

Técnicas de histología vegetal

Un abordaje para su utilización en microscopía óptica

Susana A. Suárez, M. Albana Di Palma,
Paula G. Cardozo y Claudia N. Travaglia

ISBN: 978-987-688-506-5

e-book

Colección
Académico-Científica



Técnicas de histología vegetal : un abordaje para su utilización en microscopía óptica / Susana A. Suárez ... [et al.]. - 1a ed. - Río Cuarto : UniRío Editora, 2022.
Libro digital, PDF - (Vinculación y educación)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-688-506-5

1. Histología. 2. Ciencias Naturales. 3. Microscopio. I. Suárez, Susana A.
CDD 571.2

2022 © by

UniRío editora

Universidad Nacional de Río Cuarto

Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina

Tel: 54 (358) 467 6309 .

editorial@rec.unrc.edu.ar

www.unirioeditora.com.ar

Primera Edición: *noviembre de 2022*

ISBN 978-987-688-506-5

Esta publicación cuenta con los avales de
Mg. Mariela Woelke (Nodocente de la UNRC)
y Dra. Carla Bruno (Docente de FAyV UNRC).



Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.

http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/ar/deed.es_AR



Uni. Tres primeras letras de "Universidad". Uso popular muy nuestro; la Uni. Universidad del latín "universitas" (personas dedicadas al ocio del saber), se contextualiza para nosotros en nuestro anclaje territorial y en la concepción de conocimientos y saberes construidos y compartidos socialmente.

El río. Celeste y Naranja. El agua y la arena de nuestro Río Cuarto en constante confluencia y devenir. La gota. El acento y el impacto visual: agua en un movimiento de vuelo libre de un "nosotros". Conocimiento que circula y calma la sed.

Consejo Editorial	
Facultad de Agronomía y Veterinaria Prof. Mercedes Ibañez y Prof. Alicia Carranza	Facultad de Ingeniería Prof. Marcelo Alcoba
Facultad de Ciencias Económicas Prof. Clara Sorondo	Biblioteca Central Juan Filloy Bibl. Claudia Rodríguez y Prof. Mónica Torreta
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Prof. Sandra Miskoski	Secretaría Académica Prof. Sergio González y Prof. José Di Marco
Facultad de Ciencias Humanas Prof. Graciana Perez Zavala	

Equipo Editorial	
Secretario Académico:	<i>Sergio González</i>
Director:	<i>José Di Marco</i>
Equipo:	<i>José Luis Ammann, Maximiliano Brito, Ana Carolina Savino, Lara Oviedo, Roberto Guardia, Marcela Rapetti y Daniel Ferniot</i>

Autoras

Di Palma María Albana

Lic. en Cs. Biológicas (UNRC), Dra. en Cs. Biológicas (UNRC).
Orientación Morfología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (INIAB) –UNRC y CONICET-.

Cardozo Paula Gabriela

Microbióloga (UNRC), Dra. en Cs. Biológicas (UNRC).
Orientación Morfología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (INIAB) –UNRC y CONICET-.

Suárez Susana Amalia

Lic. en Cs. Biológicas (UNRC), Mg. Sc. en Recursos Naturales (Fac. de Agronomía UBA), Dra. en Cs. Biológicas (UNRC).
Orientación Morfología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC. Instituto de Investigaciones en Sustentabilidad y Sistemas Productivos (ISSP) –UNRC-.

Travaglia Claudia Noemi

Microbióloga (UNRC), Dra. en Cs. Biológicas (UNRC).
Orientación Morfología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (INIAB) –UNRC y CONICET-.



Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)
Secretaría de Ciencia y Técnica
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales
Orientación Morfología Vegetal



Índice de contenidos

Introducción.....	8
Preparados frescos	10
Preparados semipermanentes	11
Preparados permanentes	12
Higiene y Seguridad	13
Consideraciones generales	13
Normas higiénicas	15
Ropa adecuada	16
Condiciones del área de trabajo	16
Manipulación de productos químicos	16
Elementos de seguridad y de evacuación	17
Proceso para Obtener Preparados Permanentes.....	19
Conservación	19
FAA	19
Craf III	19
Fijación	20
FAA	20
Craf III	20
Farmer o Carnoy I	20
Carnoy II	21
Glutaraldehído	21
Tetróxido de osmio	22
Permanganato de potasio	22
Deshidratación	22
Inclusión	23
Parafina y plásticos histológico	23
Moldes de inclusión	24
Cortado	25
Cortes a mano alzada o libre	26
Cortes con micrótomo	26
Pegado	29
Pegado con agua	30
Pegado con albúmina de Mayer	30
Coloración	30
Colorantes	31
Coloraciones generales	31
Coloraciones específicas	32
Coloraciones vitales	33
Impregnaciones metálicas	33
Montaje	33
Observación	34

Uso del microscopio óptico	37
Variaciones en las características del microscopio óptico	38
Técnicas Generales Paso a Paso	40
Técnicas de fijación	40
FAA	40
CRAF III	40
Glutaraldehído	41
Técnicas de deshidratación	42
Alcohol etílico	42
Acetona	43
Terbutanol -Etanol	43
Técnica de inclusión	43
Parafina o cera histológica	43
Técnicas de corte	45
Mano alzada o mano libre	45
Micrótopo de mano	46
Micrótopo de deslizamiento	46
Micrótopo de congelación	47
Micrótopo rotatorio o Minot	47
Técnicas de coloración	52
Materiales no incluidos	52
Otras coloraciones	58
Impregnaciones metálicas	65
Cortes realizados con ultramicrotopo	65
Técnicas de montaje	67
Glicerina – agua destilada	67
Gelatina - glicerina	67
Bálsamo de Canadá	68
Bálsamos sintéticos	68
Técnicas Específicas de Estudio del Material Vegetal	70
Epidermis foliar	70
Extracción o "Peeling"	70
Técnica de Jeffrey	71
Técnica de Metcalfe o “raspado”	71
Técnica de hidróxido de potasio	72
Técnicas de improntas	73
Técnica para epidermis y nervaduras	74
Cromosomas en mitosis	75
Técnica aplastamiento o squash de ápices radicales	75
Técnica combinada para ápices radicales	75
Cromosomas en meiosis	77
Técnica I de aplastado de anteras	77

Técnica II de aplastado de anteras	77
Polen	78
Técnica acetólisis de Erdtman	78
Germinación de polen	79
Técnica 1	79
Técnica 2	79
Fertilidad del polen	80
Análisis polínico y de mieles	80
Separación de células (maceración)	81
Técnica de Boodle	81
Técnica de Jeffrey	82
Técnica de Schultze	82
Transparentado de tejidos	82
Hojas y flores	83
Técnica para nervaduras	83
Técnica de Foster	83
Técnica de Fuchs	84
Técnica de Dizeo de Strittmater	84
Técnica de Bailey y Nast	85
Técnica de coloración	85
Técnica de autofluorescencia	85
Técnica con fluorocromos	86
Fragmentos vegetales	87
Ectomicorrizas	88
Endomicorrizas	88
Técnica 1	89
Técnica 2	89
Ablandamiento de maderas	90
Ablandamiento de frutos secos y semillas	91
Técnicas para Pruebas Histoquímicas	92
Reactivos y Formulaciones.....	95
Bibliografía.....	107
Anexos	108

Introducción

Los estudios anatómicos e histológicos de cormos (cuerpo del esporofito) y talos (cuerpo del gametofito) se relacionan con intereses académicos, científicos, productivos y tecnológicos, lo que deriva en interrelaciones en el ámbito social, económico e institucional (Figura 1).

