microscopio compuesto es el producto del aumento de su objetivo y de su ocular. Con un objetivo que aumenta 40x y un ocular que aumenta 10x el aumento total es de 400x.

3) Componentes de iluminación

El sistema de iluminación está constituido por las partes del microscopio que producen, reflejan y regulan la intensidad de la luz que se utiliza para la observación microscópica. Uno de los aspectos críticos a considerar en la microscopía óptica es la fuente de luz que se emplea para iluminar el espécimen. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aun cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin resplandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación. El sistema de iluminación está constituido por la fuente de luz, el condensador y un diafragma o iris. Como regla general, el sistema de iluminación está colocado debajo de la platina y la finalidad es iluminar mediante luz transmitida, es decir, la luz atraviesa la muestra. En la mayoría de los casos el estudio de las preparaciones histológicas se hace de esta forma. En otros casos muy específicos se emplea el método de luz reflejada, en el cual se ilumina la superficie del espécimen mediante epi-iluminación. La fuente de luz emite una radiación que es recogida por un dispositivo denominado condensador, que a su vez forma un cono luminoso necesario para la visualización con objetivos de mayor aumento.

Diafragma de campo. Va colocado inmediatamente por debajo de la platina. Tiene por función hacer llegar al preparado la luz suficiente para una buena iluminación, aumentando la claridad de la imagen.

Condensador. Es un sistema de lentes que concentra la luz procedente de la fuente de iluminación, produciendo conos luminosos de gran intensidad. Está formado por una o dos lentes convergentes que reúnen los rayos luminosos y los orientan hacia la abertura central de la platina del microscopio. Tiene incorporado un diafragma iris que regula la entrada de luz con el fin de concentrar la mayor cantidad de rayos luminosos en el plano donde está situada la muestra. La mayoría de los condensadores de los microscopios actuales también poseen una apertura numérica que indica la cantidad de luz que puede captar y luego enviar hacia la preparación. El cono de luz que produce el condensador debe ajustarse de manera apropiada para optimizar la intensidad y el ángulo de apertura. Cada vez que se cambia un objetivo se debe realizar un ajuste para obtener el cono de luz conveniente a la apertura numérica del nuevo objetivo. A menudo no es práctico utilizar el mismo condensador para un amplio rango de objetivos (2x hasta 100x). Para objetivos de bajo poder de aumento (menor a 10x) algunos condensadores poseen una lente frontal adicional que es abatible. Además de los condensadores empleados en los microscopios de campo claro, existe una variedad de modelos de condensadores especializados que se utilizan en diferentes aplicaciones, cuya finalidad principal es el incremento del contraste entre los detalles de la estructura del espécimen. Se han desarrollado condensadores especiales para microscopía de campo oscuro, contraste de fase, luz polarizada y contraste de interferencia diferencial.

Uso del microscopio óptico

Iluminación. Coloque en posición el objetivo de menor aumento y fíjese que el diafragma esté abierto.

Observación. Proceda como sigue:

- 1- Coloque el preparado sobre la platina, cuidando que el cubreobjetos quede hacia arriba.
- 2- Enfoque primero con el menor aumento. Acerque bien el objetivo al preparado, usando el tornillo macrométrico.
- 3- Mirando por el ocular, aleje el objetivo hasta que aparezca la imagen.
- 4- Ajuste el foco con el tornillo micrométrico.
- 5- En caso de ser necesario más aumento, cambie el objetivo por el que le sigue en aumento y ajuste el foco.
- 6- Si fuese necesario utilizar el objetivo de inmersión, una vez que enfocó con el mayor aumento seco, retírelo girando el revólver, coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y ponga el objetivo de inmersión en su lugar, luego ajuste el foco.
- 7- Una vez acomodado, el microscopio no debe moverse.

Modos de contraste en microscopia óptica

Campo claro. Es el más frecuente. El objeto examinado se ilumina directamente, es decir, los rayos luminosos inciden directamente sobre el objetivo.

Esta aplicación se caracteriza por el empleo de luz natural o luz artificial como fuente luminosa para formar las imágenes del objeto que se observa. La imagen muestra puntos o áreas iluminadas (generalmente coloreados) sobre un fondo claro o transparente. Para que la imagen sea visible con nitidez es necesario que el objeto examinado presente coloración natural o esté teñido, es decir que los componentes celulares y tisulares de la estructura se contrasten mediante colorantes específicos que absorban y transmitan determinadas longitudes de onda del espectro visible. El campo aparece claro o transparente porque los rayos luminosos directos que provienen del condensador no encuentran en su camino ninguna estructura coloreada y entran como rayos de luz blanca hacia el objetivo. Si se examinan objetos sin color la imagen ofrecerá detalles poco contrastados, casi transparentes. Si la muestra consiste en secciones de tejidos, estas deben ser delgadas con un grosor de 5 μm a 10 μm . Se puede emplear secciones de mayor espesor pero la imagen no mostrará un buen poder de resolución y tampoco exhibirá contornos nítidos, ya que en el campo se observarán varios planos superpuestos de las imágenes.

Campo oscuro. Se denomina así debido a que la imagen que se forma está constituida por una serie de estructuras brillantes sobre un fondo oscuro. El microscopio de campo oscuro es un microscopio óptico común cuyo sistema condensador ha sido modificado para dirigir la luz a la muestra de forma oblicua de tal modo que sólo la luz difractada por la preparación pase al objetivo y se haga visible. Para que esto ocurra se requiere que **la apertura numérica del condensador sea mayor que la apertura numérica del objetivo**. El condensador genera un cono de luz hueco en donde los rayos luminosos directos provenientes de la fuente luminosa son impedidos de entrar a la porción central de la lente del condensador y solo penetran y emergen de él, los rayos periféricos que al refractarse se hacen oblicuos. Cuando estos rayos oblicuos encuentran en su recorrido alguna partícula en la muestra, son desviados y pueden ser captados por la lente frontal del objetivo, generando una imagen del objeto brillante en medio de un fondo oscuro. La microscopía de campo oscuro se utiliza mayormente en la observación de muestras *in vivo*, como células móviles y soluciones con partículas en suspensión. No es apta para material grueso, ni para revelar detalles, sin embargo es buena para observar contornos.

Contraste de fase. El principio óptico de este microscopio consiste en la capacidad que tiene para transformar las diferencias que existen en los índices de refracción de cada uno de los componentes de la muestra en diferencias de intensidad luminosa. Así, en las imágenes obtenidas se muestran las estructuras del objeto contrastadas en tonos oscuros y tonos claros. Un haz de luz retrasa su velocidad cuando atraviesa una sustancia transparente que posee un índice de refracción mayor que el aire. Los rayos luminosos que atraviesan las distintas partes de la muestra suelen retardar su recorrido en un $\frac{1}{4}$ ó $\frac{1}{2}$ longitud de onda, dependiendo de sus correspondientes índices de refracción, respecto a los rayos luminosos directos que en su recorrido no encuentran estructura alguna. El microscopio de contraste de fases utiliza la propiedad que tienen dos ondas luminosas desfasadas de interferir entre ellas para generar imágenes contrastadas por la mayor o menor intensidad luminosa que exhiben sus

componentes. El sistema separa los dos rayos luminosos que inciden y emergen del objeto (el directo y el refractado) para que, de manera artificial, el rayo refractado retrase su recorrido más o menos a la mitad de longitud de onda y cuando estos rayos de luz se interfieran puedan anularse ofreciendo una porción oscura en la imagen, es decir, una disminución de la intensidad luminosa en un fondo iluminado formado por los rayos luminosos directos. Este microscopio requiere de un condensador especial que contiene en su interior un diafragma con el anillo de fases adecuado para cada tipo de objetivos. Los objetivos a su vez, deben tener placas de fases localizadas en el plano focal de los mismos. Este tipo de microscopía es ampliamente usado para la observación de material sin teñir, generalmente para el estudio de procesos *in vivo*. Las limitaciones abarcan la aparición de halos en la periferia de los objetos además de no ser apta para el estudio de objetos gruesos.

Microscopía de Polarización. Los objetos biológicos, vegetales y animales, están constituidos por moléculas que por su organización cristalina, paracristalina o fibrilar, adoptan determinada orientación en el espacio. Estos arreglos moleculares, interactúan con las ondas luminosas que inciden en ellos de distinta forma dependiendo de cómo estén orientados. Así, los índices de refracción del objeto serán diferentes dependiendo de los ejes de rotación de las moléculas que lo componen. Un objeto con ejes que poseen varios índices de refracción se denomina **birrefringente**. Por la disposición espacial de los átomos y moléculas también se denominan **anisotrópicos**. La **birrefringencia** resulta de la alineación de átomos o moléculas en un determinado plano del objeto. Estos átomos y moléculas interactúan con ondas luminosas que inciden en ellos desde una determinada dirección, haciendo que el plano de vibración de las ondas luminosas pueda ser modificado o rotado hasta en un ángulo de 45°. Las estructuras birrefringentes cuando son iluminadas con luz polarizada brillarán intensamente sobre un fondo oscuro; en cambio su respuesta a la iluminación será muy débil cuando las ondas luminosas inciden desde una dirección diferente y éstas no puedan ser modificadas en su plano de vibración. Se denominan estructuras **monorrefringentes o isotrópicas** aquellas cuyo arreglo molecular les confiere un mismo índice de refracción. Esta disposición espacial impide que las ondas luminosas polarizadas puedan ser giradas. Para analizar la anisotropía o birrefringencia de una estructura celular o tisular se utiliza el microscopio de luz polarizada. Este microscopio se caracteriza porque posee interpuesto en su camino óptico dos filtros o prismas polarizadores. Uno de ellos (**filtro polarizador**) está localizado después de la fuente luminosa y antes del objeto, es el filtro encargado de polarizar la luz; el otro se localiza posterior al objeto (**filtro analizador**). Las rejillas moleculares de cada filtro se disponen, en el microscopio de polarización, perpendiculares entre sí. Esto significa que si iluminamos el microscopio y observamos el campo de microscopio, éste aparecerá totalmente oscuro, en cambio si en la platina colocamos un objeto birrefringente (células vegetales con cloroplastos, fibras de colágeno, granos de almidón, etc.) la estructura cristalina o paracristalina de sus moléculas harán rotar el plano de luz polarizada que se transmitió entre ellas y lo harán coincidir con el arreglo molecular de la rejilla del filtro analizador, por lo tanto el objeto birrefringente aparecerá brillante sobre un fondo oscuro. Se emplea también para observar células y organismos microscópicos vivos.

Contraste interferencial diferencial (CID=DIC). Este sistema se emplea cuando los objetos son demasiados gruesos y transparentes para ser observados por contraste de fase. La microscopía DIC requiere el uso de condensadores y objetivos acoplados a primas especiales

denominados primas de Wollaston. Además, en el camino óptico deben interponerse un polarizador (en la entrada del condensador y un analizador (a la salida del objetivo). Este tipo de microscopio fue diseñado y construido basándose en los principios ópticos semejantes al microscopio de contraste de fases, ya que la imagen se genera utilizando las diferencias de fase de los rayos luminosos que atraviesan el objeto observado.

La imagen que se forma da la sensación visual de bajorrelieve o de un “aspecto tridimensional”.

Fluorescencia. Ciertas sustancias naturales o artificiales poseen la propiedad que al ser estimuladas con luz de una determinada longitud de onda absorben esta energía y emiten luz de longitudes de onda siempre mayores que las ondas con las que fueron excitadas (la excitación puede ser realizada longitudes de onda que van desde 340 a 700nm dependiendo de la sustancia). Este fenómeno se denomina fluorescencia. Esta luz de excitación puede ser captada por el ojo o un sistema detector observándose el objeto brillante sobre un fondo negro. La propiedad de generar fluorescencia es propia de ciertas estructuras celulares animales o vegetales (fluorescencia natural o auto fluorescencia). Por ejemplo, la clorofila cuando es excitada por radiación ultravioleta emite radiación visible de color rojo. Existen una serie de sustancias colorantes que también emiten fluorescencia cuando son excitadas (fluorescencia artificial) . Estas sustancias se denominan “**fluorocromos**”. Los fluorocromos se emplean para revelar la presencia de determinados componentes celulares o tisulares ya que al unirse de manera específica a algunos de ellos y ser excitados con una longitud de onda específica resplandecen ofreciendo imágenes de colores. Uno de los fluorocromos más conocidos es el naranja de acridina. Por ejemplo cuando se “colorean” células o tejidos con este fluorocromo es posible demostrar de manera específica ácidos nucleicos: El DNA emite radiación verde-amarillenta y el RNA fluoresce de color rojo. El microscopio de fluorescencia consta de los mismos componentes que un microscopio óptico común, al que se le añaden fuente luminosa especial y filtros especiales para seleccionar la luz de excitación y de emisión.

Microscopía confocal. En la microscopía convencional el tejido debe cortarse finamente para ser examinado y mientras más delgado sea, más nítida será la imagen ya que si una muestra gruesa es observada, la imagen que se enfoca se ve contaminada por la superposición de los elementos del tejido que están fuera del plano de foco, tanto por encima como por debajo. La imagen enfocada se deteriora a causa de las estructuras superpuestas borrosas o no enfocadas.

Con el microscopio confocal estas limitaciones han sido superadas, ya que es un instrumento que permite realizar cortes ópticos finos a muestras de tejidos más o menos gruesos y realizar reconstrucciones en tres dimensiones a partir de cortes seriados. Su mecanismo, basado en el microscopio de fluorescencia hace posible la obtención de imágenes de la arquitectura tridimensional de células y tejidos.

Los detalles de la óptica del microscopio confocal son complejos y complementado por métodos electrónicos y de computación, este instrumento permite enfocar únicamente un plano determinado del espécimen, eliminando la luz (fluorescencia) procedente de las regiones que no están en el plano de enfoque (fluorescencia fuera de foco).

Las ventajas principales de este tipo de microscopía residen en el poder de enfoque de un solo plano del espécimen, eliminación de la información proveniente de otros planos no enfocados del espécimen, obtención de cortes ópticos seriados a partir de muestras con cierto

grosor o cuyo corte fino se dificulta y gracias a programas de computación, se combinan los cortes ópticos seriados y a partir de ellos se reconstruye en tres dimensiones la estructura observada.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)

Su utilidad es semejante al microscopio estereoscópico o lupa pero muy superior en cuanto al poder de resolución, profundidad de campo y aumento de la imagen. Permite la observación y el análisis de superficies (ej. polen, epidermis, tricomas) por medio de imágenes que se obtienen mediante un sistema óptico electrónico (Fig. 2.2 C).

Preparación del material

Fijación. FAA o glutaraldehído en solución acuosa al 25 o 50%. Se usa una solución tampón de cacodilato de sodio de Ph. 7 -7,4.

Deshidratación: con serie de alcoholes, acetona o formaldehído-dimetilacetil (FDA)

Punto crítico. Para el secado a punto crítico, se emplea un secador de punto crítico. Se utiliza CO² el punto crítico del CO² se alcanza cuando la temperatura llega a 31 a 33° C y la presión a 73,8 bares. En este estado todo el CO² está gaseoso. En 2 ó 3 minutos ya está seco el material. El punto crítico evita la tensión superficial del líquido que se evapora. Se usa en materiales delicados de paredes delgadas.

Metalización. Se coloca el material en un porta-muestra a alto vacío y se le hace un baño de oro-paladio. Esto hace conductora la muestra y el material está en condiciones de ser observado al MEB.

Aplicación del análisis de dispersión energética de rayos X (EDAX)

Para determinar la composición mineral de un material vegetal, se coloca el mismo previamente metalizado en un porta-muestra del (MEB). La emisión de rayos X, característica de cada elemento, se produce cuando un haz de electrones de alta energía incide sobre la superficie de la muestra.

Como resultado se obtiene un espectro de energía que muestra los picos característicos de los elementos constitutivos de la misma, estos representan la composición mineral cualitativa y se obtienen con un equipo EDAX.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

Es el único instrumento que permite conocer directamente la ultraestructura biológica ya que posee un poder de resolución mucho mayor que el microscopio óptico. Utiliza la propiedad que tienen los haces de electrones de ser desviados por un campo electromagnético, en la misma forma que un rayo de luz se refracta al atravesar una lente.

Preparación del material

Fijación. Tetróxido de osmio, postfijación glutaraldehído.

Deshidratación. En series de alcoholes, acetona formaldehído-dimetilacetil.

Inclusión. Resinas que se colocan en cápsulas de gelatina.

Seccionamiento. Con ultramicrotomo, se usa cuchilla de vidrio.

Coloración. Acetato de uranilo 2% en agua y citrato de plomo.

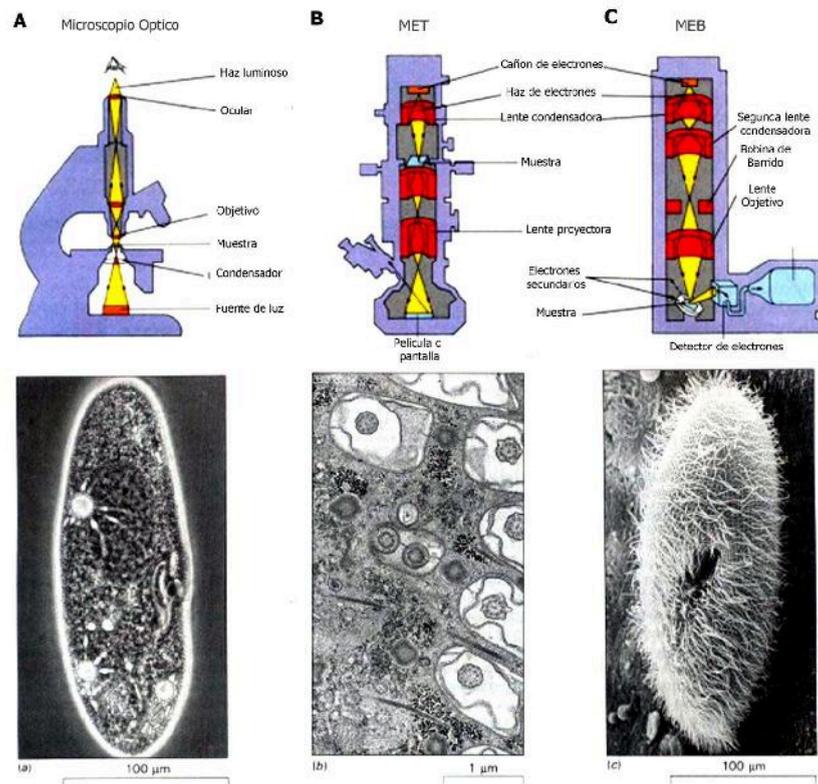


Diagrama comparativo entre microscopios. A: Óptico; B: Electrónico de transmisión; C: Electrónico de barrido. En la parte inferior de cada esquema se muestra una imagen obtenida con el microscopio que se indica arriba. Nótese la escala.

UNIDADES DE MEDIDA DE USO CORRIENTE EN MICROSCOPIA

La longitud es una magnitud creada para medir la distancia entre dos puntos y su unidad es el metro.

Submúltiplos del metro:

- decímetro (dm): 10^{-1} metros.
- centímetro (cm): 10^{-2} metros.
- milímetro (mm): 10^{-3} metros.
- micrómetro (μm): 10^{-6} metros.
- nanómetro (nm): 10^{-9} metros.
- angstrom (Å): 10^{-10} metros.

Micrómetro (μm). Unidad de longitud equivalente a una millonésima parte de un metro, abreviado μ (plural latino: micra). También conocido como micrón.

Nanómetro (nm). Unidad de longitud que equivale a una milmillonésima parte de un metro. Utilizada además para medir las longitudes de onda de las radiaciones electromagnéticas, la luz entre ellas. Esta unidad se ha hecho importante en campo de la Nanotecnología, disciplina que estudia materiales cuyas dimensiones son en el orden de escasos nanómetros.

Ångstrom (Å). Unidad de longitud empleada principalmente para expresar longitudes de onda, distancias moleculares y atómicas.

Equivalencias

Relaciones entre las unidades de medida empleadas en microscopía:

$$1 \text{ mm} = 1000 \text{ } \mu\text{m}$$

$$1 \text{ } \mu\text{m} = 1000 \text{ nm}$$

$$1 \text{ nm} = 10 \text{ Å}$$

$$1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$$

$$1 \text{ Å} = 0.0001 \mu\text{m}$$

Mediciones de las estructuras vegetales

Cuando no se dispone de un microscopio óptico con cámara digital y software adecuado para medir longitudes y áreas en estructuras vegetales es necesario utilizar los siguientes accesorios.