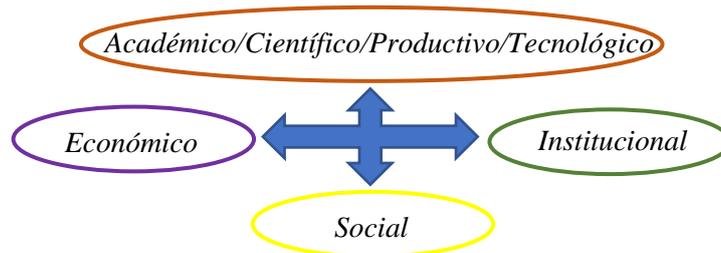


Figura 1. Interrelaciones de estudios anatómicos e histológicos de cormos y talos.

Y por ello, tienen tantas aplicaciones (Tabla 1), como servicios ecosistémicos brindan los organismos involucrados.

Tabla 1. Aplicaciones de estudios anatómicos e histológicos de cormos y talos.

✓ Taxonomía y sistemática.	✓ Actividad forense.
✓ Paleontología.	✓ Peritaje de calidad industrial.
✓ Antropología.	✓ Peritaje de inocuidad alimentaria.
✓ Palinología.	✓ Documento legal público y privado.
✓ Interacciones bióticas.	✓ Dietas de animales.
✓ Académicas.	✓ Silvicultura y calidad forestal.
✓ Dendrocronología.	✓ Arqueología.
✓ Fitopatología.	✓ Biotecnología.
✓ Detección de contaminantes y toxinas ambientales.	

El material se puede utilizar con observación directa o indirecta con mínima o sin manipulación (granos de polen), realizando extracción o peeling (epidermis), moldes o improntas (epidermis) o cortes a mano alzada (órganos). Los cortes se pueden ejecutar según tres planos: transversal, perpendicular a la longitud del órgano, y longitudinal, paralelo a la longitud del órgano, tangencial, pasa entre la superficie y centro del órgano, o radial, pasa por el centro del órgano (Figura 2). En estos casos se realizan preparados temporarios, frescos o semipermanentes (Tabla 2).

En otros casos, es necesario procesar el material usando mayor cantidad de técnicas que insumen más tiempo y equipamiento, que permiten la obtención de preparados permanentes (Tabla 2), para su observación con distintos tipos de microscopios. En este material en particular nos abocaremos a la presentación y explicación de técnicas para microscopía óptica.

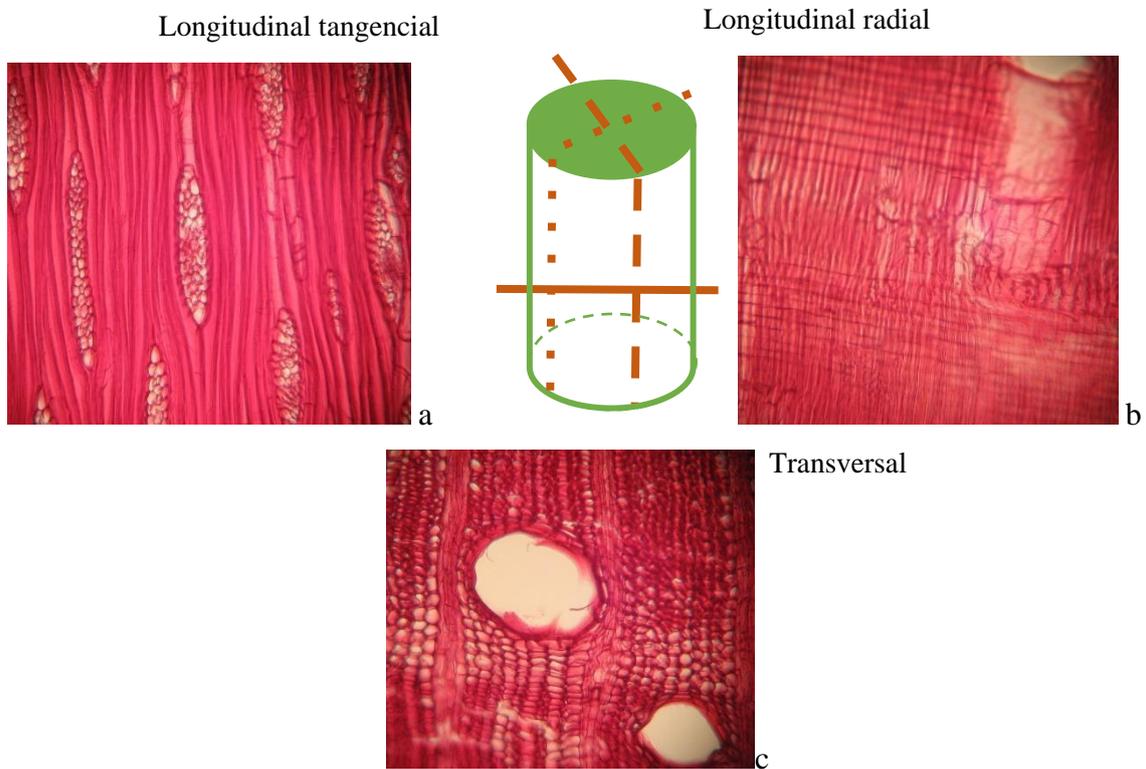


Figura 2. Esquema representativo de planos de corte y fotomicrografías de leño en corte longitudinal tangencial (a), radial (b) y transversal (c) de *Cedrela tubiflora* “cedro misionero”.

Cualquiera sea el tipo de preparado histológico a realizar el punto de partida es el muestreo del material. En relación con el objetivo del estudio, origen y características de la muestra, la preservación del material puede consistir en: mantenerla hidratada (colocar en un recipiente plástico con papel húmedo a temperatura de heladera o ambiente fresco), cortar trozos de 5 mm e incluir en un líquido conservador o herborizar (secar lentamente a baja temperatura, 30°C). Independientemente del objetivo se debe tener en cuenta la correcta identificación taxonómica del material, para ello es recomendable que la muestra este acompañada de un ejemplar que pueda ser incorporado a un herbario oficial. Además, se debe documentar las condiciones ambientales (bióticas y abióticas), fecha, lugar y recolector.

Tabla 2. Relación entre procesamiento del material y tipo de preparado a obtener.

Proceso	Preparado		
	Fresco	Semipermanente	Permanente
Muestreo	X	X	X
Conservación		X	X
Fijación			X
Deshidratación			X
Inclusión			X
Cortado	X	X	X
Pegado			X
Coloración		X	X
Montaje	X	X	X
Observación	X	X	X
Guardado		X	X

X: indica proceso necesario.

Preparados frescos

Es una técnica rápida y muy sencilla. Generalmente se utiliza material recién recolectado o fresco, el medio de montaje es agua o glicerina-agua y los preparados se descartan posterior a su visualización (Figura 3).



Figura 3. Preparado fresco de epidermis de *Taraxacum officinale* “diente de león” montado en agua.

El material se corta a mano alzada o con un micrótopo de mano, lo más fino posible. También puede utilizarse cuando se observan extracciones de epidermis o macerados. Para montar el material, colocar sobre el portaobjeto unas gotas de agua o glicerina y agua (50:50), posicionar el material a estudiar en el centro del portaobjeto sobre el medio de montaje y colocar el cubreobjeto deslizándolo en ángulo de 45°, cuidando de desplazar el medio líquido para que no quede aire entre portaobjeto-material-cubreobjeto. Si se observa una separación entre el cubreobjeto y el portaobjeto es indicación de que el corte del material es muy grueso, puede sacar el cubreobjeto, descartar el corte y volver a cubrirlo.

En estos preparados puede observar y fotografiar tejidos con compuestos que autofluorescen, el medio de montaje recomendado es agua.

Preparados semipermanentes

El procesamiento de la muestra puede llevar más tiempo que el caso de los preparados frescos, igualmente es una técnica rápida y sencilla. Como medio de montaje se utiliza glicerina-agua o gelatina-glicerina. Los bordes del cubreobjeto se sellan sobre el portaobjeto con esmalte o un adhesivo, para reducir la deshidratación y el ingreso de contaminantes. Este tipo de preparados duran varios meses o años, dependiendo del cuidado durante la manipulación de la muestra, montaje y sellado.

El material puede ser improntas de epidermis, extracciones epidérmicas que requieren mayor manipulación (ejemplo, Poaceae, Figura 4) o la preservación de alguna muestra que no siempre está disponible (ejemplo, polen).

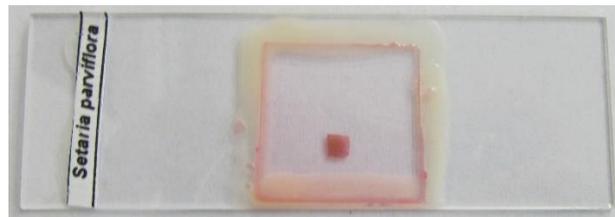


Figura 4. Preparado semipermanente de epidermis de *Setaria parviflora* “cola de zorro”, coloreada con safranina montado con gelatina - glicerina.

El procedimiento consiste en colocar sobre el portaobjeto unas gotas de gelatina-glicerina, se puede agregar una gota de colorante (ejemplo, safranina) que facilite la observación de los tejidos. Previamente se coloca a baño María el recipiente donde se encuentre el medio de montaje, cuando este está líquido se vierten unas gotas sobre el portaobjeto que contiene el material. Con la ayuda de una varilla de vidrio las gotas de medio de montaje se dejan caer en la zona próxima a donde se ubica el material, nunca sobre el mismo porque el calor lo puede dañar. Luego, el portaobjeto se pasa ligeramente por la llama para que la gelatina-glicerina se mantenga líquida y se evite la formación de burbujas. Por último, se coloca el cubreobjeto limpio y seco en ángulo de 45° y se deja caer suavemente. Si en los bordes del preparado quedan restos del medio de montaje, una vez

seco se puede retirar. Para prolongar la preservación del preparado se puede cubrir los bordes del cubreobjeto con esmalte o sellador.

Preparados permanentes

La realización de un preparado permanente es compleja, laboriosa y temporalmente más larga. Conlleva cumplir con una serie de pasos determinados por el objetivo del estudio, el material (órgano o estado de madurez) y el equipamiento utilizado tanto durante el procesamiento (tipo de micrótomos) como la observación (características del microscopio). Generalmente la secuencia se organiza como conservación, fijación, deshidratación, inclusión, cortado, pegado, coloración, montaje y observación. El resultado es un preparado que puede utilizarse por décadas (Figura 5). La explicación en detalle de esta secuencia merece la descripción en un siguiente apartado.



Figura 5. Preparado permanente de hoja de *Atriplex sp.* “cachiyuyo” en corte transversal coloreado con triple coloración montado con bálsamo sintético.

Higiene y Seguridad

El laboratorio es un lugar donde se manipulan una gran variedad de sustancias y equipos peligrosos. Por ello, es necesario establecer normas de tipo general sobre diferentes aspectos, tales como conducta, higiene, utilización de productos y elementos de seguridad.

Consideraciones generales

Algunas consideraciones a tener en cuenta antes de comenzar la actividad:

1. Si Usted está apurado o tiene escasos minutos para desarrollar técnicas que se describirán, no la empiece; déjela para otro día en que su trabajo le permita dedicarse solo a esta actividad.
2. Mantener el laboratorio en orden, con todos los elementos de vidrio que va a utilizar perfectamente limpios, las soluciones y otros elementos en su lugar específico.
3. Trabajar con elementos de protección personal (guantes de látex, nitrilo o goma, gafas, guardapolvo) y grupal (campana extractora de gases, ducha de emergencia con lavaojos -Figura 6 y 7, respectivamente-) y elimine los desechos de forma adecuada. Tenga presente que muchas de las drogas empleadas en microscopía son de mediano o alto riesgo para su salud: irritantes y cancerígenas.



Figura 6. Campana extractora de gases.

15. Rotular inmediatamente (ejemplo, con marcador indeleble o sobre tela adhesiva) el frasco donde colocó la solución o colorante que acaba de preparar.

16. Dejar todo limpio y en orden cuando termine su actividad.

17. Tener mucha paciencia y voluntad. Sea perseverante. Si durante las primeras experiencias sus resultados no se parecen a lo que Usted esperaba, repita tantas veces como sea necesario.

Normas higiénicas

No se debe fumar, comer ni beber en el laboratorio por razones higiénicas y de seguridad. Existe la posibilidad de que los alimentos o bebidas se hayan contaminado con productos químicos.

No se deben emplear recipientes de laboratorio para contener bebidas o alimentos, ni se colocarán productos químicos en recipientes de productos alimenticios.

No se deben guardar alimentos en heladeras que contengan drogas o preparados.

Las manos deben lavarse al entrar y salir del laboratorio y siempre después de cualquier manipulación de laboratorio (debido al posible contacto con productos químicos o material biológico).

No inhalar, probar ni oler productos si no se dispone de información de los mismos.

No pipetear con la boca, utilizar propipetas adecuadas (Figura 8).



Figura 8. Propipetas.

Ropa adecuada

Se debe utilizar ropa adecuada para el trabajo que se realiza (guardapolvo abrochado, preferentemente de algodón y de mangas largas). Las mangas deben ser angostas, para evitar que pudieran engancharse con el material del laboratorio o tocar sustancias durante los procedimientos. El cabello debe estar recogido. Evitar el uso de accesorios colgantes (aros, pulseras, collares).