Micrómetro de ocular. Contiene una plaquita graduada.

Micrómetro de retículo. Contiene una plaquita cuadrículada

Micrómetro de objeto. Es un portaobjetos que tiene una escala de 2 mm dividida en 200 unidades de 10 μm cada una.

Para medir longitudes se utiliza el micrómetro de ocular provistos de graduación.

Para recuentos de células, semillas, granos polen, etc. contenidos en un área determinada se utiliza el micrómetro de retículo.

Mediante la calibración con el micrómetro de objeto se establece el valor de un intervalo del micrómetro de ocular o del retículo, con respecto al aumento del objetivo.

Forma de trabajar con estos accesorios.

Colocar el portaobjetos con la escala milimetrada y enfocar lo. Seleccionar el aumento con el que se quiera medir. Después ajustar el micrómetro de ocular y el micrómetro de objeto de modo que observe con nitidez ambas graduaciones. Una vez situado el micrómetro de objeto próximo y paralelo al micrómetro de ocular, hacer coincidir en un punto las dos graduaciones.

En el ejemplo de la Figura 3.3 C, a partir de los números **0 y 0**, contar cuántas divisiones del micrómetro de objeto (X) equivalen a un determinado número de intervalos del micrómetro de ocular (Y). En ese ejemplo, 7,8 intervalos del micrómetro de ocular equivalen a 120 intervalos del micrómetro de objetivo.

Calibración.

Determinar el valor de calibración con la fórmula siguiente.

X= micrómetro de objeto = 1.200 μm

Y= micrómetro de ocular = 78 intervalos

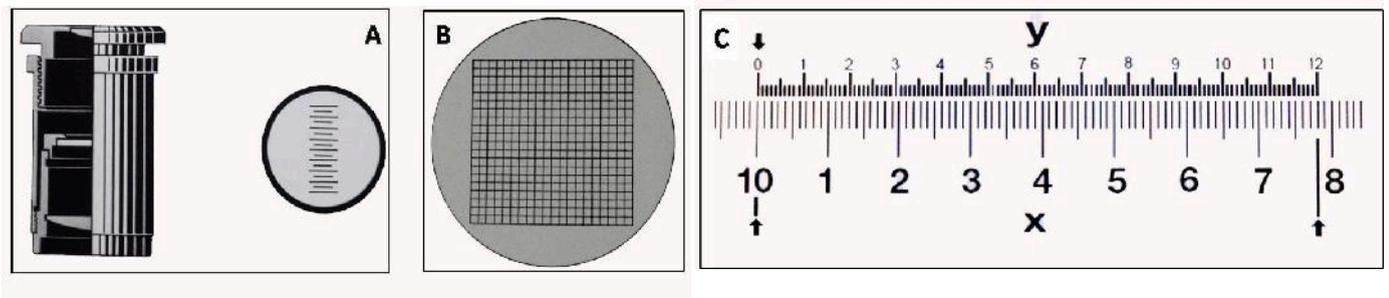
X/Y = valor de calibración o sea: $1.200 / 78 = 15,38 \mu\text{m}$

Una vez que se conoce la medida de la plaquita graduada del ocular; se retira el micrómetro de objetivo y enfoca el objeto a medir.

Finalmente contar el número de intervalos del micrómetro de ocular que corresponden al tramo que se desea medir y multiplicar el número de intervalos por el valor de calibración.

El resultado es la longitud absoluta del tramo medido, en μm .

Esta calibración debe hacerse para cada aumento del objetivo y para cada microscopio.



Accesorios de medición. **A:** Micrómetro de ocular; **B:** Micrómetro de retículo; **C:** micrómetros de objeto (X) y de ocular (Y) superpuestos.

CAPÍTULO 4: FIJACIÓN, COLORACIÓN Y MONTAJE

Todos los órganos y tejidos de una planta pueden ser observados mediante microscopía óptica, de este modo, el material botánico puede consistir tanto de partes vegetativas (raíz, tallo y hojas) como de partes reproductivas (flores, semillas o frutos). Para realizar las técnicas histológicas se puede utilizar material vivo, seco, herborizado, fijado en algún líquido conservador (ver Fijación). Además, también puede observarse material procesado industrialmente como dulces, tejidos, muebles de madera, hilados, mieles, etc.

FIJACIÓN

La fijación es un método que se utiliza para preservar la morfología y la composición química de las células que componen una preparación microscópica. Es una operación destinada a matar las células lo más rápidamente posible y conservarlas en el estado más parecido al que tenían mientras estaban vivas. Un tejido bien fijado presentará las células turgentes, no plasmolizadas. Consiste en agregar agentes fijadores a la muestra como acetona, formaldehído o glutaraldehído, los cuales mantienen las interacciones entre las moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) y permiten que las preparaciones duren en buen estado durante meses o años.

Uno de los métodos más utilizados para realizar preparaciones permanentes consiste en fijar el material de interés en una solución de F.A.A. (formaldehído-alcohol-ácido acético). La misma es corrosiva y en caso de entrar en contacto con la piel debe lavarse inmediatamente. Las emanaciones son nocivas y no deben ser inhaladas. Por ello, luego de transcurridas 24 horas, tiempo en que el líquido penetra en los tejidos, es recomendable pasar el material a alcohol 70° hasta su uso posterior.

COLORACIÓN

Como las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas poseen poco color o carecen de él es frecuente usar materiales colorantes que se incorporan y fijan en diferentes componentes celulares. La coloración del material facilita el reconocimiento de las estructuras durante la observación.

Colorantes

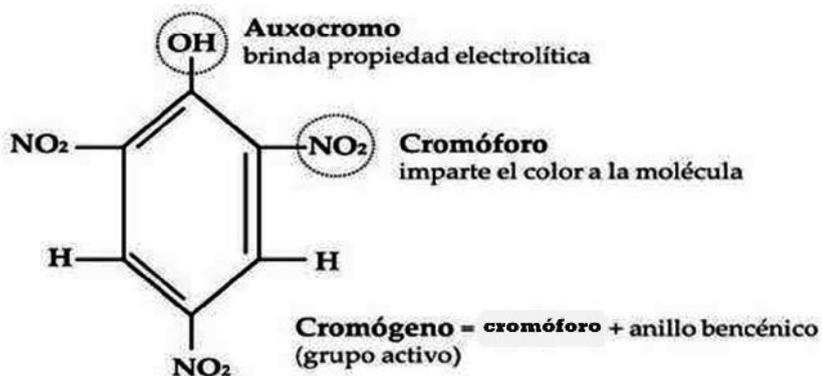
Un colorante se puede definir como la sustancia que, puesta en contacto con un soporte adecuado, se une a él y le transmite color. No todas las estructuras celulares se tiñen con un colorante con la misma intensidad, lo que genera una gama de colores en las preparaciones.

El soporte químico de la mayor parte de los colorantes naturales y de todos los artificiales son anillos aromáticos derivados del benceno.

El benceno al igual que todos los hidrocarburos aromáticos, originalmente tienen una sustancia incolora que puede absorber radiaciones dentro del espectro de luz ultravioleta, es decir, a menos de 400 nanómetros. El anillo bencénico será incoloro a nuestros ojos. Al introducir radicales químicos se produce una reacción química y el derivado del benceno que

se obtiene puede absorber radiación luminosa dentro del espectro visible y nos mostrará color.

A los radicales químicos responsables de la modificación molecular a la que se debe la aparición del color se le llama grupo cromóforo y se denomina cromógeno al conjunto formado por el grupo cromóforo y el anillo bencénico.

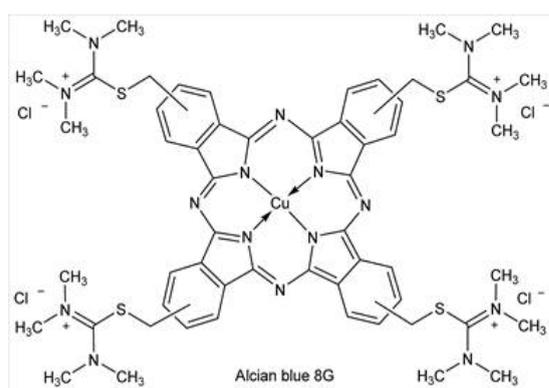


El anillo bencénico puede llevar uno o dos grupos cromóforos. Los principales grupos conocidos son los siguientes radicales son Etileno(>C=C<), Carbonilo(>C=O), Tiazólico(>C=S), Imino(>C=N), Azoico(-N=N-), Nitroso(-N=O), Nitro(-NO).

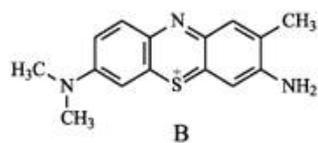
La conversión del cromógeno en colorante está vinculada a la adición sobre la molécula cromática de otros grupos atómicos que le confiere o le dan la oportunidad de disociarse electrolíticamente o de formar sales con los diferentes tejidos.

A estos radicales se los denomina grupos auxocrómos o potenciadores del color. Generalmente tienen carga eléctrica, es decir, poseen carácter ácido o básico, y son los responsables de que el colorante tenga mayor o menor afinidad por la estructura que va a teñir.

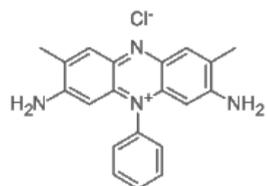
Los grupos auxocrómos de importancia son: el grupo hidroxilo, carboxilo, amino, sulfhidrilo y determinados iones derivados del Fe, Cr, Al y del Mb.



A



C



Fórmula química de tres colorantes. A: Azul Astral; B: Azul de toluidina; C: Safranina.

CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES

a) Según su Origen

Naturales: son relativamente escasos y se obtienen en forma de extractos a partir de ciertas plantas, insectos o moluscos. Son ampliamente utilizados en anatomía patológica. Pueden provenir de animales, Ej. carmín. o vegetales, Ej. hematoxilina, orceína, azafrán.

Artificiales: provienen de hidrocarburos, en su mayor parte derivan de la anilina. Comenzaron a utilizarse a mitad del siglo XIX y sirven para numerosas coloraciones. Inicialmente se obtenían del alquitrán y actualmente se sintetizan en el laboratorio.

b) Según el grupo Cromóforo

Colorantes Nitratos o Nitrocolorantes: Son nitro o nitrosos derivados del benceno o del naftaleno con algunos grupos hidroxilos, aminos, etc. El más sencillo es el 2, 4, 6 trinitrofenol. La presencia de los 3 grupos nitro incrementa el carácter ácido del grupo fenólico.

Colorantes Azoicos: Contienen el grupo Azo unido o uniendo anillos adyacentes derivados del benceno o del antraceno. En general, son colorantes ácidos, también los hay neutros o básicos. Pueden tener un solo grupo azo (monoazoicos) como el orange G, o dos (diazóicos) como el Sudán rojo y negro o el Rojo Congo.

Colorantes derivados de la Antroquinona: Se obtienen a partir de la oxidación del antraceno para formar anillos quinónicos. Ej. Rojo de Alizarina S.

Colorantes derivados de la Acridina. Ej. Naranja de Acridina.

Derivados oxacínicos. Ej. Azul Nilo o Violeta de Cresilo.

Derivados tiacínicos. Ej. Azul de Toluidina

Derivados acínicos. Ej. Rojo Neutro, Safranina E.

Derivados del difenilmetano. Ej. Auramina,

Derivados del trifenilmetano. Ej. Fucsina o el Verde rápido.

Derivados del Xianteno. Ej. Piridina, Rodamina.

c) Según el grupo Auxocromo

Colorantes Básicos: Asociación de un cromógeno de baja intensidad y de carácter débilmente ácido al que se le añade grupos auxocromos catiónicos fuertemente básicos que son los responsables de la carga global del colorante, por eso se utilizan para teñir estructuras ácidas. Ej. laca de hematoxilina (colorante nuclear), fucsina básica, galocianina.

Colorantes Ácidos: Productos de la unión de un cromógeno de baja intensidad débilmente básico al que se le añaden grupos auxocromos fuertemente ácidos lo que le dan dicho carácter al colorante. Tiñe estructuras básicas celulares en el citoplasma celular. Ej. eosina-C Citoplasmática, fucsina ácida.

Colorantes Neutros: Unión de colorantes ácido y básico para formar un precipitado comúnmente insoluble en agua y muy estable en disolución alcohólica; de esta forma su carga final es neutra. Conservan, en parte, la propiedad de colorear conjunta o separadamente diferentes estructuras, dependiendo de que sean o no capaces de atrapar algunos iones generados cuando la sal se disocia tras ser inestabilizada al colocarla en disolución acuosa. Ej. giemsa. Las estructuras así coloreadas adquieren una tonalidad policroma = multicolor.

Colorantes Indiferentes: En condiciones normales, colorean los tejidos por un mecanismo de impregnación física; no poseen carácter ácido, básico o salino definido. Ej. tinción argéntica.

Colorantes Ortocromáticos: En condiciones normales, la mayor parte de los colorantes tiñen los tejidos con un color parecido a él.

Colorantes Metacromáticos: Cuando se utilizan ciertos colorantes básicos derivado de la anilina, algunas estructuras tisulares se tiñen con tonos diferentes al que cabría esperar por el colorante usado. Este efecto es la metacromasia.

PROCESOS O MECANISMOS DE COLORACIÓN

Los métodos de tinción se fundamentan en una serie de procesos fisicoquímicos complicados que varían según los colorantes.

Métodos Físicos: Están ligados a las propiedades de disolución e impregnación del colorante sobre el tejido. El colorante es más soluble en el tejido que en el disolvente que actúa como medio de transporte, el cual generalmente es agua. Ej. en la tinción para grasas el colorante se disuelve más fácil en los lípidos tisulares que en la solución alcohólica.

Métodos Químicos: La reacción entre colorante y tejido ocurre por procesos químicos bien definidos, de manera que al interactuar, se produce un nuevo cromógeno responsable del color obtenido.

Métodos Físico-Químicos: Se basa en la formación de uniones intermoleculares por atracción electrostática (cargas diferentes), por lo que el colorante ácido tiñe estructuras básicas y viceversa.

Métodos de coloración:

Coloración directa. Existe una verdadera afinidad entre el colorante y el objeto.

Coloración indirecta. Requiere la intervención de intermediarios o mordientes para que la coloración tenga lugar.

Coloración progresiva. Se hace actuar el colorante hasta que llegue a su punto óptimo.

Coloración regresiva. Se realiza primero una sobre coloración y luego se elimina el resto del colorante por medio de diferenciadores. A este proceso se lo denomina diferenciación.

Coloración simple. Se colorean solamente algunos elementos del preparado (núcleo, fibras elásticas, etc.).

Coloración combinada. Se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos recurriéndose, generalmente, al empleo sucesivo de colores básicos y ácidos que contrastan por sus colores.

Coloración panóptica. Es una coloración combinada realizada sucesivamente por colorantes neutros (May-Grünwald-Giemsa).

Coloración pancrómica. En un solo baño colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesiten.

COLORACIONES MÁS UTILIZADAS

Coloraciones simples:

Azul Astral. Las paredes celulósicas se tiñen de azul cobalto.

Safranina. Tiñe de rojo paredes celulares lignificadas, cutinizadas o suberificadas, como así, también cromosomas y nucleolo.

Azul de Toluidina (Sakai, 1973). Los tejidos lignificados, suberificados y con taninos se tiñen de azul verdoso, mientras que, los tejidos no lignificados se tiñen de rojo púrpura. El citoplasma de púrpura y el núcleo azul o azul-verdoso. El almidón no se tiñe.

Azul Brillante de Cresilo (Pérez, A. N & V. H. Tomasi, 1997). La cutícula se colorea de celeste claro; el contenido epidérmico de amarillo pardo; floema y parénquima de rojo violáceo; paredes lignificadas de las fibras azul intenso; xilema de celeste verdoso; nectarios y células secretoras verde esmeralda; núcleos y citoplasma de azul claro; engrosamientos del endotecio de azul.

Violeta de Cresilo "Violeta de Cresyl" (Dizeo de Strittmatter, 1980). Es una coloración metacromática. Colorea de rosa los tejidos parenquimáticos y epidermis. De azul, el xilema, las fibras, núcleos y cromosomas. De rojo el citoplasma.

Sudan IV: Tiñe de rojo sustancias grasas, cutina y suberina.

Coloraciones combinadas dobles:

Azul Astral / Safranina. Tiñe la celulosa de azul cobalto; la lignina de rosado; los núcleos de rojos; los taninos de rojo y el citoplasma rojizo.

Azul Astral / Fucsina Básica (Kraus et al., 1998). El Azul Astral tiñe de azul cobalto los polisacáridos de la pared celular como la celulosa y pectinas. La Fucsina Básica tiñe de rosado las paredes lignificadas, suberificadas o cutinizadas, cloroplastos y ácidos nucleicos.

Safranina / Fast-green (Ma, Sawhney & Steves, 1992). Los tejidos con paredes lignificadas se colorean de rojo. Los de paredes no lignificadas se colorean de celeste verdoso.

Coloraciones combinadas triples:

Hematoxilina-Safranina-Fast green (Conn, Darrow & Emmel, 1960). Los tejidos con paredes secundarias lignificadas, la suberina y cutina, se colorean de rojo. Las paredes celulósicas de azul-violeta y el citoplasma y núcleo de celeste verdoso.

Mordientes

El término mordiente se refiere a cualquier compuesto añadido antes o después de la tinción que realza las propiedades de un colorante. Los mordientes son generalmente metales como el manganeso, cromo, aluminio. Sin embargo, un mordiente también debe ser un compuesto tal como el ácido acético o el ácido pícrico, los cuales son añadidos para lavar la solución y realzar el brillo de una tinción como la eosina (ácido acético) o los colorantes violeta (ácido pícrico).

MONTAJE

Los medios de montaje se utilizan para mantener el cubreobjetos en su lugar, favoreciendo la observación. Para ser adecuado, debe tener un índice de refracción igual o muy parecido al del vidrio (1.518) y no afectar la coloración de los tejidos. El objeto a estudiar debe ser lo suficientemente fino como para permitir el paso de la luz a su través.

Medios de montaje más comunes

Agua: Se podrá utilizar agua destilada solo para la realización de preparados temporales. Esta técnica es económica, simple y rápida. La observación del material puede realizarse inmediatamente después de la coloración, pero el preparado no puede guardarse, ya que el agua se evapora deshidratando el material.

Glicerina diluida: Se usa con más frecuencia que la glicerina pura, por ser más fácil de manejar y limpiar. Los preparados semipermanentes montados con este medio pueden guardarse por un período prolongado de tiempo, siempre y cuando se selle correctamente el cubreobjetos con parafina o pintura de uñas y sean guardados en posición horizontal. Los preparados temporales montados con agua pueden hacerse semipermanentes agregándole glicerina.

Lactofenol: Es un medio de montaje temporario, con alto índice de refracción y en el cual son solubles muchos colorantes.

Bálsamo de Canadá (soluble en xilol): Es el medio de montaje más tradicional para la realización de preparados permanentes, ya que permite que el material se mantenga en excelentes condiciones por mucho tiempo. Solo puede usarse con materiales previamente deshidratados e inmediatamente luego del pasaje por xilol, por lo que es necesario realizar el montaje bajo campana de extracción. Su utilización requiere cuidado, ya que es un pegamento fuerte. El montaje con este medio es rápido, pero los preparados deben dejarse secar al menos 72 horas, para recién poder realizar la observación al microscopio.