También se recomienda que el calzado sea zapatos o zapatillas cerradas y no sandalias.

Condiciones del área de trabajo

La organización y distribución física del laboratorio (distribución de superficies, instalación de equipos, procedimientos de trabajo, instalaciones generales) debe ser adecuada para la actividad que se realiza en el mismo, con el fin de mantener un buen nivel preventivo.

El laboratorio debe mantenerse limpio y ordenado.

No se deben obstruir los medios de escape o pasillos con bancos, sillas, equipos u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.

Deben recogerse inmediatamente todos los derrames que ocurran, por pequeños que sean.

Las mesadas de trabajo deben estar despejadas, sin libros, abrigos u objetos personales.

Cada persona debe mantener el orden en el lugar que le ha sido asignado.

Manipulación de productos químicos

Los productos químicos deben manipularse cuidadosamente, no llevándolos en los bolsillos, ni tocándolos o probándolos.

Almacenar en el laboratorio la mínima cantidad imprescindible para el trabajo diario.

Evitar el contacto de productos químicos con la piel. Utilizar guantes de un solo uso para manipular productos tóxicos o corrosivos.

Debe trabajarse, siempre que sea posible y operativo, en las campanas extractoras.

Cuando se traiga con tubos de ensayo siempre deben calentarse de lado, utilizando pinzas, no deben llevarse en los bolsillos y deben emplearse gradillas para guardarlos.

Para calentar productos, dirigir la abertura de los recipientes en sentido contrario a ti mismo o a otras personas próximas. No calentar nunca un recipiente totalmente cerrado. Para sujetar el material de laboratorio que lo requiera deben emplearse soportes adecuados.

Reducir al máximo la utilización de llamas vivas en el laboratorio. Para el encendido de los mecheros Bunsen emplear preferentemente encendedores piezoeléctricos.

No sustituir nunca un producto químico por otro en un experimento, a no ser que este indicado.

Todos los productos, así como los residuos, deben estar correctamente etiquetados. No utilices productos sin etiquetar.

Al finalizar la tarea o una operación recoger los materiales, reactivos y elementos de trabajo para evitar su acumulación fuera de los lugares específicos para guardarlos y asegurarse de la desconexión de los aparatos y el corte del agua corriente y gas.

Elementos de seguridad y de evacuación

El laboratorio debe disponer de su propio plan de emergencia o estar incluido en el del edificio en el que se halla ubicado.

Los usuarios del laboratorio deben disponer y conocer la evaluación inicial de riesgos (mapa de riesgos) la cual debe ser actualizada cuando cambien las condiciones de trabajo y siempre que se detecten daños, posibles o reales (incidentes o accidentes) para la salud de los usuarios del mismo.

El laboratorio debe disponer de los elementos de protección personal (EPP) y de las instalaciones de emergencia o elementos de actuación (duchas, lavaojos, matafuegos, mantas ignífugas) adecuados a los riesgos existentes.

Los usuarios del laboratorio deben estar familiarizados con los elementos de protección personal y grupal y seguridad existentes, así como con la localización de todas las salidas, sean o no de emergencia.

Deben utilizarse los EPP adecuados a la práctica que se realiza (Figura 9).



Figura 9. Elementos de protección personal, gafas y máscara con filtro para solventes (a) y guantes de látex y nitrilo y máscara y barbijo para polvos (b).

El personal que se incorpora al laboratorio debe ser capacitado, previo al desarrollo de actividades, sobre las normas de trabajo, de seguridad y emergencia del laboratorio, y características específicas de peligrosidad de los productos, instalaciones y operaciones de uso habitual en el laboratorio.

Proceso para Obtener Preparados Permanentes

Conservación

Una vez seccionado una porción del material vegetal a estudiar, colocarlo inmediatamente en el líquido conservador y/o fijador. Si esto no se puede hacer en el momento, se lleva al laboratorio el material en condiciones de humedad y temperatura adecuada (por ejemplo, en bolsas plásticas que contengan algodón o papel humedecido con agua y se mantiene en un lugar fresco o en la heladera).

En todos los casos que se coloque en líquido conservador, el volumen del líquido debe ser varias veces superior al del material a conservar. Si el material es grande, debe subdividirse en trozos menores a 1 cm para que el líquido penetre con mayor facilidad. Es muy importante el tamaño de la muestra que se va a conservar o fijar y aquí es donde se originan la mayoría de las fallas de fijación. También se debe tener en cuenta la rapidez de penetración de cada conservador/fijador y, en base a ello, subdividir el material y calcular los tiempos mínimos. Es conveniente realizar un cambio del líquido a las 24 h.

FAA

Es una mezcla de:

- Formol 10 ml
- Alcohol etílico 95° 50 ml
- Ácido acético glacial 5 ml
- Agua 35 ml

El material puede permanecer en él indefinidamente. Se debe dejar actuar como mínimo de 24 a 48 h, se recomienda un cambio a las 24 h.

Craf III

Es una mezcla de dos soluciones: una es de formol y la otra está formada por ácido crómico y ácido acético. Ambas soluciones se mezclan en partes iguales antes de su uso.

Fijación

La fijación es un proceso destinado a matar las células lo más rápidamente posible y conservarlas en el estado más parecido al que tenían mientras estaban vivas. También endurece los tejidos y fija los elementos celulares para que no cambien de posición durante la manipulación posterior. Debe lograr mantener todas sus partes constituyentes sin que aparezcan estructuras nuevas. Un tejido bien fijado presentará las células turgentes, no plasmolizadas, deshidratadas, hinchadas ni arrugadas.

La fijación del material representa el paso más importante de todo el proceso que culmina con la observación al microscopio del material a estudiar. Solamente a partir del material bien fijado pueden esperarse buenos resultados.

Un buen fijador debe tener las siguientes, cualidades:

- ✓ penetrar rápidamente, de modo que la fijación se produzca tanto en las capas superficiales como en las profundas de un tejido.
- ✓ ser ácido para de forma paulatina poder producir una coagulación total de las proteínas, de modo que las células no sufran contracciones. Los fijadores básicos se utilizan para el estudio de nucléolos o mitocondrias.

FAA

Es el más utilizado cuando el material se ha de cortar a mano alzada o con micrótomo para realizar estudios morfológicos o histológicos.

Craf III

El material se fija durante 12-24 horas.

Farmer o Carnoy I

- Alcohol etílico 100° 3 partes

- Ácido acético glacial 1 parte

La solución debe prepararse en el momento de ser usada debido a que se esterifica al poco tiempo. El tiempo de fijación varía entre 15 minutos y 1 hora a 18-20 °C, se recomienda realizarlo por 24 h.

Carnoy II

- Alcohol etílico 100° 6 partes
- Ácido acético glacial 1 parte
- Cloroformo 3 partes

La inclusión del cloroformo en la solución hace que los tejidos se endurezcan menos. Ambos se utilizan para estudios meióticos y recuentos de cromosomas. Para anteras o ápices de raíces el tiempo de fijación varía de 30 minutos a 24 horas, según el grosor de las mismas.

Glutaraldehído

Es un fijador no coagulante para realizar estudios citoplasmáticos. Es el que otorga a los tejidos la mejor preservación conocida hasta el momento. Es un compuesto poco estable. Se comercializa en solución acuosa al 25 o 50%, puede contener impurezas; debido a ello se recomienda destilarlo nuevamente en el laboratorio y guardarlo en heladera.

Se debe usar conjuntamente con una solución tampón de pH aproximado a 7,4 para evitar que por acidificación se produzca la precipitación de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Una vez mezclado con el buffer, es conveniente usarlo dentro de las 24 horas. El tiempo de fijación depende de la temperatura ambiente y de la técnica a utilizar. A temperatura ambiente varía desde 2 a 24 horas, mientras que en heladera (0 a 4 °C) con 3 horas es suficiente. Las técnicas citoquímicas requieren solo 10 minutos de fijación para estudios enzimáticos.

Tetróxido de osmio

Al igual que el glutaraldehído se lo emplea con soluciones buffer junto al agregado de cloruro de calcio para favorecer su acción fijadora por acción de sus iones.

Si se lo usa como fijador los tiempos varían entre 2 a 12 horas en heladera (0 a 4 °C).

Si se lo usa como post fijador, después del glutaraldehído, son suficientes 2 horas. La extensa difusión como post fijador se debe a que fija y "tiñe" a los orgánulos, dando un contraste positivo a sus membranas.

Debe trabajarse con máscara y bajo campana extractora de gases, es muy volátil y sus vapores son tóxicos.

Permanganato de potasio

Se emplea en soluciones tamponadas al 1-2%. Es un fuerte oxidante; por lo tanto, los tiempos de fijación deben ser cortos, de 10 a 60 minutos a una temperatura entre 0 y 4 °C.

Es usado especialmente cuando se desea observar las membranas biológicas y su distribución, debido a que es un fijador selectivo que destruye por oxidación casi todos los componentes citoplasmáticos excepto las membranas celulares.

Se aconseja incluir en resinas epóxicas después de una fijación con permanganato.

Deshidratación

La mayoría de los medios de inclusión no son miscibles en agua; por lo tanto, ésta debe ser removida y reemplazada por solventes orgánicos. Lo ideal es utilizar un disolvente intermediario que se mezcle con el fijador y que no reaccione con él.

Para inclusiones en parafina, se ha generalizado el empleo de series de alcohol etílico en dilución acuosa: 50°, 70°, 80°, 96° y finalmente alcohol absoluto (ver Anexo 1).

Cuando se va a incluir en resinas puede emplearse la serie de alcoholes etílicos conservados en heladera (aproximadamente 4 °C) o bien deshidratar con acetona; se puede transferir el material fijado y lavado a una solución de acetona al 30% durante 30

a 60 minutos y luego pasarlo por una escala ascendente de concentraciones 50%, 70%, 90% y finalmente acetona pura.

Otra forma de realizar la deshidratación es sumergir los materiales en formol-dimetil-acetal (FDA) el que se combina con el agua de los tejidos formando compuestos químicos estables.

Inclusión

Para obtener cortes histológicos suficientemente delgados es necesario incluir el material en alguna sustancia que actúe como soporte. Dependiendo del tipo de micrótomos a usar y de si forman o no cintas en el momento del corte se puede utilizar:

- micrótomos de deslizamiento y ultramicrótomos, formar cintas utilizando parafinas, ceras, plásticos y resinas para cortar;
- micrótomos de congelación, no forma cintas y utiliza soluciones gomosas y azucaradas para cortar.

Parafina y plásticos histológico

El material deshidratado se infiltra en parafina o polímero plástico histológico en estado líquido que luego se deja solidificar y se utilizan para realizar cortes con micrótomos rotatorio tipo Minot o con micrótomos de deslizamiento.

La parafina pura tiene algunas desventajas como medio de inclusión: es cristalina, hidrofóbica y su punto de fusión es relativamente alto (50-60°). Para mejorarla se mezcla con ácido esteárico, gomas, ceras, con lo cual se reduce la hidrofobia y la tendencia a cristalizar.

Los polímeros son plásticos forman excelentes cintas (ejemplo “histowax” o “paraffin wax”). También se debe prestar especial cuidado a los rangos de temperaturas en que se funden, ejemplo el uso de “histowax” requiere entre 57 °C y 60°C.

Moldes de inclusión

En los casos que el proceso se realice de forma manual es necesario realizar un molde o soporte que contenga al medio de inclusión en estado líquido y la muestra a cortar. Los mismos se realizan con papel sedoso para facilitar la extracción de la muestra que son de tamaño variable (Figura 10).

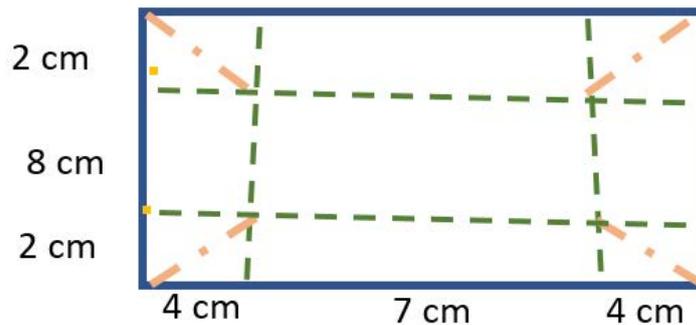


Figura 10. Molde de inclusión. Las medidas son de referencia, las líneas entre cortadas indican zona de doblado.

El molde se coloca sobre una plancha tibia (35-40 °C) y en él se vierte el medio de inclusión con el material. Se acomodan los trozos de material con una aguja histológica, tratando de ahorrar espacio, pero dejando medio de inclusión entre ellos para facilitar el corte y tallado del taco. Luego se traslada el molde a una placa de mármol para reducir su temperatura, controlando que no se formen burbujas en torno del material a cortar. Si ello sucede se pueden retirar con una pinza o bisturí caliente. También se puede colocar en la heladera (Figura 11).



Figura 11. Material incluido en histowax en caja.

El material incluido se retira del molde (Figura 12a) y se corta en tantos trozos como materiales se hayan incluido en la misma caja. Esto se logra cortando el medio de inclusión con un bisturí o espátula calentada a la llama., dejando suficiente medio de inclusión a su alrededor, se pega sobre un trozo de madera, calentando uno de los costados para derretir en medio de soporte, una vez frío se talla con un bisturí apenas tibio, sacando los resto del medio de inclusión (Figura 12b). Antes de pegarlos a los tacos de madera, observar bien el material para orientarlo según el tipo de corte que se desea obtener (longitudinal, transversal, radial). Finalizado esto, el material estará listo para ser cortado con micrótopo rotativo Minot o deslizamiento.