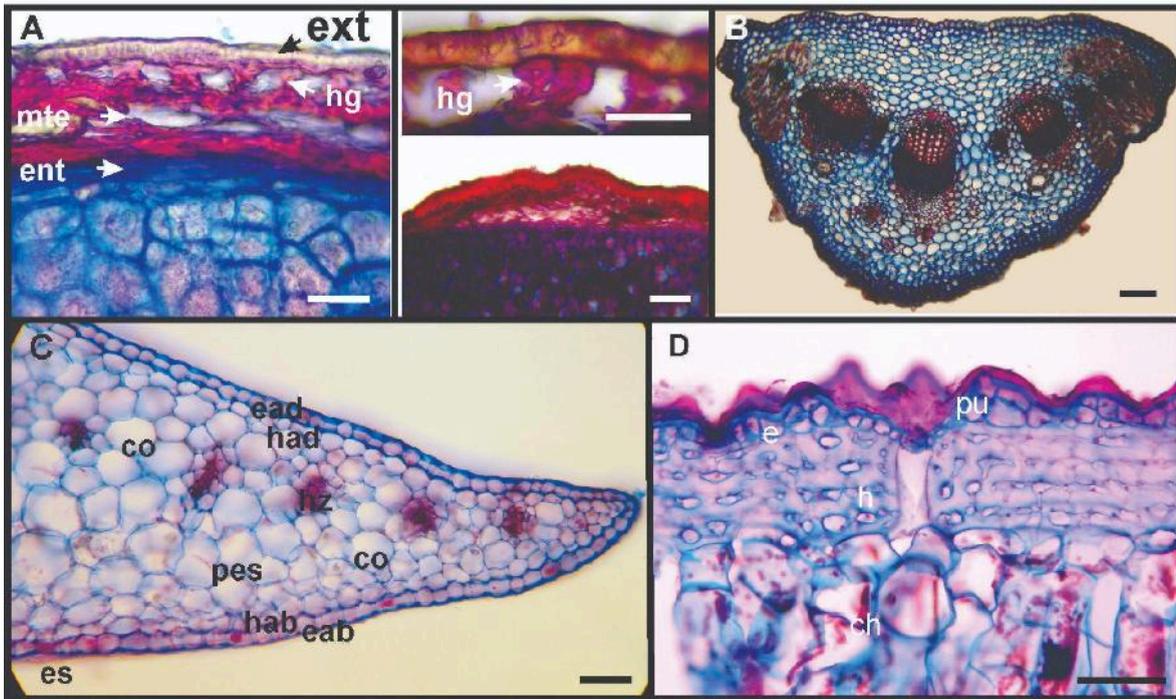
Bálsamo Euparal (soluble en alcohol): Se utiliza para realizar preparados permanentes a partir de preparados temporales montados en agua destilada, no haciendo falta la remoción del cubreobjetos.

Gelatina de KAISER

Disolver 50 g de gelatina en 175 ml de agua destilada (a baño María), agregar 150 ml de Glicerina y 7 g de fenol.

CAPÍTULO 5: EJECUCIÓN DE PREPARADOS TEMPORARIOS

Para la realización de preparados temporarios se utilizan técnicas sencillas y rápidas, lo que permite la observación casi instantánea de las estructuras, la desventaja es que no se pueden conservar por periodos prolongados de tiempo. Pueden realizarse con material fresco o fijado y los cortes se realizan a mano alzada y lo más importante a tener en cuenta es que la sección debe ser lo suficientemente fina como para permitir el paso de la luz del microscopio.



PREPARADOS TEMPORALES. A: Fruto *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart. B: Pecíolo de *Austroflourensia thurifera* (Molina) J.C. Ospina & S.E. Freire. C: Tépalos de *Trichocereus pseudocandicans* Backeb. ex R. Kiesling. D: Tallo de *Gymnocalycium pugionacanthum* Backeb. ex H. Till. Escala: A: 50 μm . C: 100 μm . G:150 μm . B: 200 μm .

EJECUCIÓN DE PREPARADOS TEMPORARIOS

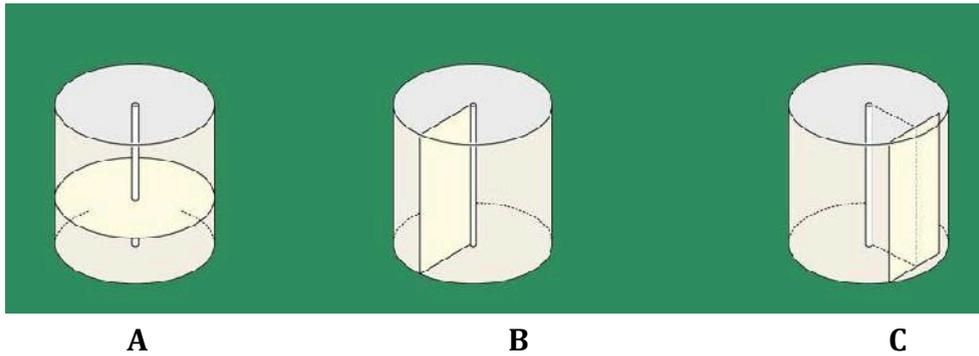
Obtención de los cortes

El material vegetal puede ser cortado para su estudio según tres planos:

Corte transversal: en un plano horizontal, perpendicular a la longitud del órgano.

Corte longitudinal radial: en un plano paralelo a la longitud del órgano que pasa por el centro.

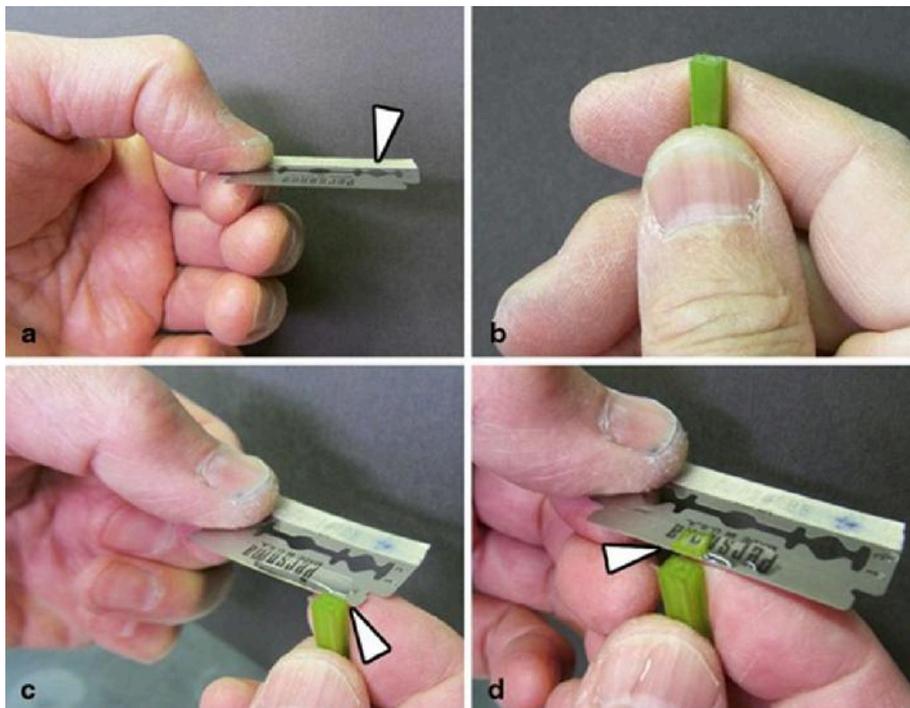
Corte longitudinal tangencial: en un plano paralelo al eje longitudinal del órgano que pasa entre la superficie y el centro.



Diferentes planos de cortes. *A: Corte transversal; B: Corte longitudinal radial; C: Corte longitudinal tangencial.*

CORTES TRANSVERSALES

El material vegetal se sostiene de manera vertical con la mano izquierda (o derecha, si es zurdo), manteniendo los dedos tan rectos como sea posible. Éste debe proyectarse pocos milímetros por encima del dedo índice y ser sostenido por el pulgar en su parte media o inferior. Con la otra mano, se sostiene firmemente la navaja u hoja de afeitar, con el filo dirigido hacia la persona que corta. Es imprescindible que tenga buen filo. El material y la navaja se mantienen hidratados a fin de evitar burbujas de aire.



Realización de cortes transversales de tallo. *a: Utensilio de corte señalando el filo. b: Posición recta del órgano vegetal entre los dedos. c-d: Deslizamiento de la cuchilla perpendicular al eje longitudinal del material vegetal.*

Para realizar los cortes, la hoja de afeitar se mantiene sobre el índice en un ángulo de 90° en dirección al material y se desliza de izquierda a derecha. Durante la operación, se tienen que mantener los codos contra el torso y la muñeca firme. No se usa la hoja de afeitar como serrucho. Una vez tallada la superficie de corte, y sin alterar la posición del material, se apoya nuevamente la navaja sobre el índice, esta vez con su filo cerca de la mitad de la superficie tallada y se desliza como antes para obtener una sección muy delgada del material, aunque sea incompleta.

Se realizan, de la misma forma, varios cortes no mayores que unos pocos mm² de superficie, los que se irán acumulando en la hoja de afeitar. Luego, se colocan dichos cortes en la gota de agua de un portaobjeto o en una cápsula de Petri con agua.

CORTES LONGITUDINALES

Se selecciona un trozo de material para cortar a lo largo. Según se quiera obtener un corte longitudinal radial o tangencial, la superficie tallada debe pasar por el centro del órgano o ser paralela a la superficie, respectivamente. El material se sostiene perfectamente vertical entre el dedo pulgar y mayor de la mano izquierda, de modo que la superficie de corte queda hacia la persona que realiza el corte; la punta de los dedos índice y anular se colocan en la cara opuesta.

La navaja se apoya sobre la superficie de corte, unos 2 mm próximos a su extremo inferior y se desliza hacia abajo, tratando de obtener un corte lo más fino posible y que abarque la mayor proporción del corte, es decir que puedan cortarse todos los tejidos desde la superficie hasta el centro del material. Se realizan varios cortes en la misma zona y luego se comienza a cortar a 4 mm del borde inferior y así, sucesivamente.

Los cortes se colocan en la gota de agua de un portaobjeto o en una cápsula de Petri con agua.

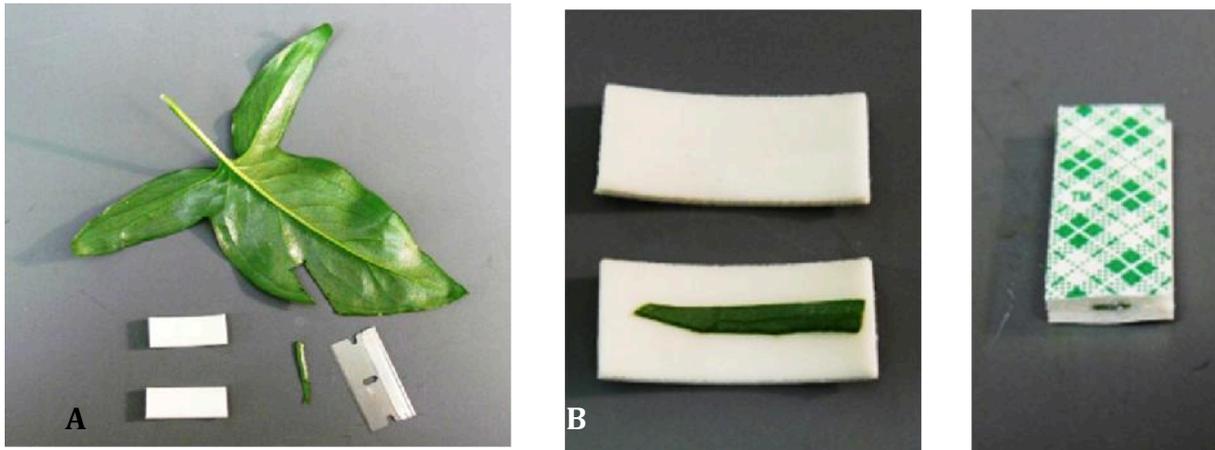
Este procedimiento no presenta dificultades si el material es un tallo. En cambio, cuando se trata de hoja o raíz, se recomienda colocar el material entre dos mitades de médula de saúco, zanahoria o láminas de telgopor, teniendo particular cuidado de ubicarlo perfectamente paralelo al órgano, si se quieren obtener cortes transversales y perfectamente transversal, si se desean cortes longitudinales. Ambos materiales se cortan juntos de la misma manera que se corta un tallo.

Para cortar raíces, es conveniente introducir entre las dos superficies de corte un palillo o cabo de pincel bien verticales y se aprieta, de modo que se marque un canal en ambas caras. Allí se inserta la raíz con el ápice hacia arriba y se cortan secciones en niveles sucesivos.

Para cortar hojas, se corta previamente un trozo que incluya la vena media y una porción de lámina a ambos lados; si la hoja fuese pequeña, se coloca entera entre ambas superficies de corte, cuidando que la nervadura principal quede perfectamente vertical, marcando un canal, como se indicó antes, si ella fuese muy sobresaliente.

Para obtener cortes paralelos a la superficie foliar, se enrolla la hoja alrededor de la médula de saúco, telgopor o zanahoria y se cortan secciones superficiales muy finas de la cara foliar que quedó hacia afuera. El mismo procedimiento se repite con la otra cara. Se debe tener la

precaución de no mezclar los cortes de distintas caras.



Cortes de hoja. a: Corte de un sector de hoja que incluye vena lateral y porción de lámina. b-c: Sector de hoja ubicada entre dos porciones de telgopor.



Soportes para cortes a mano alzada. De izquierda a derecha: sauco, telgopor y zanahoria.

Coloración y montaje del material

Los pasos a seguir son:

a) Limpiar cuidadosamente el porta y cubreobjetos, el polvo o suciedad impide una visión clara y pueden llevar a una falsa interpretación de lo que observa.

b) Colocar una gota de agua o glicerina 50% en el centro del portaobjetos, con un gotero o varilla de vidrio.

c) Seleccionar los cortes más delgados que se mantenían en agua y transferirlos al portaobjetos con la ayuda de las agujas o pinzas.

d) Colorear. Para realizar la tinción se utilizan colorantes acuosos. Los más utilizados para tejidos vegetales son Azul de Toluidina, Azul Astral, Fucsina básica y Safranina acuosa.

Se coloca una gotita de colorante y se deja actuar desde un segundo hasta varios minutos, dependiendo del material. Los colorantes básicos como Safranina y Fucsina tiñen inmediatamente, siendo necesario, a veces, sacar el exceso de colorante con el un papel

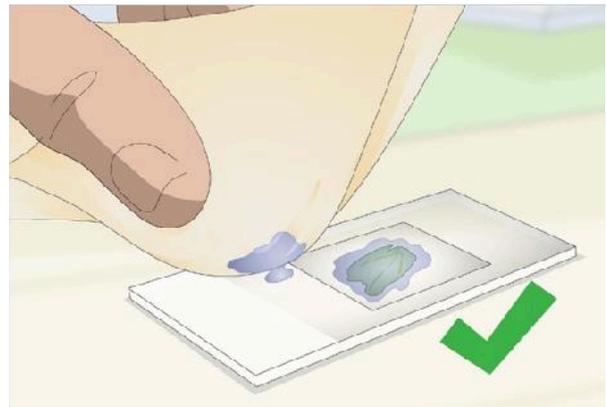
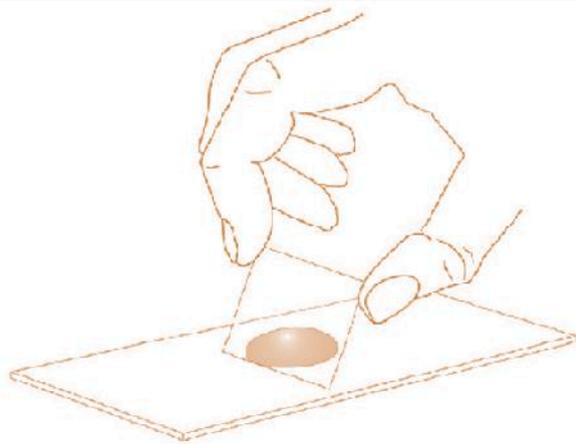
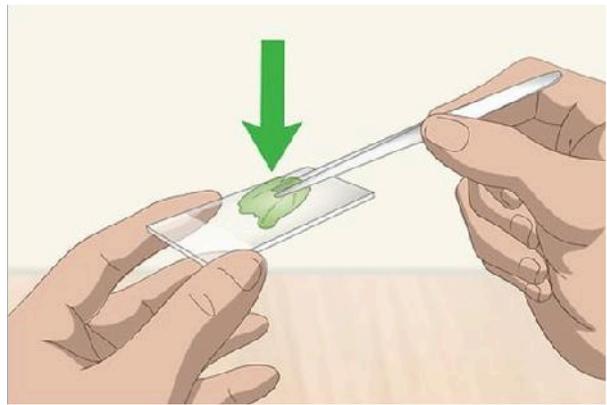
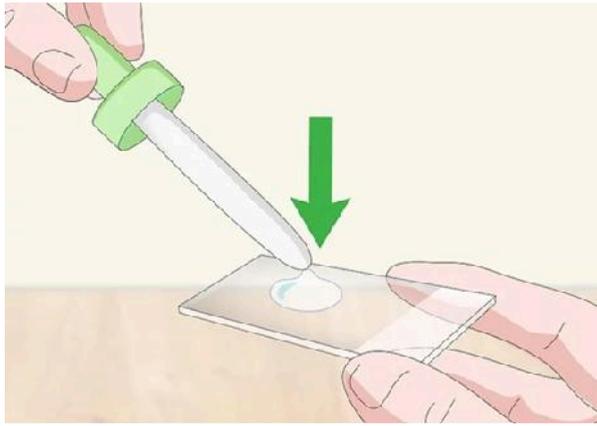
absorbente y agregar una gota de agua al portaobjetos, cuidando de que no sea abundante líquido.

e) Montar: Cubrir con el portaobjetos. Para ello, el cubreobjetos se sostiene verticalmente entre el índice y el pulgar de la mano izquierda, apoyando el borde inferior en la mitad izquierda del portaobjetos. Se desliza el cubreobjetos hacia la derecha hasta que toque la gota de agua. Se sostiene en su parte superior con una aguja de disección dejándolo caer suavemente sobre el material; de este modo, se evita la formación de burbujas de aire que pueden impedir o dificultar la observación.

El cubreobjetos debe quedar adherido firmemente al portaobjetos, como para que no resbale si se inclina el preparado. Si el cubreobjetos se desliza, significa que se utilizó demasiado líquido para montar el material; entonces, se quita el exceso de agua aplicando un papel secante o de filtro en el borde del cubreobjetos. Si por el contrario, el agua es escasa y no llena el espacio entre cubre y portaobjetos, se agrega líquido con la varilla de vidrio mojada o gotero.

El líquido no tiene que pasar por encima del cubreobjetos o por debajo del portaobjetos. En el primer caso, se ensuciará el objetivo del microscopio dificultando la visibilidad; en el segundo, se mojará la platina lo cual impide el libre movimiento del preparado. En ambos casos, podría dañar el microscopio.

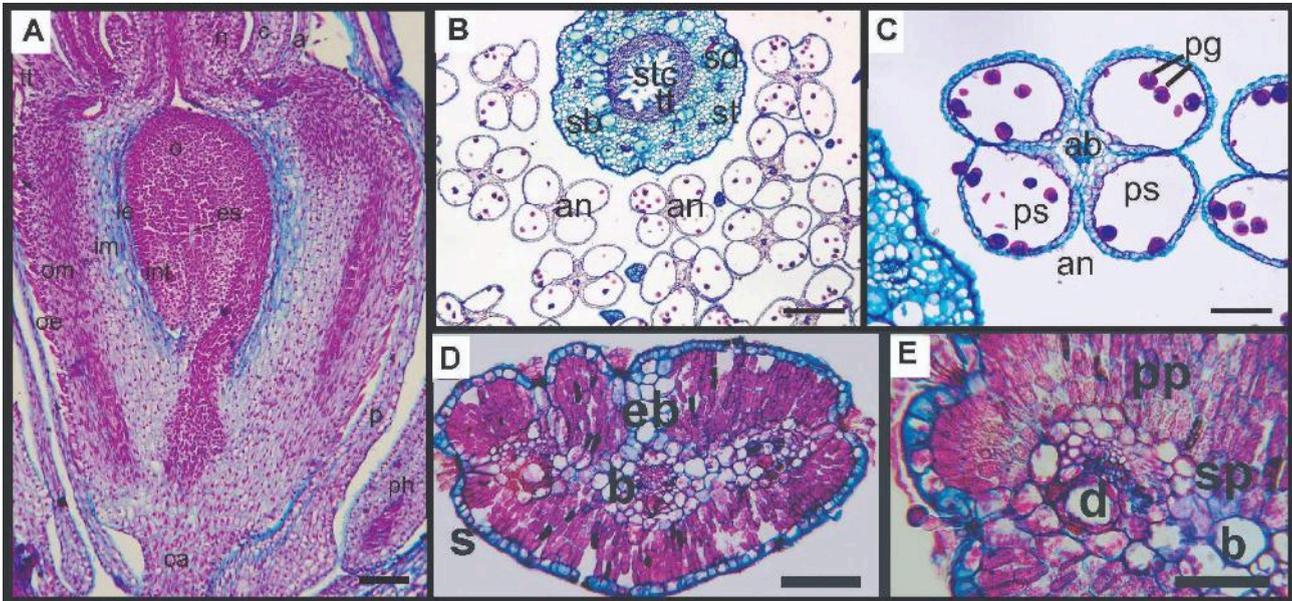
Además del agua, pueden usarse otros medios de montaje en los preparados temporarios que prolongan su duración, sobre todo si se bordea el cubreobjetos con esmalte de uñas o con parafina. El más usado es una mezcla de glicerina y agua al 50%.



Pasos de montaje de los cortes.

CAPÍTULO 6: EJECUCIÓN DE PREPARADOS PERMANENTES O DEFINITIVOS

Los preparados histológicos permanentes son utilizados en todo tipo de estudios anatómicos. Las técnicas descritas en esta sección son esencialmente para microscopía óptica de campo claro, sin embargo, pueden utilizarse para microscopio de fluorescencia ya que permiten ver compuestos que poseen auto-fluorescencia.



PREPARADOS PERMANENTES. A: Corte longitudinal y transversal por ovario y óvulo de *Austroflourensia thurifera* (Molina) J.C. Ospina & S.E. Freire. B: Corte transversal de flor a la altura del estilo y anteras de *Gymnocalycium bruchii* (Speg.) Hosseus, y C: detalle de antera. Corte transversal de hoja de *Baccharis aliena* (Spreng.) Joch. Müll. y E: detalle. Escala: A: 100 μm . D: 150 μm . E: 80 μm . B: 30 μm . C: 10 μm

MÉTODO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

Fijación

Para la técnica de inclusión en parafina, el fijador más utilizado es el FAA (una mezcla de Formaldehído, Ácido Acético, Alcohol 96° y agua destilada). Una vez colectado el órgano a estudiar, se debe colocar lo más pronto posible en el líquido fijador por un mínimo de 48 horas etiquetando el frasco con nombre, procedencia y fecha de recolección del material.

Deshidratación

Se debe tener en cuenta que, todos los tejidos vegetales que se quieren estudiar contienen agua, además, la mayoría de los medios de inclusión son hidrofóbicos (es decir, no son miscibles en agua), por lo cual, el agua debe ser removida y reemplazada por solventes orgánicos. Por ello, es necesario deshidratar el material pasándolo por una serie de alcohol etílico de graduación ascendente (70°, 80°, 90°, 95° y 100°), dejándolo en cada uno un mínimo de 1 hora, (este paso llevará 5 hs aproximadamente). Luego colocamos el material en Alcohol Butílico normal en el cual se puede dejar hasta 24 hs (más tiempo no es recomendable ya que el material se endurece mucho). Finalmente, pasar a Xilol limpio durante 1 hora y luego hacer

un cambio a otro Xilol limpio durante 1 hora más.

Inclusión

Para obtener cortes suficientemente delgados es necesario incluir el material en alguna sustancia que actúe como soporte, como es la Parafina. La parafina es un medio de inclusión de aspecto ceroso formada por una mezcla de hidrocarburos que tienen diferentes temperaturas de fusión (entre 40 y 70°C). Las marcas comerciales son Histowax® o Paraplast®, entre otras. Vienen en diferentes presentaciones y se elige el adecuado según si el material con el que estamos trabajando es muy duro, duro o blando.

La inclusión consiste en colocar el material ya deshidratado en mezclas de Xilol-Parafina en proporciones 3:1 (por un período aproximado de 3 horas) y luego 1:3 (en esta mezcla, que posee menos Xilol, puede dejarse de 3 hasta 24 horas). Se realiza en frascos de vidrio (ya que el xilol derrite el plástico y oxida el metal) que serán del tamaño adecuado para que el material quepa cómodamente y logre impregnar bien con la parafina. El medio de inclusión entra al material por presión de la columna que queda por encima de aquél.

Debe agregarse parafina previamente fundida en estufa al material que está en xilol y volver a colocarlo en estufa a la temperatura adecuada para el medio de inclusión que estemos utilizando. Posteriormente, se hacen dos cambios con parafina pura. Si el material no es muy frágil, es conveniente dejarlo en el 1° cambio de Parafina por más de 24 hs, para que se impregne bien. Dejarlo más de 24h podría endurecer mucho al material, pero no dejarlo el tiempo suficiente puede traer más problemas, ya que tendríamos que descartar el material completamente porque no se podría seccionar por una mala impregnación.

El próximo paso es colocar sobre una plancha tibia, cubetas hechas con papel resistente plastificado para poder volcar en ellas el material con parafina recién sacado de la estufa, el cual se acomoda con una aguja histológica.

Siempre se debe colocar la etiqueta con los datos correspondientes en una orilla de la caja.

Cuando el pan de parafina con el material vegetal esté completamente frío, se desmolda de la caja o cubeta de cartón y se lo deja endurecer un tiempo antes de pasar al seccionamiento. Este pan de parafina se puede guardar por un tiempo, para ello separar cada pan individualmente en una bolsa o caja y mantenerlo preferentemente en la heladera o en algún lugar fresco.

Seccionamiento

Con una espátula previamente calentada en mechero, se corta el pan de parafina en cubos que contienen el material que se desea cortar.

El cubo obtenido se pega sobre un taco de madera o sobre el soporte especial de micrótopo. Dicho taco se coloca en el micrótopo rotatorio, Tipo Minot y se procede a seccionar. El grosor depende de la dureza del material, pero se secciona con un grosor de entre 5 y 20 μm . La tira de parafina que se forma se va recogiendo con una aguja o pincel y se coloca sobre una cartulina, preferentemente de color negro, y se van acomodando en orden de aparición las nuevas tiras que se van obteniendo.

Para preparados definitivos, los cortes histológicos se realizan con un aparato llamado micrótopo, que permite obtener secciones desde pocas micras de espesor. Existen varios tipos de ellos:

En el micrótopo de rotación, la cuchilla se mantiene fija y el material se mueve verticalmente, en un plano de 90° con respecto a ella. El material debe estar incluido en parafina y permite obtener secciones sucesivas que se adhieren unas a otras en el filo de la cuchilla, de modo que se forma una tira de cortes en serie.

En el micrótopo de deslizamiento, la cuchilla se mantiene fija y el material se desliza horizontalmente, en un plano de 90° con respecto a ella; o el material se mantiene fijo y es la cuchilla quien se mueve. Es muy útil en la preparación de cortes por leño; el material no requiere inclusión y los cortes resultan aislados.

Con el micrótopo de congelación, se pueden obtener cortes de materiales sin incluir pero congelados mediante vapores de éter o CO². Suele utilizarse para la obtención rápida de cortes aislados.

Adhesión de los cortes

Extender un poco de adhesivo (albúmina de Mayer) sobre un portaobjetos muy limpio y sobre él, una película de agua. Cortar la tira obtenida en el micrótopo en fragmentos, un poco más cortos que el largo del cubreobjetos a utilizar, y acomodarlos en orden sobre el portaobjetos. Calentar con cuidado el preparado sobre un calentador de temperatura regulable, hasta que los cortes se estiren sin que se derrita la parafina. Escurrir el exceso de agua sobre un algodón o papel absorbente, reacomodar las tiritas si fuese necesario y dejar secar más o menos durante 24 horas a temperatura ambiente.

Coloración

Una vez obtenidos los cortes, se deben colorear. La coloración facilita el reconocimiento de las estructuras y tejidos del órgano que queremos estudiar. Los colorantes se preparan con agua o con alcoholes de graduación específica. Las coloraciones se pueden llevar a cabo desparafinado o no el material. A medida que voy conociendo mi material de trabajo, se puede variar el tiempo o la cantidad de pasajes por alcoholes que podemos hacer. Siempre debemos respetar la graduación alcohólica con la que está preparado el colorante específico que estemos utilizando. Debemos tener en cuenta que el material incluido está deshidratado, por lo que, probablemente a medida que transitamos por la coloración, iremos re-hidratando el material (es decir usaremos alcoholes de graduación alcohólica descendente). Algunas de las coloraciones más utilizadas son:



1- OBTENCIÓN DE MUESTRA Y FIJACIÓN

2- DESHIDRATACIÓN



3- IMPREGNACIÓN E INCLUSIÓN



4- ARMADO DE PANES DE PARAFINA



5- TALLADO Y SECCIONAMIENTO



6- ADHESIÓN DE CORTES



7- COLORACIÓN



8- MONTAJE

Sucesivas etapas de la ejecución de un preparado permanente.

1) COLORACIONES CON DESPARAFINADO PREVIO DEL MATERIAL

Las siguientes coloraciones requieren eliminar todo el medio de inclusión del material a teñir, para ello, proceder de la siguiente manera: colocar los preparados en Cajas de Coplin con Xilol puro. Si los cortes poseen un espesor aproximado de entre 5 y 10 μm , se los dejará entre 30 min y 1 hora. Si el material a desparafinar es más grueso, el tiempo será mayor. Luego hacer otro pasaje por Xilol y dejar 15-20 min para eliminar completamente la parafina.

Coloración triple con Hematoxilina activada, Safranina y Fast green. (Modificado de Conn, Darrow & Emmel, 1960). Luego de desparafinar, hidratar con una serie descendente de alcohol etílico (100°, 90°, 80°, 70°), dejar unos cinco minutos en cada paso. Teñir con "Hematoxilina" activada durante 2 minutos. Lavar con agua corriente y realizar un pasaje con alcohol 70°, para posteriormente colocar la "Safranina" 1% en alcohol, durante 2-3 hs. Lavar con alcohol 70° y pasar por alcohol 80° y 90° para deshidratar. Contrastar con fast-green al 0,2% en alcohol 95°, durante 2 o 3 minutos. Se continúa con la hidratación con un pasaje por alcohol 96°, y se finaliza con dos pasajes rápidos por alcohol absoluto y otros dos en xilol, para luego montar. **Colorea** los tejidos con paredes secundarias lignificadas, la suberina y la cutina se colorean de rojo. Las paredes celulósicas azul-violeta y el citoplasma y núcleo de celeste verdoso.

Coloración con Violeta de Cresyl 0,5 % solución acuosa (Dizeo de Strittmatter, 1980). Luego de desparafinar, pasar por una serie descendente de alcoholes hasta alcohol 50°, colorear con Violeta de Cresyl durante 10 minutos, lavar bien con agua destilada, pasar por ácido acético al 1% en alcohol 50° o por alcohol 50° dejándolo un corto tiempo (2 ó 3 minutos). Lavar con agua destilada. **Colorea** de rosa los tejidos parenquimáticos y epidermis. De azul, el xilema, las fibras, núcleos y cromosomas. De rojo el citoplasma. Es una coloración metacromática.

Coloración doble con Azul Astral y Safranina (modificado de Maácz & Vágás, 1961). Luego de desparafinar, el material se hidrata en una serie descendente de alcoholes (100°, 90°, 80°, 70°, 60°, 50°). Colorear con Azul Astral durante 2 hs. Luego, lavar con agua destilada. Colorear con Safranina durante 5-10 minutos, lavar con agua destilada. Deshidratar con alcoholes, 70°, 80°, 90°, 95° y 100°. Pasajes de etanol-xilol 2:1; xilol-etanol 1:2; xilol puro y montar. **Colorea** la celulosa de azul cobalto, la lignina de rosado, los núcleos de rojo, los taninos de rojo y el citoplasma rojizo.

Coloración doble con Azul Astral y Fucsina Básica (Krauss *et al.*, 1998). Luego de desparafinar, hidratar el material en una serie descendente de alcoholes 100°, 90°, 80°, 70°, 60° y 50°. Colorear con Azul Astral durante 2-3 hs. Luego lavar con agua destilada. Colocar en Fucsina Básica al 0,5% de segundos a varios minutos. Lavar con una serie ascendente de alcoholes 60°, 80° y 100°. Pasar 2 veces por xilol puro y montar. **Colorea** de azul cobalto los polisacáridos de la pared celular como la celulosa y pectinas, de rosado las paredes lignificadas, suberificadas o cutinizadas, cloroplastos y ácidos nucleicos.

2) COLORACIONES SIN DESPARAFINAR EL MATERIAL

En este tipo de coloraciones, el desparafinado se hace luego de la tinción.

Coloración doble con Safranina y Fast-green (Ma, Sawhney & Steves, 1992). Se colorea con safranina 1% durante 20 a 30 minutos, se lava con agua destilada durante 1 minuto y luego se le agrega fast-green durante 10 minutos. Se lava con agua destilada y se seca a 37° durante 30 minutos. Se remueve la parafina en 2 cambios de xilol cada uno de 5 minutos. **Colorea** los tejidos con paredes lignificadas de rojo, las paredes no lignificadas se colorean de celeste verdoso.

Coloración con Azul de Toluidina al 0,5 % (Sakai, 1973). Colorear los preparados con Azul de Toluidina 0,5% durante 2 a 3 minutos según el material. Lavar con agua y dejar secar. La parafina es removida con 2 cambios de xilol, montar con bálsamo. **Colorea** los tejidos lignificados, suberificados y con taninos de azul verdoso, mientras que los tejidos no lignificados se tiñen de rojo púrpura. El almidón no se tiñe, mientras que el citoplasma es púrpura y el núcleo azul o azul-verdoso.

Coloración con Azul Brillante de Cresilo al 0,05 % (Pérez, A. N & V. H. Tomasi, 1997). Los cortes se colorean en una caja de Coplin con una solución acuosa de Azul brillante de Cresilo durante 2' a temperatura ambiente, se enjuaga con agua corriente y se deja secar. Luego se desparafinan con xilol y se montan. **Colorea** la cutícula de celeste claro, el contenido epidérmico de amarillo pardo, floema y parénquima de rojo violáceo, paredes lignificadas de las fibras azul intenso, xilema de celeste verdoso, nectarios y células secretoras verde esmeralda, núcleos y citoplasma de azul claro, engrosamientos del endotecio de azul.

Montaje

Colocar una gota de bálsamo de Canadá (u otro medio de montaje soluble en xilol) sobre el portaobjetos, antes de que se evapore el solvente. Colocar el cubreobjetos, cuidando de que no se formen burbujas de aire. Dejar secar en posición horizontal al menos 72 horas. Limpiar el exceso de bálsamo, si fuese necesario, con solvente (xilol). Etiquetar el preparado.

INCLUSIÓN EN RESINAS SINTÉTICAS

Resina tipo Epoxi

Es importante destacar que además de los medios de inclusión mencionados, existen también las resinas sintéticas, que son materiales de alta dureza que permiten obtener secciones de tejido muy delgadas. Fueron primeramente introducidas como medio de inclusión para MET, pero tiempo después fue reconocido su valor para la microscopía óptica. El procedimiento estándar de inclusión es similar al descrito para la parafina, con algunas modificaciones.

Los pasos que se siguen son: fijación de las muestras por inmersión o perfusión, deshidratación, líquido intermediario, infiltración y polimerización en el medio de inclusión.

Las soluciones fijadoras suelen contener glutaraldehído y es necesaria una postfijación en tetróxido de osmio. Con ello se asegura una fuerte fijación para preservar la ultraestructura celular y que no se pierdan los lípidos que forman las membranas celulares. Luego se realiza un endurecimiento del medio de inclusión por polimerización, normalmente a 60° C. Posteriormente se le añaden aceleradores y plastificantes que regulan las características de la polimerización y la dureza de la resina polimerizada.

Resinas sintéticas Kulzer:

Fijación

Glutaraldehído. Buffer fosfato (1:4). Luego de 24 hs se pasa a alcohol etílico 70%.

Inclusión

1) Deshidratación. Alcohol 70°, 96°, 100°, 1 ó 2 horas en cada uno a temperatura ambiente.

2) Alcohol 100% . Technovit 7100 (1:1), 1 ó 2 horas a temperatura ambiente.

Se lleva una bomba de vacío para eliminar el aire de los tejidos. Usar frascos de vidrio.

3) 100 ml Technovit 7100 + 1 gr “Hardner I” –endurecedor- (Solución A), de 12 a 24 horas.

Antes de colocar la solución en los frascos con el material, separar 15 ml que se usarán al otro día.

4) Agregar 1 ml “Hardner II” a los 15 ml de Solución A, 3 a 4 minutos. Mezclar por 1 minuto.

5) Primero se coloca el material en los moldes y luego se rellenan con la solución del paso

4. Con agujas y pinzas histológicas se acomoda el material en la posición deseada. Se deja polimerizar más de 12 hs a temperatura ambiente.

6) Colocar Histoblock (soportes de plástico).

7) Agregar Technovit 3040 (2 partes polvo: 1 parte líquido). Mezclar con varilla de vidrio. Se agrega en el espacio vacío de los histoblock.

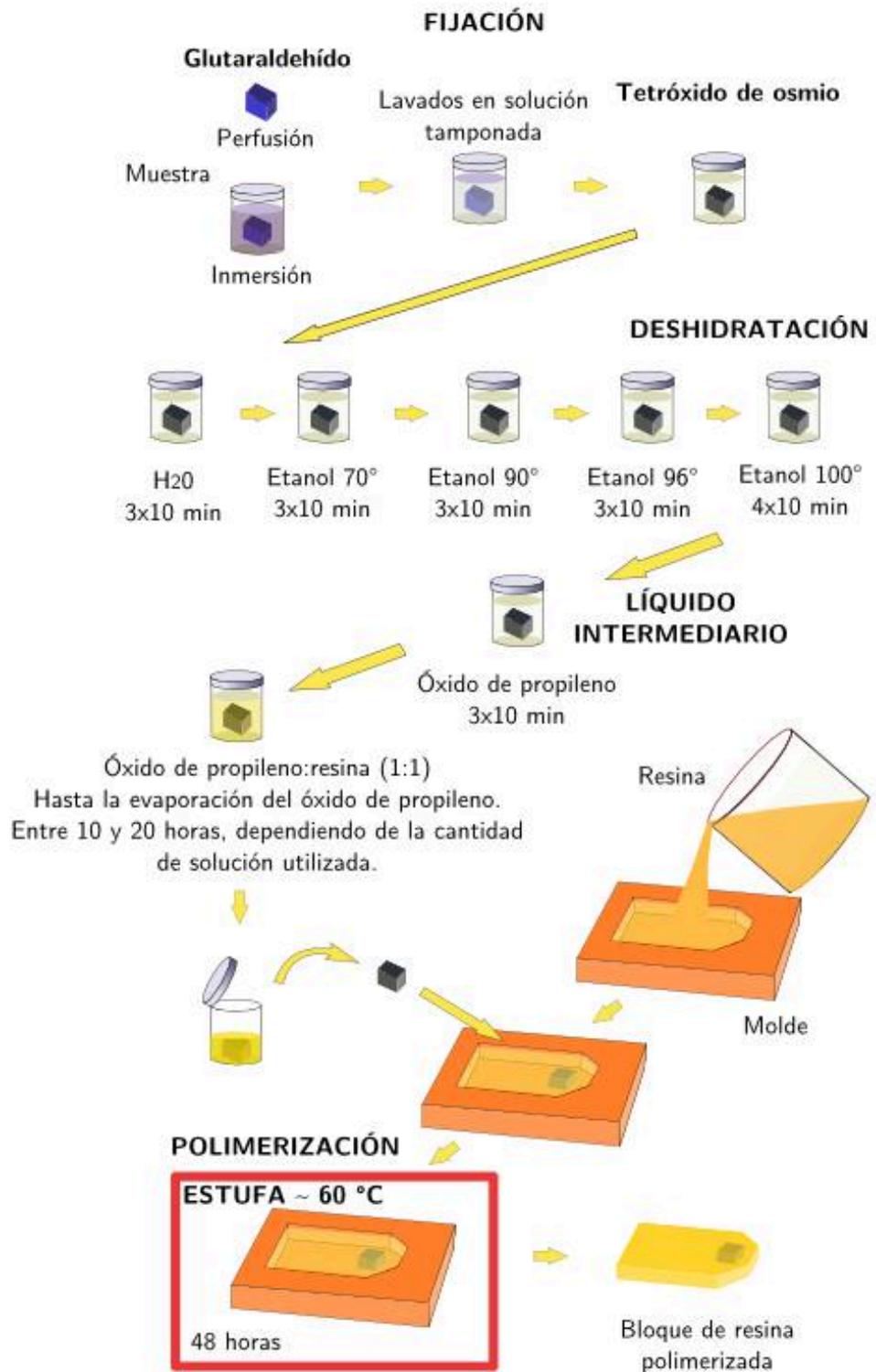
8) Desmoldar después de 100-120 minutos.