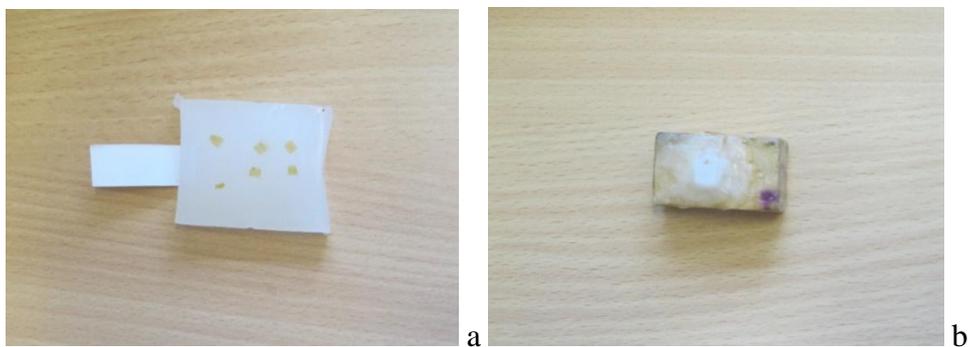


Figura 12. Material incluido en histowax listo para tallar (a) y colocado sobre taco de madera (b).

Cortado

Los órganos de la planta (raíces, tallos o hojas), las estructuras reproductivas (flores) o de diseminación (semillas y frutos) se analizan empleando tres planos de cortes previamente descritos.

Cuando se trata de hojas los planos de corte más frecuentes son: transversal, que suele realizarse en la parte media de la lámina foliar, y paradermal, paralelo a las epidermis. Para el estudio de leños es necesario contar con los tres planos.

Para efectuar los cortes se utilizan hojas de afeitar nuevas, navajas bien asentadas, cuchillas metálicas, cuchillas de diamante y cuchillas de vidrio. Las cuchillas metálicas se emplean en los micrótopos y las dos últimas en ultramicrótopos.

Cortes a mano alzada o libre

Generalmente se hacen cuando se desea observar algo rápidamente y sin mucho detalle ya que el espesor que se logra pocas veces es menor que 20 μ . El material a cortar puede ser fresco o conservado. Los cortes se realizan con bisturí, hoja de afeitar o navaja.

Para realizar este tipo de corte puede recurrirse a sostener el material (tallo o raíz) entre dos mitades de láminas de telgopor. Para cortar hoja puede utilizarse una zanahoria, se enrosca el material sobre ella, para mayor firmeza puede retirar la corteza y trabajar con el cilindro central, cuidando que el haz central quede perfectamente vertical. Para tallo o raíz, según el corte que se desee lograr se debe colocarlos en posición perfectamente vertical, para obtener cortes transversales, o perfectamente transversal, para cortes longitudinales. En el caso del telgopor o la zanahoria, actúan como soporte equivalente al medio de inclusión y se cortan al mismo tiempo que el material.

También se puede realizar el corte sosteniendo el material directamente. La mecánica consiste en sostener el material perfectamente vertical o transversal con la mano menos hábil, manteniendo los dedos tan rectos como sea posible. El material debe proyectarse pocos milímetros por encima del índice y ser sostenido por el pulgar en su parte media o inferior; con la otra mano sostenga firmemente el elemento con el cual realizará el corte (bisturí, navaja u hoja de afeitar), apoye el material sobre un portaobjeto limpio con unas gotas de agua. En ángulo de 90° realice el corte, utilizando el elemento cortante de muy buen filo, como una guillotina no como un serrucho. Durante la operación mantenga los codos contra el torso y la muñeca firme.

Realice de la misma forma varios cortes cuyo espesor sea de unos pocos mm de espesor, se recomienda realizar varios cortes del material, que siempre deben mantenerse hidratados, para lo cual puede colocarlos en agua sobre un portaobjeto o una cápsula, ayudándose con las agujas o pinza para transferirlos a otro portaobjeto perfectamente limpio.

Cortes con micrótopo

- **Micrótopo de mano.** Este micrótopo es muy simple, consta de un cilindro vertical hueco que se sostiene con una mano y que termina en un disco o placa anular de cristal por donde se hace deslizar una navaja (Figura 13).

El espesor de los cortes que se logra es similar a los hechos a mano alzada y con hoja de afeitar. El material a cortar puede ser fresco o fijado. No sirve para cortar maderas.



Figura 13. Micrótopomo de mano.

- **Micrótopomo de cuchilla metálica.** Para trabajar con cualquiera de los microtopomos es imprescindible contar con cuchillas en condiciones adecuadas, muy afiladas. Las cuchillas descartables son las de más amplio uso. Aunque existen cuchillas no descartables, que tienen el inconveniente que al perder el filo deben ser afiladas por operarios especializados; no es conveniente realizar dicha operación uno mismo ya que el trabajo lleva mucho tiempo, requiere experiencia y, además, se corre el riesgo de modificar el ángulo de corte.

En todos los casos, luego de su uso deben ser limpiadas, secadas y envaselinadas para guardarlas en sus respectivas cajas.

Hay diversos tipos de cuchillas:

- ✓ muy planocóncava: se la emplea para cortar materiales duros,
- ✓ planocóncava: es ideal para cortar materiales blandos, ya sean frescos, fijados o incluidos en parafina. La cara plana debe estar orientada hacia el lado del material a cortar,
- ✓ biplana (cuneiforme): se la utiliza para cortar material incluido en parafina.

- **Micrótopomo de deslizamiento.** En este micrótopomo, también llamado de plano inclinado, la cuchilla se mueve sobre una corredera y el objeto a cortar esta fijo en la platina del micrótopomo. Sirve para cortar materiales blandos, frescos o fijados incluidos o no en parafina y también materiales duros (leños).

Durante el uso de este equipo debe cuidarse especialmente: a) la sujeción de la cuchilla y su orientación, b) la sujeción del material.

Este micrótopo permite obtener cortes entre 10 y 20 μm de espesor, según la dureza del material.

Algunos micrótopos muy sólidos empleados para cortar madera se denominan *xilótopos*.

- **Micrótopo rotatorio (tipo Minot).** Este micrótopo se utiliza para cortar materiales incluidos en parafina o similar (Figura 14). Presentan la ventaja de permitir realizar cortes seriados lo que posibilita la reconstrucción de la estructura interna de un órgano dado.

En este micrótopo la cuchilla está fija y se desplaza el bloque de parafina solo o adherido a un taco de madera. Las secciones se depositan sobre la cuchilla y se adhieren unas a otras formando una cinta.



Figura 14. Micrótopo tipo Minot.

Al colocar el taco en la platina se debe orientar de tal modo que la superficie a cortar quede paralela al plano de la cuchilla. Si todo está correcto, al cortar se irá formando la cinta de parafina.

Se obtienen cortes desde 5 hasta 18 μm de espesor. Cuanto más pequeñas sean las células (ejemplo: tejidos meristemáticos) más delgados deben ser los cortes: 5-10 μm . En los tejidos adultos el espesor de 12-14 μm es el corriente, aunque cortes de mayor grosor también son aceptables. Se considera bueno un corte que permita apreciar la continuidad de la estructura sin superponer varias capas celulares.