Coloración

Se realiza la coloración con Azul de Toluidina o con Azul Brillante de Cresilo sin remover o eliminar las resinas. Los preparados se colocan en cajitas de vidrio y se llevan a la estufa por 15 minutos a 60° C. Luego se colorean por 4 o 5 minutos sobre plancha caliente. Se enjuagan con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente.

Montaje

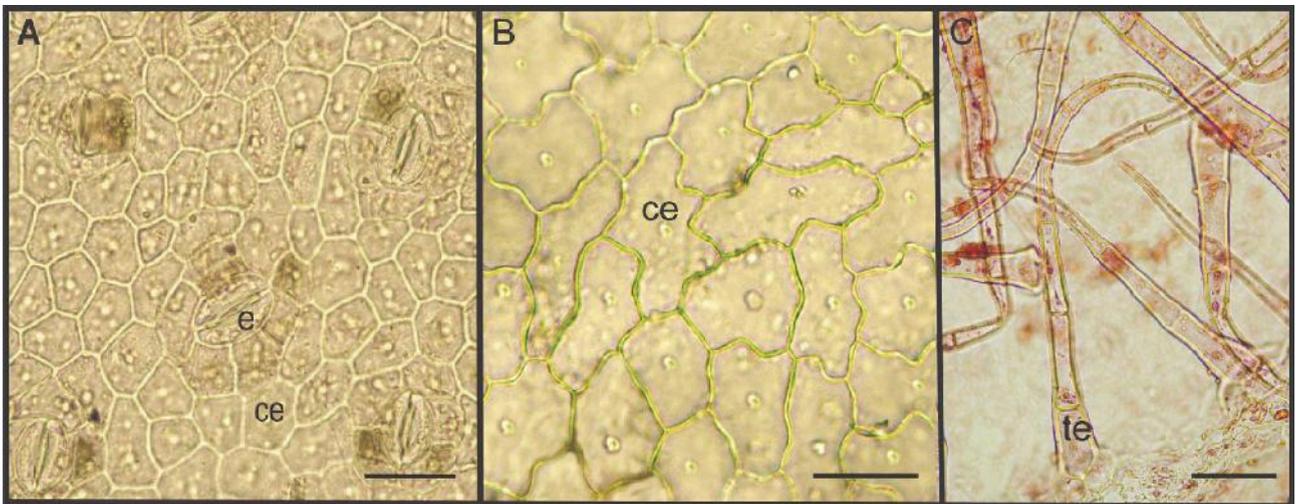
Se coloca xilol y finalmente se montan los preparados histológicos con bálsamo.



Proceso de inclusión en resinas de tipo epoxy.

CAPÍTULO 7: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DE LA EPIDERMIS

La epidermis es el tejido que recubre todo el cuerpo primario de la planta estableciendo el límite con el exterior, excepto la caliptra que protege el ápice radical. Tiene su origen en la protodermis, la cual corresponde a capa de células más externa de los meristemas apicales. Entre las principales funciones de este tejido pueden mencionarse la protección mecánica, transpiración e intercambio de gases a través de los estomas. Protege a los tejidos internos de los agentes externos adversos, como frío, calor, pérdida de agua, ataque de insectos, etc. Como funciones accesorias se pueden destacar secreción, absorción, acumulación de agua y productos metabólicos, entre otras. Los tricomas pueden disminuir la pérdida de agua por transpiración y también son un mecanismo de defensa contra el ataque de insectos o patógenos. Ocasionalmente, la epidermis también puede tener potencial meristemático ya que el felógeno puede originarse de ella.



Epidermis. Vista superficial de extendido de epidermis. A: Hipofilo con estomas anomocíticos de *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. B: Epifilo sin estomas y C: Tricomas cónico simple de *Ophryosporus axilliflorus* (Griseb.) Hieron. Escalas: 25 μ m.

Estructura

La epidermis contiene una gran variedad de tipos de células. Las más abundantes son las células epidérmicas propiamente dichas, y dispersas entre ellas están los estomas, tricomas, células buliformes, células suberosas y/o silíceas, etc.

Las células epidérmicas propiamente dichas siempre forman un tejido compacto, sin espacios intercelulares; en vista superficial pueden ser isodiamétricas o alargadas y las paredes radiales pueden ser rectas u onduladas. No tienen cloroplastos diferenciados, excepto en plantas de hábitat umbroso o acuáticas. Las paredes radiales y la tangencial interna son delgadas; en cambio, la pared externa que está en contacto con el exterior, es gruesa y está impregnada de sustancias pécticas y cutina constituyendo las capas cuticulares. Hacia el exterior de la pared externa se forma una capa de cutina pura llamada cutícula, a veces muy gruesa, especialmente en las plantas xerófitas. Las células epidérmicas se comunican entre sí

mediante plasmodesmos y con el medio exterior mediante ectodesmos. Por fuera de la cutícula pueden depositarse ceras que salen al exterior a través de los ectodesmos.

Los estomas son estructuras especializadas en realizar el intercambio gaseoso. Están distribuidos en la epidermis de toda la parte aérea de la planta, tallos herbáceos, flores, frutos, pero principalmente en las hojas. Los estomas están formados por dos células oclusivas que generalmente son reniformes, y entre ellas dejan un poro llamado ostíolo. La pared celular cóncava de las células oclusivas que bordea el poro está engrosada; mientras que, la pared dorsal que limita con las otras células epidérmicas es delgada. Por los ostíolos ingresa y egresa aire, que contiene vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono; de manera que, ese intercambio gaseoso hace posible funciones fundamentales para la planta como la transpiración, la respiración y la fotosíntesis.

La apertura y cierre estomático puede variar con un ritmo circadiano (día/noche) y está determinada por cambios de turgencia de las células oclusivas. Este mecanismo es un fenómeno fisiológico complejo que está regulado en la planta por varios factores ambientales como la luz, la concentración de dióxido de carbono y la disponibilidad de agua. Estos factores externos en conjunto modifican factores internos, como la concentración de iones, de sacarosa y el equilibrio de ciertas hormonas. Estos a su vez provocan cambios de turgencia entre las células oclusivas y las células que las rodean, que, gracias a la diferencia de grosor de las paredes celulares y a la disposición radial de las microfibrillas de celulosa, producen finalmente que el ostíolo se abra o cierre.

ESTUDIO DE LA EPIDERMIS

Principales aplicaciones del estudio de la epidermis

Resolver problemas taxonómicos. Determinar alteraciones histológicas inducidas por contaminación ambiental. Conocer el daño provocado por diversas enfermedades. Determinar la dieta de los herbívoros. Establecer las causas de envenenamientos. Reconocer adulterantes y contaminantes. Inferir las condiciones ambientales en que vive la planta.

FRECUENCIA E ÍNDICE ESTOMÁTICO

La frecuencia o densidad (DE) estomática es el número de estomas por unidad de área de superficie foliar y representa un valor diagnóstico para fragmentos de láminas foliares.

El índice estomático (IE) sirve para expresar el número de estomas por superficie foliar, independientemente del tamaño de las células epidérmicas.

Tanto la DE como el IE pueden estar influenciados por las condiciones ambientales y nutricionales.

Para determinar el IE se aplica la siguiente fórmula

$$\text{IE} = \frac{\text{Frecuencia de estomas}_{\text{mm}^2}}{\text{Frec. Estomas} + \text{Frec. cél. epidérmicas}} \times 100$$

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE EPIDERMIS

Obtención de epidermis foliar

Peeling

1) Tomar una hoja de la especie que se desea estudiar e introducir la punta de la aguja histológica apenas por debajo de la epidermis.

2) Levantar un trozo pequeño, tomarlo con la pinza de puntas finas y tirar hasta desprenderlo.

3) Montar el material sobre un portaobjetos con una gota de glicerina al 50% cuidando que la superficie exterior de la epidermis quede hacia arriba.

4) Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio, si los ostiolas se ven negros es porque hay aire, sacar el cubreobjeto agregar más glicerina y calentar suavemente a la llama hasta que se desplacen las burbujas. Si con esto no se logra buen resultado, pasar la epidermis por alcohol 96%.

El material se puede colorear sumergiéndolo en safranina al 80% durante 5 minutos, para luego enjuagar con agua destilada y volver a montar en glicerina.

Método de Jeffrey

1) Utilizar la mezcla de Jeffrey (partes iguales de ácido crómico y ácido nítrico al 10%) diluída con agua destilada al 50%. Esta solución ataca al mesofilo, cuando se observa que no quedan restos de éste, se vuelca la mezcla y se lava varias veces el material.

2) Ayudándose con pinzas y agujas se separan ambas epidermis y se colorea con una solución de safranina al 80% para montar luego en glicerina al 50%.

Raspado. Técnica de Metcalfe

1) El material que se desea estudiar debe estar colocado en el portaobjetos con la epidermis hacia abajo y se debe raspar la superficie suavemente con una hoja de afeitar y colocar sobre la misma unas gotas de solución concentrada de hipoclorito de sodio durante 15 minutos.

2) Raspar con la hoja de afeitar la epidermis y el mesófilo hasta aproximarse a la epidermis inferior, agregarle una gota de hipoclorito de sodio y con pincel de escobilla de plástico sacar los restos de mesófilo.

3) Hacer lavados con agua, con gotero sobre el portaobjetos, en el penúltimo lavado colocar 2 gotas de amoníaco y luego enjuagar con agua destilada.

Técnica de hidróxido de potasio al 3%

1) Se coloca el material cortado en trozos en una solución de hidróxido de potasio al 3% y se hierve en un recipiente tapado durante 10 a 30 minutos de acuerdo a la consistencia de la hoja. Si el material es muy delicado se trabaja con hidróxido de potasio al 1% y se reducen los tiempos.

2) Se lava varias veces el material y se lo coloca sobre un portaobjetos con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo para separar con ayuda de aguja y pincel la epidermis superior y el mesofilo.

3) Lavar varias veces con agua y retirar los restos de mesofilo con un pincel.

4) Pasar el material a un portaobjetos limpio colorear con safranina diluída y montar en glicerina al 50%.

Obtención de improntas

Se usa para estudiar los movimientos de apertura y cierre de estomas *in situ*. Los materiales usados son esmalte de uñas incoloro, acetato de celulosa, gelatina-glicerina y gomas siliconadas.

El esmalte de uñas se emplea para hojas coriáceas, a las cuales se les pasa con un pincel el esmalte, una vez seco se repite la pincelada en el mismo lugar y luego se levanta la impresión con ayuda de una pinza y se monta en glicerina.

Técnicas de diafanización para hojas y órganos florales

La diafanización permite transparentar los tejidos y se usa para estudiar la distribución del tejido vascular en estudios taxonómicos. Para hojas y flores delicadas se aconseja las siguientes técnicas:

Técnica de Foster

1) Si el material es fresco se hierve durante unos minutos en alcohol 70 % para remover la clorofila. Si el material es seco, se hierve unos minutos en agua.

2) Se coloca el material en una solución de hidróxido de sodio al 3 ó 5% a temperatura ambiente si se trata de un material delicado, si el mismo es resistente se pone a estufa a 45°. El reactivo se cambia con frecuencia hasta que no decolora más. El tiempo de esta etapa puede variar de 24 a 48 h o más dependiendo del material.

3) Una vez que el material está transparente se deja una noche en agua destilada y se transfiere a hidrato de cloral durante 24 hs.; para quitarle opacidad se puede dejar indefinidamente en hidrato de cloral.

4) Para colorear, enjuagar previamente con agua destilada y colocar en safranina 80%, se monta en glicerina al 50%.

Técnica de Bayley & Nast

1) Se coloca el material fresco o conservado en una solución acuosa de hidróxido de sodio al 3%, se tapa bien para evitar evaporación y se coloca a estufa a 55° hasta transparentar.

2) Lavar con agua destilada y conservar en alcohol 70° hasta su coloración.

Técnica de Fuchs

1) Se coloca el material en alcohol 70° durante varios días o en FAA.

2) Se prepara una solución de fucsina básica disuelta en 100 ml de agua hirviendo, cuando se enfría se agrega 10 g de hidróxido de sodio sólido.

3) Se coloca el material en la solución en estufa a 60° durante 10 a 14 hs.

4) Se lava el material durante 12 h cambiando el agua con frecuencia hasta que los vasos del xilema se tornan rojos.

5) Se deshidrata el material en alcohol 50°, 70° y 95°, durante 12 h.

6) Se pasa a alcohol 100° durante 1 ó 2 h.

7) Se coloca el material en solución de 3:1 de alcohol 100° y ácido clorhídrico concentrado durante 1 a 15 minutos, la lignina se pone verde oscura.

8) Se lava por 24 hs. en alcohol 100° se hacen 2 pasajes en xilol y se monta en bálsamo.

Técnica para la diafanización de hojas resistentes

Técnica de Dizeo de Strittmater

- 1) Colocar el material fresco o previamente fijado en alcohol 96º y hervir durante 10 minutos.
- 2) Cambiar a una solución de alcohol 96º e hidróxido de sodio al 5% y hervir durante 5 a 10 minutos según el material.
- 3) Lavar hasta que el agua salga limpia y pasar el material a agua destilada y realizar 2 cambios.
- 4) Transparentar con una solución de hipoclorito de sodio al 50% variando el tiempo de acuerdo al material.
- 5) Pasar a agua destilada y hacer 5 cambios de 3 minutos cada uno. Colocar en hidrato de cloral para restale opacidad durante 5 a 10 minutos.

Técnicas de maceración

La maceración consiste en la disolución de la laminilla media provocando la disociación de los tejidos, permitiendo así la observación individual de las células que los constituyen.

Generalmente se usa para estudios de leño y de frutos y semillas esclerificadas.

Método de Jeffrey

- 1) Colocar en un frasco de vidrio con tapa el material y partes iguales de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%.
- 2) Se lleva a estufa el material si se desea acelerar la reacción, el tiempo depende de los materiales.
- 3) Con ayuda de una aguja histológica compruebe la consistencia del material, retire de la estufa cuando haya adquirido una consistencia blanda.
- 4) Lavar varias veces.
- 5) Colocar el material sobre un portaobjetos, aplastar suavemente con la aguja y agregar safranina para colorearlo.
- 6) Montar en glicerina.

Método de Boodle

Es el método más rápido y menos drástico.

- 1) Se hierve el material con hidróxido de potasio al 5% y luego se lava bien con agua destilada.
- 2) Colocar el material en un tubo de ensayo con ácido crómico al 10% durante 30 a 60 minutos o más si es necesario.
- 3) Retirar cuando el material tenga consistencia blanda.

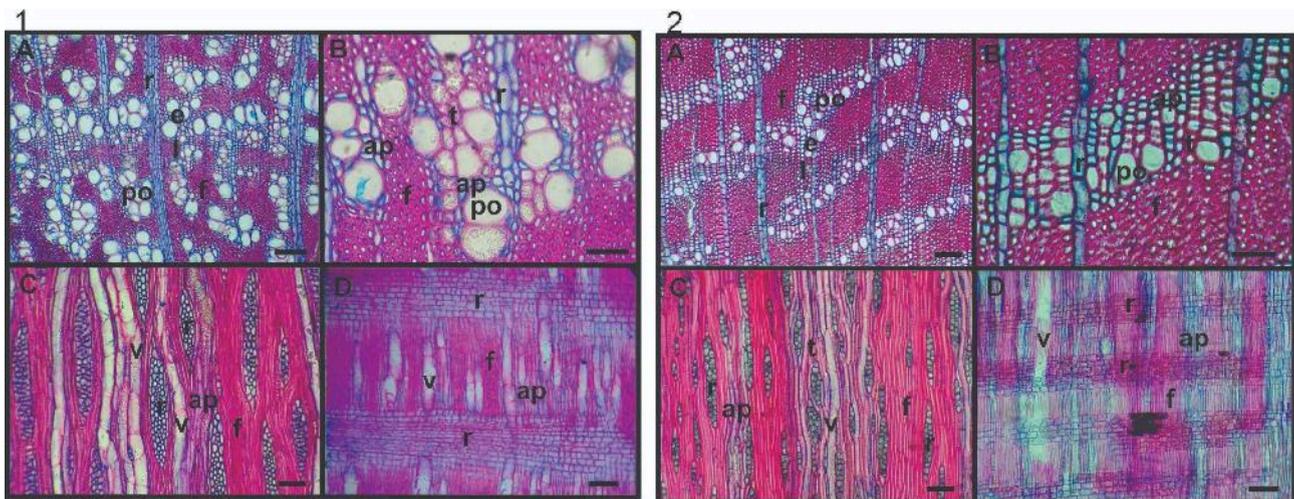
CAPÍTULO 8: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DEL LEÑO

Denominamos leño al xilema secundario formado a partir del cambium. Su función principal es la conducción de agua y solutos, aunque también interviene en el sostén de la planta. Se desarrolla especialmente en tallos y raíces de Eudicotiledóneas leñosas, Coniferophyta, Cycadophyta, Ginkgophyta y Gnetophyta (“Gimnospermas”).

Presenta sus componentes celulares ordenados en dos sistemas:

Sistema vertical: Las células o elementos que lo componen presentan el eje mayor orientado longitudinalmente con respecto al eje del órgano, es decir en forma paralela. Los componentes celulares del sistema vertical son los elementos traqueales de conducción (traqueidas y miembros de vasos), fibras y parénquima xilemático.

Sistema horizontal: Las células se encuentran orientadas radialmente con respecto al eje, es decir en forma perpendicular. Está constituido por los radios xilemáticos, en cuya composición intervienen principalmente células parenquimáticas. El parénquima radial consta de dos tipos celulares, diferenciados según su forma: las células procumbentes son alargadas en sentido horizontal y las células erectas son alargadas en sentido vertical. En el leño de “Gimnospermas” los radios también pueden estar formados por traqueidas horizontales; éstas se asemejan a las células parenquimáticas, pero carecen de citoplasma y poseen puntuaciones rebordeadas. En base a la posición de las células que los constituyen, los radios pueden ser homogéneos cuando poseen un solo tipo de células, generalmente células procumbentes; o heterogéneos si están formados por más de un tipo de células, procumbentes y erectas. Además, de acuerdo al número de células que determinan su ancho, los radios pueden ser uniseriados, biseriados, triseriados o multiseriados, si tienen 1, 2, 3 ó más hileras de células, respectivamente.



Leño. 1) *Austroflourensia thurifera* (Molina) J.C. Ospina & S.E. Freire. 2) *Baccharis aliena* (Spreng.) Joch. Müll. A: Corte transversal mostrando anillos de crecimiento. B: Detalle de poros. C: Corte longitudinal tangencial. D: Corte longitudinal radial. Escala: B: 50 μ m; A, C, D: 100 μ m.

Las tres dimensiones de los radios xilemáticos (ancho, largo y alto) se observan en los distintos planos de cortes esquemáticos:

En corte transversal: largo y ancho.

En corte longitudinal tangencial: ancho y alto.

En corte longitudinal radial: largo y alto.

Anillos de crecimiento

La actividad del cámbium es periódica y está en íntima relación con la fase vegetativa de la planta. El xilema secundario producido por el cámbium durante un período de actividad constituye un anillo de crecimiento. Se observan diferencias estructurales entre el xilema producido al principio y al final de la temporada, lo cual permite distinguir en cada anillo un leño temprano o de primavera y un leño tardío o de verano. En el primero, los elementos conductores son de mayor diámetro y más abundantes, mientras que en el segundo, disminuye el número y diámetro de los mismos y aumenta la cantidad de parénquima y de fibras.

En condiciones ambientales óptimas, cada anillo de crecimiento corresponde a un año de vida de la planta, pero esta regularidad puede verse afectada por diversas causas (traumatismos, enfermedades, factores climáticos, etc), formándose anillos de crecimiento falsos.