En los cortes demasiado delgados aparecen células rotas o separadas, mientras que en los gruesos la cantidad de capas celulares superpuestas pueden dificultar la observación.

Por ello, apenas se ha comenzado a cortar, deben observarse las secciones al microscopio para comprobar si están correctamente orientadas y si el grosor elegido es el adecuado (montarlas en un portaobjeto con unas gotas de solvente para facilitar la observación).

- **Micrótopo de congelación.** Comúnmente usado en los laboratorios de histología patológica para diagnósticos rápidos, también puede emplearse para tejidos vegetales, aunque su uso no es muy frecuente, porque debe adquirirse práctica para juzgar el grado de congelamiento que necesita cada tipo de material.

El material a cortar embebido en una sustancia adecuada y ubicado sobre la platina del micrótopo, se solidifica por congelación mediante dióxido de carbono líquido o termoconductividad.

El material congelado permanece en posición vertical y la cuchilla, también enfriada, lo corta según un plano horizontal.

Se pueden obtener buenos cortes hasta de 15 μm .

- **Ultramicrótopo.** Este micrótopo consiste en micrótopo Minot con una lupa binocular y cuchillas de vidrio diamante. Las cuchillas de vidrio se confeccionan en el momento de realizar los cortes, a partir de barras de vidrio con una máquina (Knifemaker) que se adquiere junto con el ultramicrótopo. El material se incluye en plásticos o resinas se pueden obtener cortes "gruesos" de 1 μm de espesor o "finos" entre 750 y 900 Å .

Pegado

El proceso de pegado consiste en adherir el material cortado al portaobjeto, que previamente debe haber sido desengrasado. Ello puede realizarse sumergiéndolo en alcohol 96°, posteriormente se lo seca con una tela que no deje pelusas y se guarda hasta su uso.

Pegado con agua

Las tiras del material incluido en parafina o plástico histológico se cortan con bisturí de un largo menor al del cubreobjeto (unos 2 mm menos). En el portaobjeto se coloca unas gotas de agua destilada, sobre ella se ubica el pedazo de tira con el material y se apoya el portaobjeto sobre una placa tibia, cuya temperatura sea menor al punto de difusión del medio de inclusión. En unos minutos se observará que el material se expande, desaparece la rugosidad, puede retirar el agua excedente. El portaobjeto se coloca verticalmente en una caja de preparados con papel de filtro en el fondo. Las cajas se colocan destapadas en una estufa de secado (35° a 40° C) dos o más semanas.

Pegado con albúmina de Mayer

Cuando el material es muy grueso o se despegó con agua solamente se utiliza como pegamento la albúmina de Mayer:

- Clara de huevo
- Glicerina
- Cristal de ácido fénico

1. Separar la clara de huevo, cortarla con una tijera para liberar la albúmina.
2. Filtrar con gasa.
3. Agregar en el medio de la clara dos partes de glicerina por cada parte de clara.
4. Agregar un cristal de fenol o timol, para evitar la formación de hongos.

La albúmina se coloca en el portaobjeto antes que el agua destilada. El resto del procedimiento es igual al anteriormente descrito.

Coloración

La coloración es fundamental en la observación microscópica, ya que es mucho más fácil interpretar imágenes coloreadas, producidas por absorción de la luz, que imágenes no coloreadas, producidas por refracción de la luz. Ello debido a que, la mayoría de las estructuras celulares poseen un índice de refracción semejante, por lo que, sin la ayuda de los colorantes, resulta difícil diferenciarlas.

Colorantes

Un colorante es una sustancia que posee color y es capaz de cederlo al combinarse con otra. Para que esto ocurra, estas moléculas orgánicas contienen dos clases de grupos químicos activos: el cromóforo (que es el que lleva el color) y el auxocromo (el que permite cederlo).

Si el material que se tiñe queda de un color semejante al del colorante usado, decimos que el colorante es *ortocromático* o que ha habido *ortocromacia* (ejemplo: safranina). Algunos colorantes se comportan de otra manera y son capaces de teñir estructuras diferentes en 2 colores distintos. A estos colorantes se los llama *metacromáticos* y se dice entonces que ha habido *metacromacia* (ejemplo: violeta de cresilo, tiñe de color violeta los tejidos con paredes celulares primarias y de color verde las paredes celulares secundarias). El azul de toluidina colorea al citoplasma de azul mientras que las lipoproteínas se colorean de rojo.

Existen colorantes naturales que son extraídos de productos animales o vegetales como el carmín, se extrae de hembras de un hemíptero (*Coccus cacti*); la orceína se obtiene de líquenes de los géneros *Lecanora* y *Rocella* y la hematoxilina del leño de *Hematoxylum campechianum* (Fabaceae).

Otros colorantes, los artificiales, provienen de hidrocarburos extraídos del alquitrán de hulla y derivan del benceno. Algunos de los más comunes usados para la tinción de estructuras vegetales son: safranina, verde rápido (fast-green), violeta y azul de cresilo, rojo neutro.

Coloraciones generales

1. *Directas*: se producen simplemente por inmersión en el baño colorante. Ejemplo safranina.

2. *Indirectas*: el colorante no puede actuar directamente; es necesario que el material a colorear sea tratado antes por una sustancia que lo prepare para recibir al colorante. Ésta sustancia se llama mordiente ("laca").

Ejemplos de mordientes: carbonato de sodio al 2%, cloruro de bario al 2%, cromato de amonio al 4%, permanganato de potasio al 1%.

Ejemplo de coloración indirecta: hematoxilina.

3. *Combinadas*: son aquellas en que se emplean varios colorantes, ya sea en forma sucesiva o simultánea:

a) *combinada sucesiva*: cada colorante actúa por su propia cuenta y se fija a un elemento determinado. Ejemplo: safranina-verde rápido;

b) *combinada simultánea*: se prepara primero la mezcla de líquidos colorantes y al introducir el material se produce la coloración. Generalmente los resultados no son óptimos. Ejemplo: coloración Carmín-Verde Mirande.

Coloraciones específicas

Para reconocer determinadas sustancias o estructuras celulares, se emplean colorantes específicos; como por ejemplo para:

- ✓ *Almidón*: lugol (Figura 15).

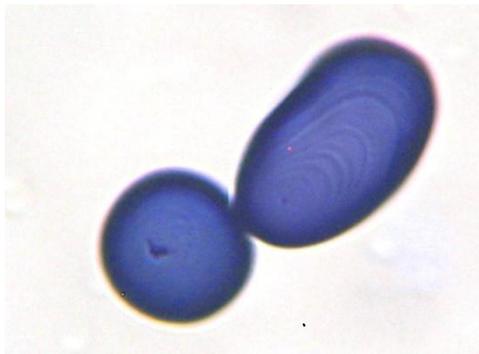


Figura 15. Amiloplasto coloreado con lugol en parénquima reservante de *Solanum tuberosum* “papa”. Preparado fresco montado en agua. Barra indica 40 μm .