LEÑO DE CONÍFERAS

Los elementos traqueales del sistema vertical son traqueidas con puntuaciones areoladas con toro. Las fibras son fibrotraqueidas; no hay fibras libriformes. El parénquima vertical es escaso o puede faltar.

Los radios son uniseriados y algunos géneros de Coníferas presentan traqueidas horizontales. Tanto en el sistema horizontal como vertical pueden encontrarse canales resiníferos.

Las traqueidas son altamente resistentes a la embolia o cavitación (entrada de aire), ya que las paredes son gruesas, el diámetro es reducido y no presentan perforaciones. Por estas características se consideran más eficientes en la conducción que los vasos.

LEÑO DE ANGIOSPERMAS

Los elementos traqueales son vasos y traqueidas con puntuaciones areoladas sin toro. Las fibras pueden ser libriforme o fibrotraqueidas. El parénquima vertical en general es abundante.

En el leño de las Angiospermas existen una serie de caracteres de importancia taxonómica, entre los más importantes se pueden nombrar:

Porosidad: Se llama poro al corte transversal de un vaso y porosidad a la manera en que los poros se distribuyen en el leño. La porosidad es uniforme o difusa, si los vasos tienen el mismo diámetro y están dispuestos uniformemente en el anillo de crecimiento. Por el

contrario, la porosidad es circular si en cada anillo de crecimiento los vasos se disponen en círculos concéntricos y tienen diferentes diámetros. El diámetro de los poros disminuye en el leño tardío.

Tipo de Poros: Los poros son solitarios si se encuentran solos; o múltiples si se ordenan en grupos de más de dos.

Distribución del parénquima vertical: El parénquima puede ser apotraqueal si no está en contacto con los poros o paratraqueal si está en contacto.

Tipos de radios: Homogéneos o heterogéneos, uniseriados o multiseriados. Existen radios que en su parte media son multiseriados y en los extremos uniseriados.

Características adaptativas

De acuerdo al hábitat donde los vegetales se desarrollen, serán diferentes las estrategias para optimizar y asegurar la conducción del agua. Por ello, se puede observar una relación entre la estructura que posee el leño, la eficiencia y seguridad en la conducción y las condiciones ambientales.

Para conocer esta relación se tienen en cuenta principalmente las características y distribución de los elementos vasculares. Así, las especies arbóreas que habitan en zonas tropicales húmedas tienen su sistema xilemático preparado para conducir grandes volúmenes de agua; por ello presentan en general poros de diámetro mediano a grande, pocos numerosos y solitarios. Por el contrario, las especies que viven en ambientes áridos y semiáridos deben estar preparadas para conducir una escasa cantidad de agua distribuida en un período anual determinado; para asegurar la conducción y disminuir el riesgo de embolia (entrada de aire) típicamente presentan poros pequeños, muy numerosos y agrupados.

Para determinar la eficiencia y seguridad en la conducción de agua se emplean los siguientes índices (Carlquist, 1977):

Índice de Vulnerabilidad IV= Diámetro de los vasos/ número de vasos por mm²

El Índice de Vulnerabilidad indica la seguridad en la conducción de agua, valores menores a 1 muestran baja vulnerabilidad y alta eficiencia.

Índices de Vulnerabilidad inferiores a 1 se presentan en xerófito.

Índice de Mesomorfía IM = IV x Long. de vasos

El índice de mesomorfía indica el tipo de ambiente al cual estaría mejor adaptada una especie. Valores menores a 200 se presentan en especies xeromórficas; mientras que, valores mayores a 200 se presentan en especies méxicas.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL LEÑO

La madera es un elemento fundamental en la vida del hombre ya que es utilizada para la construcción de viviendas, muebles y máquinas, entre otros. Una de sus características más preciada es la resistencia a diversas clases de fuerza, la cual depende directamente del tipo de células o elementos que posee el leño. Las fibras dan mayor resistencia a la madera, mientras que los vasos y el parénquima, la debilitan. En "Gimnospermas" predominan traqueidas y

fibrotraqueidas por lo que la madera es homogénea y blanda, y se utiliza en la fabricación del papel. En Angiospermas, la dureza de la madera es mayor cuanto más proporción de fibras libriformes contenga; en cambio, disminuye al aumentar la cantidad de parénquima y vasos.

El estudio del leño es importante en Ecología ya que permite inferir las condiciones ambientales donde se desarrolla la planta. En ambientes mesófilos se observa menor cantidad de poros, de mayor diámetro y solitarios, mientras que lo contrario se encuentra en xerófitos.

Por su parte, en Arqueología, los leños fosilizados nos permiten conocer el clima y las especies que habitaban en un lugar y tiempo determinado. Además, podemos conocer las especies de árboles que utilizaban civilizaciones antiguas.

La Dendrocronología y Dendroclimatología estudian los anillos de crecimiento, con los cuales es posible determinar la edad de los árboles, nos permite inferir los cambios climáticos de la zona y el momento en que el árbol se desarrolló. Es de interés en Patología forestal, para Registros de catástrofes: incendios, sequías, heladas, etc.

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DEL LEÑO

Realización de cortes

En una madera estacionada, es decir, secada previamente al aire, se corta una sección transversal ó rodaja de 1,5 cm de alto. Se pule con lijas de grano grueso a fino, hasta emplear finalmente lija al agua.

Bajo lupa se marca una línea, que coincida con un radio leñoso y este será uno de los lados de un cubo que mide 1,5 cm. Con una sierra para madera se obtiene el cubo y se identifican las caras transversal, longitudinal tangencial y radial.

Obtenido el cubo se lo hierve en agua con unas gotas de detergente para ablandar la madera, el tiempo dependerá de la dureza de la misma. El cubo permanecerá en el fondo del recipiente si ha perdido todo el aire contenido, lo que indica que ha finalizado el ablandamiento.

Para realizar los cortes se utiliza un Micrótopo de deslizamiento o xilótomo, allí se ubica y fija la muestra, colocando correctamente la cara a cortar en la prensa destinada a tal fin y ajustándolo adecuadamente. Se coloca la cuchilla afilada, cuidando que no toque a la muestra. Se gradúa el selector de micras de acuerdo al material para definir el espesor del corte. Los cortes de madera suelen tener entre 20-60 micras.

En cápsulas rotuladas se colocan en forma separada los tres tipos de cortes en alcohol 50%.

Coloración

Después del alcohol 50%, se colorea con solución de safranina en alcohol 70%, se pasa por una serie de alcoholes 80%, 90% y 100% (absoluto) que deshidratan el material. Esta es una técnica directa y permite la coloración de las paredes lignificadas. El tiempo en safranina dependerá del tipo de material variando entre unos minutos a unas horas. Puede usarse además Azul Astral para colorear las células parenquimáticas, en este caso se debe colocar primero dicho colorante y después la safranina.

Luego del alcohol absoluto, se realizan dos pasajes por xilol y se realiza el montaje del material.

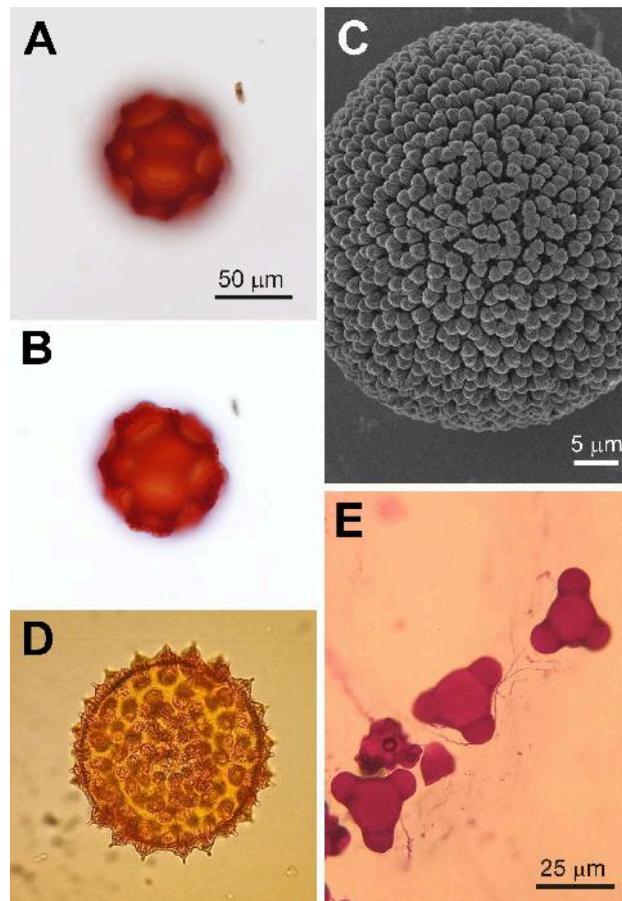
Montaje

Se coloca una gota de bálsamo de Canadá sobre un portaobjetos seco y desengrasado (limpiar con alcohol 50 %). Se acomodan los tres tipos de corte y se cubre con un cubreobjetos de tamaño adecuado. Se observa con microscopio óptico.

CAPÍTULO 9: TÉCNICAS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DEL POLEN

Características estructurales del polen

Las micrósporas son las esporas encargadas de producir el gametófito masculino. En plantas superiores reciben el nombre de granos de polen. Las células madres de los granos de polen son diploides y por meiosis originan cuatro células haploides; éstas son cuatro micrósporas jóvenes que en conjunto forman una tétrade. El grano de polen contiene los gametos masculinos o células progenitoras y básicamente está formado por una célula vegetativa cuyo citoplasma engloba a las células espermáticas (o a su progenitora, la célula generativa), rodeada por una compleja pared externa.



Granos de polen. A - B. *Opuntia* sp., grano de polen poligonal, pantocolpado y lofado, acetolizado y teñido con safranina. C. *Jatropha excisa* Griseb., grano esferoidal, inaperturado, reticulado-gemado, al natural. D. *Ipomoea purpurea*, grano esferoidal, pantoporado, equinado, acetolizado y sin teñir. E. *Oenothera biennis* L., polen triangular, oblado y porado, al natural y teñido con safranina. A, B, D y E vistos con microscopio óptico de campo claro. C visto con MEB. A, B y D en la misma escala

Unidades polínicas

Por unidad polínica se entiende, el modo en que el polen se encuentra agrupado dentro de los lóculos de la antera madura, forma en la cual luego se dispersa.

En la mayoría de las especies, se presenta en granos aislados o mónades; sin embargo, en unas 55 familias de Angiospermas, el polen puede hallarse agrupado, formando unidades polínicas mayores como son: díades, tétrades, políades, másulas o polinios.

Aparte de las mónades, las tétrades constituyen la unidad polínica más frecuente pudiendo hallarse las 4 esporas, que derivan de la misma célula madre, distribuidas en un solo plano, constituyendo tétrades isolateral, romboidal, lineal o en forma de T; o también, disponerse en dos planos, para formar tétrades tetraédricas o decusadas.

Las políades resultan del agrupamiento de un número definido de granos de polen, múltiplo de 4, pudiendo las tétrades, individualizarse o no. Las másulas se forman por reunión de un número alto y no definido de granos de polen. Por lo menos, dos políades o másulas deben formarse en cada lóculo. Los polinios reúnen todos los granos de polen de uno o más lóculos de las anteras y junto con las másulas representan las unidades polínicas más evolucionadas. La presencia de tétrades, políades y polinios está significativamente correlacionada con un número alto de óvulos por ovario.

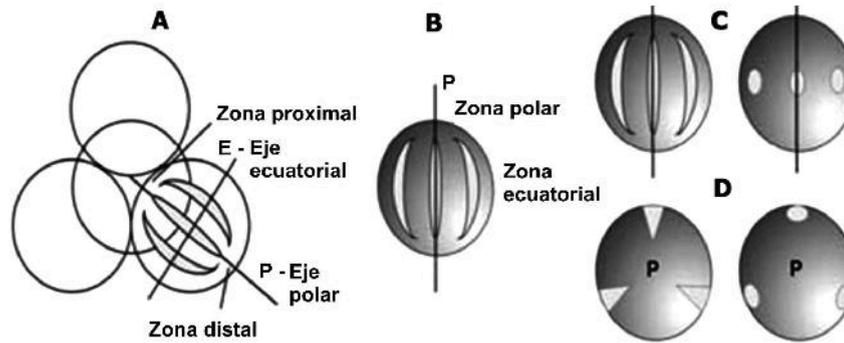
Los polinios pueden poseer un aparato traductor (ej.: *Asclepiadoideas*) originado por secreciones del estigma y organizado por retináculo y caudícula. Tiene por función contribuir a la polinización mediante una sustancia adhesiva que lo pega al cuerpo de determinados insectos.

La diversidad en cuanto a forma y estructura sugiere, que los diferentes tipos polínicos han surgido a partir de un extraordinario proceso de adaptación a diferentes factores que incluyen el medio ambiente, las interacciones polen-polen y polen-estigma intra e interespecíficas y el medio de dispersión, ya sea por el viento, agua o la acción de animales.

Polaridad

Debido a que los granos de polen son producidos por meiosis de células madres, todos forman en algún momento, parte de una tétrade. El eje polar de un grano de polen es la línea imaginaria que pasa por su centro y el de la tétrade. La intersección de esa línea con la superficie del grano, determina sus dos polos. El polo proximal es el que mira hacia el centro de la tétrade y el polo distal es el que mira hacia afuera. El plano ecuatorial pasa perpendicularmente, por la mitad del eje polar.

Un grano de polen puede ser apolar (o sea, sin polaridad); son granos esféricos y sin aperturas, o puede tener polaridad; en este último caso, es isopolar si los dos polos son iguales, o heteropolar si un polo es distinto del otro, ya sea por la forma del grano, por la presencia de una apertura o por la diferente ornamentación de la exina.



Polaridad. **A:** Tétrade, se ha señalado el eje ecuatorial y el eje polar; **B y C:** Granos de polen en vista ecuatorial; **D:** Granos de polen en vista polar.

Estratificación de la esporodermis

Los granos de polen se parecen a la mayoría de las células vegetales en que el citoplasma está rodeado por una pared. En el polen esta pared consta de dos capas fundamentalmente diferentes, una interna que está en contacto con el protoplasma celular, llamada "intina", y otra externa rodeando a todo el conjunto, llamada "exina".

Intina. De posición interna más o menos uniforme, principalmente celulósica, se destruye durante la acetólisis, técnica que se utiliza en estudios palinológicos y consiste en tratar los granos con una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado.

Exina. Más externa y generalmente mucho más compleja, está compuesta de esporopolenina que es resistente a la acetólisis. Por esta particularidad constituye el único estrato utilizable en los estudios palinológicos que se relacionan con la taxonomía. La esporopolenina está constituida por polímeros y/o ésteres de carotenoides y posiblemente, sea el compuesto orgánico de mayor resistencia que se conoce. A ella se debe que los granos de polen se vean preservados de la descomposición y se los encuentre en estado fósil, constituyendo un importante elemento de estudio en Paleobotánica.

La exina, por lo general, no es una capa uniforme. En granos acetolizados de Angiospermas consta típicamente de 2 estratos: uno interno, liso o *endexina* y otro externo, ornamentado o *ectexina*. La mayoría de las Angiospermas tienen polen tectado ya que la ectexina consta de un estrato basal, desde el que se elevan pilares cilíndricos llamados báculas o columelas, que sostienen un techo o tectum. Este último puede presentar perforaciones y ornamentaciones variadas, como espinas, gránulos o verrugas. En algunas Angiospermas, el techo falta, los granos son intectados y las báculas quedan expuestas al exterior.

En "Gimnospermas", la exina es alveolada, de aspecto esponjoso, y en helechos, la exina de las esporas es amorfa, carente de diferenciación interna (atectada). Polen atectado se halla también en "Gimnospermas" y Angiospermas basales, por lo cual se piensa que los tipos alveolado y baculado evolucionaron independientemente a partir del atectado, produciendo, en una etapa intermedia, el tipo granular.

Superficialmente puede hallarse el cemento polínico, sustancia viscosa y en parte lipídica secretada por el tapete, que favorece la adhesión de los granos entre sí y al agente polinizador en especies zoófilas.

Principales funciones de la esporodermis

- 1) Proteger de la desecación al gametófito que recubre.
- 2) Permitir, a través de las aperturas, los cambios de volumen del polen o esporos para acomodarse a las variaciones de la humedad ambiente (harmomegata).
- 3) En Angiospermas, es el lugar de almacenaje de proteínas involucradas en los sistemas de cruzamiento basados en la autoincompatibilidad genética. Las "Gimnospermas", carecen de sistemas de incompatibilidad genética y no tienen perforaciones en la esporodermis.
- 4) Las ornamentaciones elaboradas de la superficie están correlacionadas con la entomofilia, mientras que los granos lisos son característicos de plantas anemófilas. Por esta razón, el polen de "Gimnospermas" no es muy ornamentado.
- 5) El cemento polínico y las esculturas permiten la formación de "políades funcionales", asegurando la fertilización simultánea de numerosos óvulos de un mismo ovario.

CARACTERES MORFOLÓGICOS MÁS IMPORTANTES EN LOS ESTUDIOS DE POLEN

El polen maduro presenta una morfología bien definida que por lo general permite la identificación de la planta de la cual procede. Sus caracteres son de gran importancia en cualquiera de las aplicaciones que tiene el estudio del grano de polen, entre ellos, generalmente, se definen los siguientes: pared, aperturas, simetría y polaridad, agregados polínicos, forma y tamaño.

1- FORMA.

OBLADO: $P/E = 0,75-0,50$ (Relación menor que 1). ESFEROIDAL: $P/E = 1$. PROLADO: $P/E = 2-1,33$ (Relación mayor que 1). P= Eje polar, E= Diámetro ecuatorial

2- TAMAÑO.

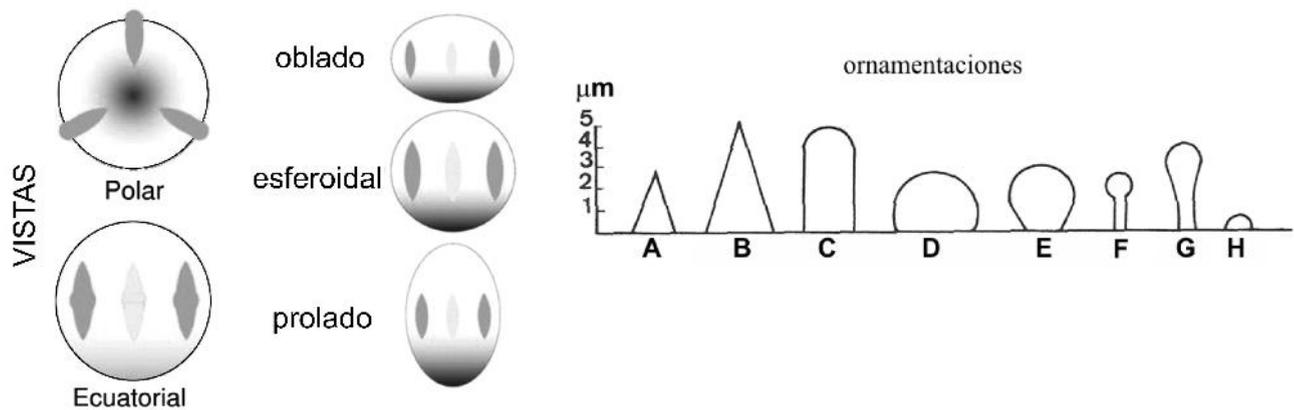
MUY PEQUEÑOS: $\leq 10 \mu\text{m}$. PEQUEÑOS: 10 a 25 μm . MEDIANO: 25 a 50 μm . GRANDE: 50 A 100 μm . MUY GRANDE: 100 A 200 μm . GIGANTE: $\geq 200 \mu\text{m}$

3- ORNAMENTACIONES.

ESPÍNULAS: (Hasta 3 μm). ESPINAS: (Hasta 5 μm). BÁCULAS. VERRUGAS. GEMAS. PILOS. CLAVAS. GRÁNULOS

4- APERTURAS.

Ubicación: POLO PROXIMAL. POLO DISTAL. ECUADOR. GLOBAL.
Forma: POROS. COLPOS. COLPORADOS



IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL POLEN: PALINOLOGÍA

La Palinología, o estudio de los granos de polen y esporas, es una ciencia relativamente joven que, en los últimos años, ha experimentado un desarrollo considerable en todo el mundo. En ninguna otra parte de una planta se encuentran reunidos, en tan poco espacio, la cantidad de caracteres de valor filogenético, como en un grano de polen. El polen y las esporas, debido a la capacidad de preservación de sus paredes, tienen quizás la más amplia distribución en tiempo y espacio que cualquier otro órgano del reino vegetal. La diversidad morfológica y la relativa constancia de sus caracteres dentro de los distintos taxones, hacen del polen y las esporas elementos de valiosa utilización en taxonomía y filogenia vegetal.

El conocimiento de los granos de polen es imprescindible para encarar diversos tipos de estudios, como los que se describen a continuación..

Farmacopalinología: Es la utilización del polen en la producción de medicamentos. Su composición química le otorga gran variedad de propiedades terapéuticas. Además, en el caso de productos vegetales con principios activos, como el azafrán, el té, se utiliza el análisis del polen con la finalidad de testear la calidad y evitar adulteraciones.

Melitopalinología: Se ocupa del estudio del polen contenido en la miel, y del transportado por las abejas, para determinar el origen en términos de localidad y fuente floral. Es bien conocido que el polen presente en las mieles responde a varios factores (climáticos, topográficos, etc.). Entre éstos, la composición florística del área donde se ubican los apiarios adquiere un papel preponderante. El análisis del contenido de polen es importante para el control de calidad de los productos apícolas en relación con el origen geográfico o botánico.

Copropalinología: Analiza excrementos fósiles o coprolitos. Importante en Arqueología. Puede revelar importantes aspectos relacionados a los hábitos alimentarios de los herbívoros, cuando estos restos fósiles contienen polen o esporas.

Paleopalinología: Se basa en la capacidad de polen y esporas (también denominados

palinomorfos) de convertirse en fósiles. Los palinomorfos pueden ser transportados por el viento, o a través de otros vectores como los animales, y depositados sobre diferentes materiales. Estos palinomorfos, sedimentados a lo largo del tiempo, experimentan procesos de fosilización de su exina de manera que se puede extraer, datar e identificar el polen de un determinado material y deducir cómo era la vegetación en el pasado, lo cual es importante en Paleobotánica y Paleoecología.

Aeropalinología: Analiza granos de polen que se dispersan en la atmósfera. Tiene importancia en medicina debido a los procesos alérgicos que provoca el polen. A la par, la abundancia del polen en el ambiente y su persistencia han dado como resultado su uso en medicina forense.

Taxonomía: las características de forma, tamaño, estructura y ornamentación de la exina, número, tipo y posición de las aberturas, son caracteres constantes y de importancia en la clasificación de las especies. Además, las características del polen se pueden utilizar en filogenias de distintos grupos taxonómicos.

TÉCNICAS PALINOLÓGICAS

Adquisición de material polínico

Es siempre más conveniente tomar las muestras de los pimpollos que de las flores abiertas, inmediatamente antes de la apertura de las anteras para garantizar la madurez de los granos de polen. Las horas más apropiadas son las primeras de la mañana o las últimas de la tarde cuando las anteras están cerradas.

Las muestras procedentes tanto de material fresco como herborizado pueden ser colocadas en ácido acético glacial hasta el momento de ser procesadas.

La apertura de la antera puede realizarse sobre un portaobjeto al cual se le colocan unas gotas de HOK al 5%, esto facilita el desprendimiento del polen. Se lava el portaobjeto con HOK y se vuelca en un tubo de centrifuga. Se coloca el tubo a baño María, revolviendo continua y suavemente durante dos minutos hasta su ebullición. Se equilibra con agua destilada y se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm. Este proceso se repite dos veces, posteriormente se agrega ácido acético glacial se centrifuga y decanta.

Almacenamiento del material polínico

Si el material no va a ser procesado inmediatamente puede ser almacenado en Glicerina. Después de algunos días, semanas o meses, la glicerina es decantada (si es necesario por centrifugación) y repuesta por unas pocas gotas de gelatina glicerinada. Esta es solo una de las formas de almacenar el polen.

Acetólisis

Provoca la destrucción del contenido de los granos de polen, permitiendo el estudio de las características presentadas por la exina.

Método de ERDTMAN (Erdtman, 1969).

Material: anteras frescas o fijadas.

Fijador: ácido acético glacial.

Colorante: safranina.

Procedimiento

1) Colocar las anteras en tubos de centrifuga, conteniendo cada uno 2ml de ácido acético glacial. Dejar reposar al menos 15 minutos bajo campana de extracción. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.

2) Escurrir el acético y sobre el sedimento obtenido, agregar 2 ml de mezcla acetolítica por tubo, gota a gota, apoyando la punta de la pipeta en la pared del tubo, para que baje como un hilo por la pared del vidrio hasta el fondo del tubo. La mezcla debe prepararse en el momento de usar agregando, gota a gota, 1 cc de ácido sulfúrico sobre 9 cc de anhídrido acético. Centrifugar.

3) Colocar una varilla de vidrio en el interior del tubo y calentar a baño María, de ser posible bajo campana para gases, hasta una temperatura de 70° a 80°C. Cuando el agua comienza a hervir, se detiene inmediatamente el calentamiento y se trata de deshacer las anteras, revolviendo con una varilla de vidrio (Este paso se puede obviar).

4) Incubar la reacción durante 5 minutos, con agitación ocasional bajo campana. Retirar del baño térmico y centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm. Descartar la mezcla acetolítica en un envase de vidrio oscuro.

5) Escurrir la mezcla acetolítica. Colocar 5 ml de agua destilada, centrifugar 5 min. a 3000 rpm.

6) Escurrir el agua. Si se desea colorear, agregar safranina al 1% y dejar 30 minutos. Centrifugar.

7) Escurrir el colorante y colocar los tubos boca abajo, sobre un papel de filtro.

8) Montar en gelatina de Kisser y bordear con parafina. El material sobrante puede guardarse en una mezcla de glicerina y agua, en partes iguales.

Germinación de polen

Procedimiento

1) Colocar una gota de agua destilada azucarada sobre un portaobjetos bien limpio.

2) Sembrar sobre ella los granos de polen.

3) Colocar en un recipiente con tapa, forrado con papel de filtro humedecido.

El polen de distintas especies requiere para germinar, distintas concentraciones de azúcar, temperatura y humedad. Las condiciones óptimas deben determinarse en cada caso particular. Una concentración de azúcar del 10% y una temperatura de 20° a 30°C son generalmente adecuadas. Si la concentración de azúcar en el medio es muy baja, los tubos polínicos revientan poco después de comenzar la germinación. Si la concentración es demasiado alta, los tubos se retuercen y deforman. El ácido bórico al 0,01% estimula la germinación y formación del tubo polínico. La concentración de azúcar requerida por algunas gramíneas llega al 30% y en amapola al 3%.

Cantidad y Viabilidad del polen

Para estimar la cantidad total de granos de polen (viables y no viables) se utiliza la metodología del hematocitómetro señalada por Lloyd, 1965. Se recolectan 5 flores con anteras maduras, no dehiscentes, y se extraen las anteras. Bajo el microscopio estereoscópico y con ayuda de dos agujas de disección se abre una antera de cada flor, sobre una cápsula de Petri y luego se agrega 0,1 ml de azul de anilina en lactofenol al 1% para colorear los granos de polen viables. Se verifica que todos los granos de polen queden fuera de las anteras y éstas son retiradas del líquido. La mezcla se agita bien con una aguja y una gota de dicha mezcla se transfiere a cada una de las cámaras del hematocitómetro, usando una pipeta Pasteur. En cada medición se cuentan los granos de polen viables y no viables (no coloreado y/o malformados). El cálculo de la cantidad total de granos de polen (viables y no viables) por flor se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de granos de polen/flor} = \frac{\text{N}^\circ \text{ granos/cámara} \times \text{Vol. dilución} \times 10.000 \times \text{N}^\circ \text{ anteras}}{4}$$

Elaboración de preparados microscópicos de polen semipermanentes

Procedimiento

- 1) Colocar las anteras en ácido acético para su fijación.
- 2) Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos
- 3) Descartar el sobrenadante y montar el sedimento polínico en gelatina de Kisser o xilol.
- 4) Montar el polen sobre un portaobjeto con xilol o aceite de cedro, sustancias no deformantes, para observarlos en el microscopio óptico. Las ventajas de este método son que puede apreciarse el color y que al no ser la preparación microscópica fija, mediante una ligera presión sobre el cubreobjeto, los granos varíen de posición y se observen mejor sus características. El inconveniente de estas preparaciones es que no se pueden conservar, por eso, si se quiere volver a consultarlas, hay que sustituir el líquido de montaje por bálsamo de Canadá sintético.

El polen natural puede ser posteriormente teñido, para ello se utiliza una gran variedad de colorantes tales como violeta de genciana, verde de metilo, fucsina, safranina, etc.

Una fórmula para colorear la exina

Glicerina. 15 g

Alcohol. 30 ml

Agua destilada. 45 ml

Fucsina o verde de metilo a saturación.

Estas tinciones se realizan aplicando una gota de colorante directamente sobre el polen depositado sobre un porta, se coloca el cubre y luego de unos minutos se lleva al microscopio.

Montaje del material polínico

El montaje de polen puede realizarse sobre distintos medios, el más utilizado es la gelatina de Kisser (gelatina glicerinada, coloreada).

Materiales: glicerina, gelatina sin sabor, agua destilada, cristales de fenol, safranina, malla fina

Procedimiento

Se disuelven 7g de gelatina en 19 cc de agua destilada. Se agregan 33 g de glicerina y se diluyen en baño de calor; luego se agrega 1 g de fenol (cristales) y unas gotas de colorante (safranina). Para evitar que la preparación contenga impurezas y dificulte la observación, se puede filtrar a través de una malla muy fina

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE MIEL

En las mieles se realizan dos tipos de análisis polínico: cualitativo y cuantitativo. El primero está referido a la identificación de los taxones presentes en las mieles y a establecer la frecuencia de aparición de cada uno de ellos. Los análisis cuantitativos permiten conocer el contenido absoluto de granos de polen por unidad de peso de miel.

Análisis Cuantitativo

El número absoluto de granos de polen puede determinarse por diferentes métodos de recuento. En el **Método de inclusión de esporas foráneas** (Stockmarr, 1971), se agrega a la miel una cantidad conocida de esporas de *Lycopodium*. Estas esporas son claramente distinguibles y se comercializan en cápsulas con contenido fijo. El cálculo del número de granos de polen presentes en el volumen inicial de miel se obtiene a partir de la siguiente fórmula.

$$P_m = P_r \times L_y i / L_y r$$

En donde **P_m** es el número de granos de polen en la cantidad inicial de miel; **P_r**: número de granos de polen contados en el preparado; **L_{y r}**: número de esporas de *Lycopodium* sp. contadas en el preparado y **L_{y i}**: número de esporas agregado inicialmente en las cápsulas incorporadas a la muestra.

Según la cantidad de granos de polen las mieles pueden clasificarse en distintas clases que van de I con un bajo contenido polínico (menos de 20000) a V (mas de 1000000) granos por cada 10 gramos de miel, según Maurizio (1975).

Procedimiento

Se utilizan 10 gramos de miel diluida en 30cc de agua destilada. Se calienta a baño maría, a temperatura menor a 45 grados y se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos.

1) Colocar en un tubo cónico de 50 ml pastillas con esporas de *Lycopodium* sp.

2) Disolver la pastilla (el número de Batch provisto por el fabricante indica la cantidad estimada de esporas de las pastillas de cada partida) en 5 ml de solución de ácido acético 50% o bien HCL 10%, agregue la solución lentamente mezclando con varilla de vidrio hasta la disgregación total de las píldoras. Si se genera espuma, vertir gotas de etanol sobre ella para

evitar que la solución desborde del tubo.

3) Centrifugar la muestra aproximadamente 5 min. a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante.

4) Montar el sedimento y recorrer el preparado en líneas paralelas y equidistantes al borde del cubreobjeto. Contar al menos 100 campos, se debe recontar entre 300 y 500 granos de polen.

Análisis cualitativo

El análisis cualitativo permite identificar los tipos polínicos presentes, su frecuencia relativa y determinar el tipo de miel. De ser posible la identificación debe realizarse a nivel específico o genérico, para ello se utilizan preparados de referencia de la palinoteca y claves palinológicas como la de Moore, Weeb & Collinson. (1991).

Los métodos han sido propuestos por la International Commision for Bee Botany (ICBB), Louveaux et al. (1978) y Von Der Ohe et al. (2004). Tienen en cuenta la relación entre la miel, los granos de polen contenidos en ella, la actividad de las abejas, la morfología de las flores visitadas por éstas y los métodos de producción de la apicultura.

La determinación del origen botánico está basada en las frecuencias relativas de los tipos de polen de las especies nectaríferas. Las frecuencias de aparición de cada tipo polínico permiten clasificar las mieles en monofloras o unifloras, cuando provienen de una fuente floral mayoritaria y la frecuencia relativa del polen de ese taxón excede 45%. Mientras que, se considera miel pluriflora, aquella en la que ningún tipo polínico está representado con porcentajes mayores al 44%.

Procedimiento

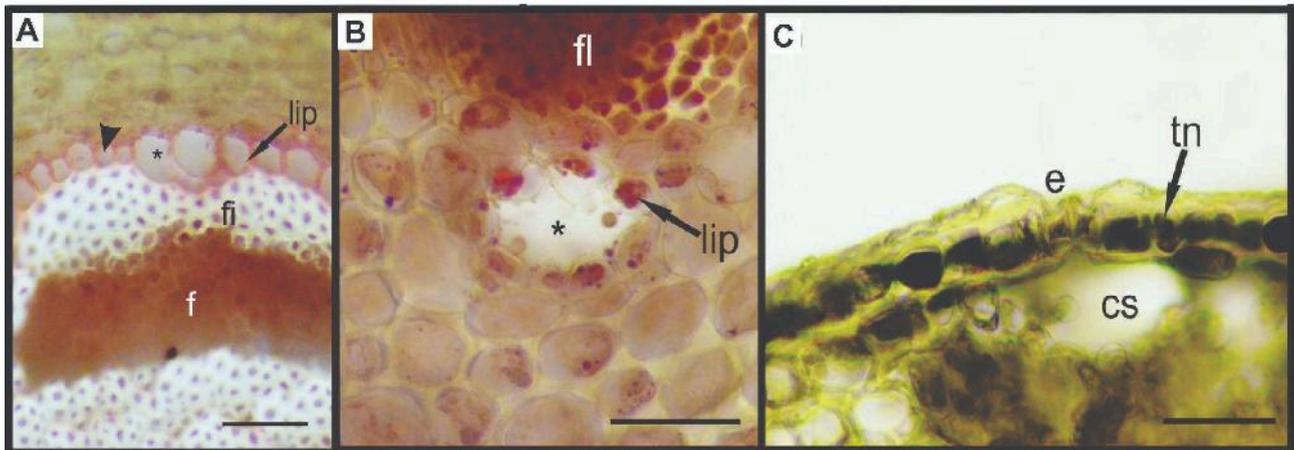
- 1) Diluir 10 gr de miel en 50 ml de agua destilada a baño María, no pasar de los 60º a 70º.
- 2) Centrifugar 5 a 10 minutos varias veces, volcando cada vez el sobrenadante.
- 3) Montar el sedimento en gelatina de Kisser.
- 4) Observar los granos de polen presentes en la miel.

CAPÍTULO 10: PRUEBAS HISTOQUÍMICAS

La histoquímica se refiere a la tinción específica de una sustancia o compuesto particular presente en un tejido vegetal. Por lo tanto, el objetivo es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica (ya sean metabolitos primarios o secundarios, formando parte estructural de la célula o como sustancias de reserva) y estudiar su distribución tisular "*in situ*". Durante el procesamiento previo del tejido, hay que evitar dañar la molécula que queremos detectar porque de otra manera resultaría en falsos negativos, esto es: no tener tinción cuando en realidad la molécula de interés sí estaba presente en el tejido, aunque luego del procesamiento se encuentra deteriorada.

Las pruebas histoquímicas se pueden realizar tanto con material fresco como de herbario y aún conservado. Sin embargo, los mejores resultados se obtienen en muestras de material fresco cortadas a mano alzada.

A continuación, se detallan técnicas específicas empleadas para la detección de las sustancias más comunes.



Pruebas histoquímicas. A: Tallo con crecimiento primario en corte transversal, endodermis con presencia de lípidos formando Banda de Caspary. *Ophryosporus axilliflorus* (Griseb.) Hieron.. B: Pecíolo en corte transversal, lípidos en conductos secretores. *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) R.M. King & H. Rob.. C: Hoja en corte transversal, tanino en epidermis foliar. *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.. Escala: A: 50 μm . B y C: 20 μm

ALMIDÓN

Fundamento

El reactivo de Lugol es una solución que contiene yoduro de potasio y yodo, en agua destilada. Cuando los almidones son tratados con solución yodo-yodurada se tiñen de color azul ó azul-violáceo (a veces muy oscuro, casi negro) por formación de un compuesto de oclusión del yodo con las moléculas de amilosa, que es el polisacárido lineal que interviene en la composición del almidón. Si no existiera la amilosa, la amilopectina, que es un polisacárido ramificado, se teñiría de color rojizo.

Reactivo

Solución de Lugol (se aconseja diluir la solución en agua destilada en 1:2 o 1:3).

Técnica

- 1) Colocar el corte en el portaobjeto.
- 2) Montar en agua, colocar el cubreobjetos y agregar una gota de Lugol junto al margen del cubreobjetos para que difunda por capilaridad. Dejar actuar de 5 a 10 minutos y luego lavar con agua destilada.
- 3) El almidón adquiere coloración azul-violácea intensa.

LÍPIDOS**Fundamento**

Las grasas (ceras, suberina, cutina) y aceites se colorean de rojo-anaranjado con el reactivo Sudán III o Sudán IV.

Reactivos

Solución saturada de Sudán III o Sudán IV en alcohol 70° u 80°.

Técnica

Se recomienda comenzar siempre filtrando el reactivo a utilizar.

- 1) Colocar cortes delgados del material sobre el portaobjeto.
- 2) Agregar una gota de reactivo y dejar actuar entre 10 y 20 minutos.
- 3) Lavar rápidamente con alcohol 70°. Las grasas y los aceites se tiñen de rojo-anaranjado.

LIGNINA**Fundamento**

La lignina se tiñe de color rojo al ser tratada con una solución de floroglucina en presencia de ácido clorhídrico (HCl).

Reactivos

Solución de floroglucina al 1% en alcohol 96°. Ácido clorhídrico al 25 %. Hipoclorito de sodio al 50%

Técnica

- 1) Se recomienda comenzar clarificando el material vegetal con una solución de hipoclorito de sodio al 50%.
- 2) Colocar el material sobre el portaobjetos y agregar una gota de la floroglucina en solución alcohólica. Dejar actuar unos minutos.
- 3) Colocar el cubreobjetos y flamear suavemente.
- 4) Retirar de la llama y colocar por el borde del cubreobjetos una gota de ácido clorhídrico al 25 %, al ponerse en contacto con las paredes con lignina se colorea de rojo violáceo.

MUCÍLAGOS**Fundamento**

Los mucílagos abarcan una gran cantidad de sustancias químicas distintas por lo que no

hay una prueba lo suficientemente satisfactoria para su detección. Sin embargo, se pueden reconocer fácilmente en cortes de materiales frescos por su carácter viscoso. Además, pueden tratarse con Azul de cresil dando una coloración azul Francia.

Reactivo

Azul de cresil al 1 %.

Técnica

- 1) Se hacen cortes de material fresco o desgarrado de la epidermis y se los coloca en un portaobjeto con unas gotas de agua para que se hidraten.
- 2) Absorber el agua con papel de filtro y agregar una gota de reactivo.

ALCALOIDES

Fundamento

Los alcaloides con el ácido precipitan dando sales cristalinas características, del picrato correspondiente al alcaloide.

Con el bismuto del reactivo de Dragendorff, los alcaloides forman compuestos insolubles que precipitan y adquieren una coloración castaña.

Reactivo

Ácido pícrico o reactivo de Dragendorff

Técnica

Para la técnica con ácido pícrico:

- 1) Colocar el material en una caja de Petri.
- 2) Agregar aproximadamente 3 gotas de ácido pícrico y dejar actuar.
- 3) Eliminar el ácido con papel de filtro y montar en agua.

Para la técnica con reactivo de Dragendorff:

- 1) Colocar el material en una caja de Petri.
- 2) Agregar reactivo de Dragendorff y dejar actuar entre 5 y 15 min.
- 3) Montar en agua y observar rápidamente porque la reacción es efímera.

RESINAS

Fundamento

Las resinas se colorean verde esmeralda.

Esta técnica puede demostrarse en cortes longitudinales de especies de Pináceas, Apiáceas, Araliáceas que, por lo general, contienen resinas.

Reactivos

Solución saturada de sulfato de cobre o acetato de cobre.

Técnica

- 1) Colocar los cortes de material fresco sobre un portaobjetos.
- 2) Agregar unas gotas de la solución saturada de sulfato de cobre (o acetato de cobre) y dejar actuar unos minutos.
- 3) Flamear la caja de Petri sobre la llama, montar en agua.

TANINOS

Fundamento

Una coloración azul oscuro indica la presencia de taninos.

Reactivos

Solución acuosa de sulfato férrico al 10 %.

Técnica

- 1) Colocar los cortes de material fresco sobre un portaobjetos.
- 2) Agregar unas gotas de solución acuosa de sulfato férrico al 10 % con una pequeña cantidad de carbonato de sodio.
- 3) Dejar actuar 2 a 3 minutos.
- 4) Lavar con agua destilada. Una coloración azul verdosa indica la presencia de taninos.

ALEURONA

Fundamento

El colorante Orange G hace que los cristaloides se tiñan de rojo-anaranjado, mientras que el globoide va desapareciendo poco a poco.

El xilol hace muy evidente el globoide, el cristaloides no se distingue.

Reactivos

Orange G o xilol

Técnica

- 1) Ubicar el material sobre el portaobjetos.
- 2) Para la técnica con Orange G: Agregar una gota de colorante Orange G.
Para la técnica con Xilol: Adicionar dos o tres gotas del reactivo.
- 3) Colocar el cubreobjetos.

OXALATO DE CALCIO

Fundamento

Los cristales de oxalato de calcio tienen muy baja solubilidad, son insolubles en ácido acético, pero solubles en ácido clorhídrico concentrado y ácido sulfúrico, dando este último por resultado cristales incoloros de sulfato de calcio. Es importante no fijar el material previamente ya que los cristales desaparecen.

Reactivos

Ácido clorhídrico.

Técnica

- 1) Colocar el material en el cual previamente se haya determinado la presencia de cristales en una caja de petri.
- 2) Adicionar ácido clorhídrico y dejar actuar.
- 3) Eliminar el ácido y montar en agua.
- 4) El oxalato de calcio es disuelto por el ácido.

COMPUESTOS PÉCTICOS

Fundamento

Las sustancias pécticas se tiñen de color rosado y las paredes de rojo intenso.

Reactivos

Rojo de rutenio.

Técnica

Colocar el material sobre el portaobjetos y agregar una gota de colorante.

SAPONINAS

Fundamento

Por la presencia de saponinas los cortes tomarán primero una coloración amarilla, a los 30 minutos rojo y finalmente violeta o azul verdoso.

Reactivo

Ácido sulfúrico.

Técnica

Colocar los cortes sobre un portaobjeto y agregar una gota de reactivo.

PROTEÍNAS

Fundamento

Es un colorante que tiñe de manera no específica a todas las proteínas con un fuerte color azul.

Reactivo

Azul brillante de Coomasie

Técnica

Colocar los cortes sobre un portaobjeto y agregar una gota de reactivo.

TEJIDO GLANDULAR

Fundamento

Los tejidos glandulares de las flores, como nectarios y osmóforos, se tiñen de color rojo intenso con la tinción vital de Rojo neutro.

Reactivos

Solución de 1:10000 de Rojo neutro: agua.

Técnica

- 1) Preparar la solución al momento de usarla.
- 2) Sumergir las flores, evitando dañarlas, en la solución de rojo neutro, por aproximadamente 1 hora.
- 3) Retirar el material y lavar con agua de red. Si se tiene certeza de la presencia de una glándula y la reacción no resulta positiva, se suele extender el tiempo de coloración de hasta 3 horas.

ANEXO: FIJADORES, REACTIVOS, COLORANTES, ADHESIVOS Y MEDIOS DE MONTAJE

FIJADORES

F.A.A.:

10 ml formol
50 ml alcohol etílico 95°
5 ml ácido acético glacial
35 ml agua
Se usa en materiales para estudios histológicos.

Mezcla alcohol ácido acético:

3 partes alcohol etílico 95° ó 100°
1 parte ácido acético glacial
Se usa en materiales para estudios citogenéticas

Carnoy:

60 ml alcohol etílico 95° ó 100°
10 ml ácido acético glacial
30 ml cloroformo
Se usa en materiales para estudios citogenéticos

REACTIVOS Y COLORANTES

Azul de Anilina

Mezclar 1 g de Azul de Anilina y 100 ml de alcohol 85° (etílico).

Azul Brillante de Cresilo al 0,05%

0,05 g de Azul de Cresil y 100 ml de agua destilada. Colorea celeste claro la cutícula de la epidermis; epidérmis de amarillo verdoso, núcleo y citoplasma, azul claro; el colénquima violeta intenso; parénquima y floema rosa violáceo; xilema celeste turquesa; fibras esclerenquimáticas azul intenso; estructuras secretoras verde esmeralda; no tiñe almidón y los lípidos de amarillo.

Azul de algodón

Disolver 1 g de azul de algodón en 100 ml de lactofenol. Colorea de azul las proteínas, el citoplasma y los mucílagos.

Azul Brillante de Comasi

0,1 g Azul B. de Comasi y 100 ml de solución 1:1:1: 0,2 v/v de etanol: agua: ácido acético

Azul de metileno

Solución **A**: 0,3 g azul de metileno 30,0 ml de alcohol metílico. Solución **B**: 0,01 g hidróxido de Potasio. Mezclar ambas soluciones. Colorea de azul las paredes lignificadas, la suberina y la cutina.

Azul de Alcian PH 2,5

Reactivos: Ácido acético 3%. Solución azul de alcian: 97 ml de agua destilada, 3 ml de ácido acético glacial, 1 g de azul de alcian. Se filtra y se agrega un cristal de timol. El Ph de la solución es de 2,5. Colorea de azul turquesa las mucosustancias sulfatadas.

Azul Astral

0,5 g de Azul astral, 100 ml de agua destilada y 2 g de Ac. Tartárico. Colorea de azul cobalto la celulosa.

Azul de Toluidina

Solución acuosa de azul de toluidina al 1%. Coloración meta-cromática, muy semejante a la observada con Violeta de Cresyl.

Carmín Alcohólico Clorhídrico

4 g de carmín, 15 ml de agua destilada, 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y 95 ml de alcohol etílico 85 %. Disolver calentando moderadamente en balón con condensador a reflujo a baño María el carmín con el agua destilada y el ácido clorhídrico durante 10 minutos. Enfriar, agregar el alcohol y filtrar.

Carmín, Orceína o Hematoxilina Acéticos

Disolver 1 g de Carmín ó 2 g orceína o hematoxilina en 100 ml de ácido acético 45 %. Revolver calentando, enfriar y filtrar.

Carmín acético

Disolver 1 g de carmín en 100 ml ácido acético 45%. Revolver calentando, enfriar y filtrar. Colorea de rojo la cromatina y el núcleo en general.

Cloruro férrico y carbonato de sodio

Agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10% con una pequeña cantidad de solución de carbonato de sodio al 2%. Se emplea para detectar taninos.

Eosina

Solución madre: 1 g de eosina y 100 ml de alcohol 70°. Disolver 25 ml de solución madre en 100 ml de agua destilada. Colorea de rojo las proteínas.

Floroglucina

Disolver 0,1 g de floroglucinol en 10 ml de alcohol 95°. Al usar añadir una gota de ácido clorhídrico 20% al material previamente montado con floroglucina. Colorea de rojo la lignina al reaccionar con ácido clorhídrico.

Hematoxilina activada

Se comercializa en solución estabilizada para uso biológico. Colorea paredes celulósicas.

Hidróxido de sodio

Se lo emplea en solución acuosa al 3%. Colorea las Saponinas.

Iodo ioduro de potasio

Disolver 1g de Ioduro de potasio en 100 ml de agua destilada. Añadir 0,3g de Iodo sublimado. Sacudir a intervalos hasta que el iodo se disuelva. Colorea de azul-violeta el almidón, de marrón, las proteínas y las paredes celulares cutinizadas o lignificadas y de amarillo, las paredes celulósicas. En combinación con ácido sulfúrico 75% colorea de azul, la celulosa que se hincha al mismo tiempo.

Reactivo de Schiff

2.5 g de Fucsina básica (marca MERCK), 5 g de metabisulfito de potasio, 1.5 g de carbón activado, 500 ml de agua destilada y 50 ml de ácido clorhídrico 1 N. Agregar a la fucsina 500 ml de agua hervida, agitar, enfriar hasta 50°C. Agitar durante 10 minutos, filtrar a una botella oscura. Agregar 50 ml de ácido clorhídrico 1 N, 5 g de metabisulfito de potasio, guardar 24 horas en oscuridad, agitando de vez en cuando. Agregar 1.5 g de carbón activado, agitar 5 minutos, filtrar a frasco blanco y limpio, hasta ver que quede transparente. Guardar en frasco oscuro en heladera. Esta coloración permite la determinación del glucógeno, de las mucinas, de los mucopolisacáridos neutros así como de los filamentos y esporas micelianas.

Rojo neutro

5 g de Rojo neutro y 100 ml de agua destilada. Aplicar la solución diluida al 0,1 % sobre tejidos vivos. Colorea entre la gama de rosa y rojo.

Rojo de Metilo

0,1 g rojo de Metilo y 100 ml de alcohol etílico 96°.

Rojo de rutenio

0,1 g de solución madre y 10 ml de agua destilada. Emplear esta solución madre para obtener una solución al 0,001 %. Colorea las sustancias pécticas.

Safranina

Disolver 2,25 g de safranina en 225 ml alcohol 95°. Al usar, diluir en partes iguales con alcohol etílico 50°. Colorea de rojo paredes celulares lignificadas, cutinizadas o suberificadas, como así también cromosomas y nucleolo.

Sudán III

0,5 g de Sudán III y 100 ml de alcohol etílico 70°. Colorea de rojo sustancias grasas, cutina y suberina.

Sudán IV

Disolver 0,09 g de Sudán IV en 100 ml de alcohol 95°. Colorea de rojo sustancias grasas, cutina y suberina.

Verde rápido

Llamado comúnmente "fast-green". Se usa en solución saturada de alcohol etílico absoluto. Colorea de verde el citoplasma y núcleo.

Verde de metilo

Disolver 1 g de verde metilo en 100 ml de alcohol etílico. Al usar, diluir al 0,1% en alcohol etílico 95°. Colorea de verde, el citoplasma y paredes celulósicas.

Violeta de Cresyl

Violeta de cresyl al 0,5% en solución acuosa. Coloración metacromática. Colorea de rosa los tejidos parenquimáticos y la epidermis. De azul, el xilema, fibras, núcleos y cromosomas; de rojo el citoplasma.

Violeta de Genciana

1 g de Violeta de Genciana y 100 ml de agua destilada.

ADHESIVOS

Como su nombre lo indica, se utilizan para adherir el material al portaobjetos.

Adhesivo de HAUPT

Disolver 1 g de gelatina en 100 ml de agua caliente a 90°C. Añadir 15 ml de glicerina a los 30°C y 2 g de fenol. Mezclar, filtrar y guardar en heladera o lugar fresco.

Albúmina de MAYER

En 50 ml de glicerina agregar 50 ml de albúmina de huevo y 2 g de fenol. Mezclar y filtrar con un trozo de tela de algodón o lino.

MEDIOS DE MONTAJE

Mantienen el cubreobjetos en su lugar, favoreciendo la observación. Para ser adecuado, debe tener un índice de refracción igual o muy parecido al del vidrio (1.518) y no afectar la coloración de los tejidos.

Bálsamo de Canadá

Es un medio de montaje sintético se expende preparado. Es el medio de montaje más tradicional para preparados permanentes. Sólo puede usarse con materiales previamente deshidratados.

Gelatina de KAISER

Disolver 50 g de gelatina en 175 ml de agua destilada (a baño María). Agregar 150 ml de Glicerina y 7 g de fenol.

Glicerina diluida

Mezclar 50 ml de glicerina y 50 ml de agua destilada. Se usa con más frecuencia que la glicerina pura, por ser más fácil de manejar y limpiar, en preparados temporarios.

Lactofenol

Mezclar 10 ml de ácido láctico, 200 ml de glicerina pura, 100 ml de agua destilada y añadir 100 g de cristales de fenol. Dejar que los cristales de fenol se disuelvan completamente, antes de usar. Es un medio de montaje temporario, con alto índice de refracción.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILERA, N. & L. M. GUEDES. 2021. Manual de técnicas anatómicas e histoquímicas para el análisis de muestras vegetales. Universidad de Concepción. Chile.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. 2006. Anatomía Vegetal. 2da Ed. Ed. Universidade Federal de Vicosa. Brasil.
- CLAYDEN, E. C. 1971. *Practical section cutting and staining*. 5a. Ed. Churchill Livingstone. London.
- CONN, H. J., M. A. DARROW & V. M. EMMEL. 1960. *Staining procedures*. Ed. Williams Wilkins Co. Baltimore.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de técnicas en Histología vegetal*. Ed. Hemisferio Sur.
- DIZEO DE STRITTMATTER, C. G. 1973. Nueva técnica de diafanización. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15 (1): 126-129.
- DIZEO DE STRITTMATTER, C. G. 1980. Coloración con "Violeta de Cresyl". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 19 (1-2): 273-276.
- DIZEO DE STRITTMATTER, C. G. 1986. Uso de técnicas de Fluorescencia en materiales Vegetales. *Parodiana* 4(2): 213-220.
- FUCHS, CH. 1963. *Stain technol.* 38(3): 141-144, fig. 1-6.
- GATTUSO, M. & GATTUSO, J. 1999. *Manual de Procedimientos para el análisis de Drogas en Polvo*. Ed. UNR. Rosario. Argentina
- JENSEN, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry. Principles and Practice*. 1-408, con figs. W. H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. 1º Ed. Mc Graw Hill Book Co. N.Y.
- KRAUS, J. E., DE SOUSA H. C., REZENDE M. H., CASTRO N. M., VECCHI C., LUQUE R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotech Histochem* 73(5): 235-243.
- MA, Y., V. K. SAWHNEY & T. A. STEVES. 1992. Staining of paraffin embedded plant material in safranin and fast-green without removal of the paraffin. *Can. J. Bot.* 71: 996-999.
- MAACZ, G. J. & E. VAGAS. 1961. A new method for staining of cellulose and lignified cell walls. *Microscopic* 16: 40-43.
- PEREZ, A. & V. H. TOMASI. 2002. Tinción con Azul Brillante de Cresilo en secciones vegetales con parafina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 37 (3-4): 211-215.
- ROBINSON *et. al.* 1987. *Methods of preparation for electron microscopy. An introduction for the biomedical sciences*. Springer-Verlag. Berlin.
- SAKAI, W. S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using Toluidine Blue O. *Stain Technol.* 48 (3) 247-249.
- ZARLAVSKY, G (ed.). *Histología Vegetal. Técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica. Buenos Aires.

Material didáctico de la Cátedra de Morfología Vegetal

- Cosa, M. T., N. Dottori, M. Hadid, L. Stiefkens, M. Matesevach, N. Delbón, P. Wiemer, S. Machado & V. Cabrera. 2015. Atlas de Anatomía Vegetal V: Exomorfología de las plantas con flores. Universidad Nacional de Córdoba. ISBN: 978-950-33-1215-5.

- Cosa, M. T., N. Dottori, N., M. Hadid, L. Stiefkens, M. Matesevach, G. Bruno, I. Liscovsky & N. Delbón. 2013. Atlas de Anatomía Vegetal. Tejidos y órganos vegetativos. *Arnaldoa* 20: 179-252. ISSN: 1815-8242.
- Cosa, M. T., N. Dottori, M. Hadid, L. Stiefkens, M. Matesevach, N. Delbón, P. Wiemer, S. Machado, S. Figueroa & V. Cabrera. 2013. Atlas de Anatomía Vegetal IV: Estructuras Secretoras. Universidad Nacional de Córdoba. ISBN: 978-950-33-1054-0.
- Cosa, M. T., N. Dottori, M. Hadid, L. Stiefkens, M. Matesevach, N. Delbón, P. Wiemer, S. Machado & S. Figueroa. 2012. Atlas de anatomía vegetal III. Adaptaciones de las plantas vasculares. Universidad Nacional de Córdoba. ISBN: 978-950-33-0962-9.
- Cosa, M. T., N. Dottori, G. Bruno, M. Hadid, L. Stiefkens, I. Liscovsky, M. Matesevach & N. Delbón. 2011. Atlas de anatomía vegetal. I: Tejidos y órganos vegetativos. Universidad Nacional de Córdoba. ISBN 978-950-33-0879-0.
- Dottori, N., M. T. Cosa, G. Bruno, M. Hadid, L. Stiefkens, N. Delbón y M. Matesevach. 2008. Atlas de Anatomía Vegetal II. Estructuras Reproductivas. Universidad Nacional de Córdoba. ISBN 978-9-503306-62-8.

Publicaciones científicas, fuente de las fotomicrografías de esta guía

- Delbón N., Aliscioni N.L., Lorenzati M., García S., Singer R. & Gurvich D.E. 2023. Looking for non-hermaphrodite cacti: Multidisciplinary studies in *Gymnocalycium bruchii* endemic to central Argentina. *Plant Reproduction*. DOI: 10.1007/s00497-023-00461-y
- Delbón N., Castello L., Ríos Villamil A., Cosa M.T. & Stiefkens L. 2021. Surviving in semi-arid environments: functional coordination and trade-offs in shrubs from Argentina. *IAWA Journal* 42 (2), 2021: 172–190. DOI: 10.1163/22941932-bja10026
- Delbón N., M. A. Cortez, L. Castello, A. Rios, M. J. Risso, N. Dottori & M. T. Cosa. 2010. Anatomía foliar y estrategias adaptativas en especies arbustivas de las Sierras Chicas de Córdoba, Argentina. *Arnaldoa* 17: 41-49.
- Delbón N., M. T. Cosa & G. Bernardello. 2017. Reproductive biology, seed germination and regeneration of *Flourensia* DC. species endemic to Central Argentina (Asteraceae). *Adansonia* 39: 71-85. DOI: 10.5252/a2017n1a6
- Delbón N., M. T. Cosa & G. Bernardello. 2012. Exomorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC. (Asteraceae) con importancia fotoquímica. *Acta Botánica Brasilica* 26: 2-10. DOI: 10.1590/S0102-33062012000100002.
- Fernández G., Stiefkens L., Las Peñas L., Pérez A. & Delbón N. 2020. Morfo-anatomía de perigonio, gineceo y fruto en *Trichocereus candicans* y *T. pseudocandicans* (Cactaceae): implicancias taxonómicas y reproductivas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 55: 557-572. DOI: 10.31055/1851.2372.v55.n4.29068
- Perotti, S.B., Aliscioni, N.L., Delbón, N., Perea, M., Hammann, A. & Gurvich, D.E. 2022. Biomass partitioning and morphoanatomical traits of six *Gymnocalycium* (Cactaceae) species that inhabit through a precipitation gradient. *Diversity* 14, 749. DOI: 10.3390/d14090749
- Saur Palmieri V., Delbón N., Trillo C. & López M.L. 2023. Pre-Hispanic use of edible *Geoffroea decorticans* fruits in central Argentina. First approximations based on an integrated morphoanatomical and archaeobotanical approach. *Vegetation History and Archaeobotany*. DOI: 10.1007/s00334-023-00965-7
- Tosoratto N., M. T. Cosa & N. Delbón. 2016. Morfoanatomía e histoquímica de cuatro Asteraceae nativas del Bosque Chaqueño Serrano (Córdoba, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 51:613-622. DOI: 10.31055/1851.2372.v51.n4.16337