- ✓ *Calosa*: azul de resorcina o azul de anilina.
- ✓ *Citoplasma*: fucsina ácida; azul de anilina; verde rápido; verde de malaquita o naranja G.
- ✓ *Cromosomas*: hematoxilina; safranina; carmín o verde de metilo.
- ✓ *Grasas*: sudán III o IV.
- ✓ *Laminilla media*: rojo de rutenio o hematoxilina férrica.
- ✓ *Mitocondrias*: verde Jano; cristal violeta o hematoxilina férrica de Heidenhains.
- ✓ *Núcleos*: hematoxilina o safranina.

- ✓ *Paredes celulósicas*: azul de anilina; hematoxilina de Delafield; verde rápido o rojo Congo.
- ✓ *Paredes cutinizadas*: safranina; verde de metilo; fucsina ácida o azul de metilo.
- ✓ *Paredes lignificadas*: safranina; violeta de cresilo; verde iodo o verde de metilo.
- ✓ *Paredes primarias de células vivas y vacuolas*: rojo neutro.
- ✓ *Proteínas*: safranina.

Coloraciones vitales

Los métodos de coloración descritos hasta aquí no son compatibles con la vida de las células por dos motivos: son tóxicos y, además, el material debe ser previamente fijado. Pero existe una forma particular de coloración (coloración vital) que no afecta la vida de la célula porque utilizan colorantes que son muy poco tóxicos y, se emplean en soluciones muy diluidas. Ejemplos de los mismos son el rojo neutro y el verde jano.

Impregnaciones metálicas

Consiste en producir un precipitado de un metal reducido sobre determinados elementos de un tejido. El precipitado del metal puede quedar sobre las células del tejido (impregnación positiva) o en los espacios intercelulares del mismo (impregnación negativa). Lo que otorga color sin ser colorantes propiamente dichos. Los metales más usados son la plata, el oro y el osmio. Ejemplo: técnicas argénticas.

Montaje

Montar un material, para obtener un preparado microscópico, consiste en ubicarlo entre un portaobjeto y cubreobjetos, en un medio tal que sea apropiado para la observación y la conservación del mismo.

Los medios de montaje pueden ser líquidos (agua, lactofenol, agua-glicerina) o sólidos (gelatina-glicerina, bálsamo de Canadá o sintéticos).

Serán tanto más apropiados cuanto más parecido sea su índice de refracción al del vidrio empleado en el instrumental óptico, el que normalmente oscila entre 1,5 y 1,6.

Cuando se requiere hacer observaciones rápidas sin interesar la conservación de los materiales se utiliza agua destilada o glicerina diluida en agua al 50%.

Cuando, además de observar se desea la conservación de los preparados durante largo tiempo, se utilizan diferentes medios de montaje como gelatina-glicerina, bálsamos o resinas artificiales. Es importante seleccionar el medio de montaje según el solvente utilizado en pasos anteriores, para ello se debe consultar la hoja de seguridad o la compatibilidad del producto.

Observación

Siempre que se estudia un material determinado es conveniente que se realice en forma progresiva desde lo macroscópico a lo microscópico; es decir, primero a simple vista, luego con lupa o microscopio estereoscópico (disección de órganos), con microscopio óptico (observaciones histológicas) y finalmente si es necesario con microscopio electrónico (caracterización de organelas).

Generalmente, el material debe haber sido fijado, cortado, coloreado y montado para que esté en condiciones de ser observado al microscopio. La unidad más utilizada en microscopía es el micrón o micrómetro (μm), que equivale a la milésima parte del milímetro (Tabla 3).

Tabla 3. Unidades de uso corriente en microscopía.

Denominación	Abreviatura	Factor
milímetro	mm	10^{-3}
micrón o micrómetro	μm	10^{-6}
nanómetro	nm	10^{-9}
ángstrom	Å	10^{-10}

La observación no es fácil debido a que las células son de pequeño tamaño y más aún sus componentes (membranas 5-10 nm, ribosoma 19 x 26 nm) y antes de colorearlas son transparentes a la luz visible. Es por ello que se han diseñado instrumentos que permiten aumentar el poder resolutivo y lograr una mejor definición del material observado.

Lupa o microscopio estereoscópico

Con la lupa binocular o microscopio estereoscópico (Figura 16), cuyo poder de resolución es de $3\ \mu\text{m}$, sólo se observan superficies. Al permitir una visión tridimensional del material y la diferenciación de sus colores es conveniente su uso al inicio del procesamiento, para diseccionar flores, semillas u orientar los cortes.

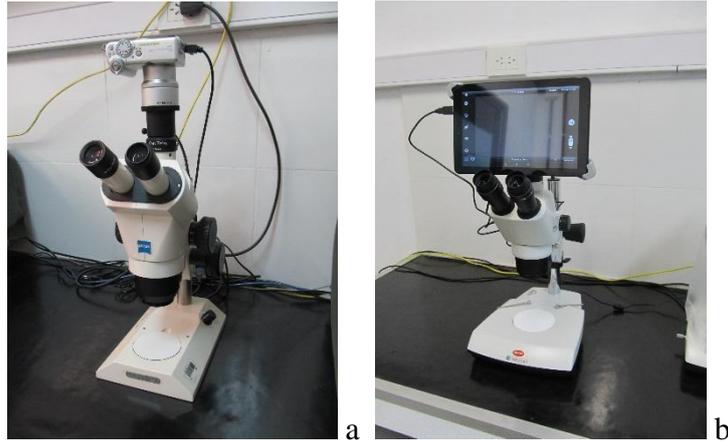


Figura 16. Lupa binocular trilocular con cámara fotográfica (a) y con equipo de digitalización de imagen (b).

Microscopio óptico

El microscopio (del griego, *micro*: pequeño y *skopein*: observar) es el instrumento que sirve para visualizar estructuras pequeñas, cuyas dimensiones son inferiores al límite del poder de resolución del ojo humano. El poder de resolución es la capacidad de separar dos puntos muy próximos y dar de ellos imágenes claras y definidas. El ojo humano tiene un poder de resolución de $0,1\ \text{mm}$ ($100\ \mu\text{m}$); es decir si la distancia de separación entre dos puntos es menor que $0,1\ \text{mm}$ se ven como uno solo. En síntesis, el microscopio actúa como un separador de puntos. El poder de resolución de un buen microscopio óptico es aproximadamente igual a $0,2\ \mu\text{m}$.

Independientemente del modelo del microscopio óptico está formado por tres partes: mecánica, óptica y un sistema de iluminación.

La parte mecánica consta de pie, columna, platina del tubo y tornillos macro y micrométrico (Figura 17).

El tubo sostiene el sistema óptico: en su extremo superior se ubican las lentes oculares y en el extremo inferior el revólver con cambiador de objetivos, es la placa giratoria que sostiene las lentes objetivos. Está especialmente diseñada para facilitar su agarre al momento de realizar los cambios de objetivos durante la observación.

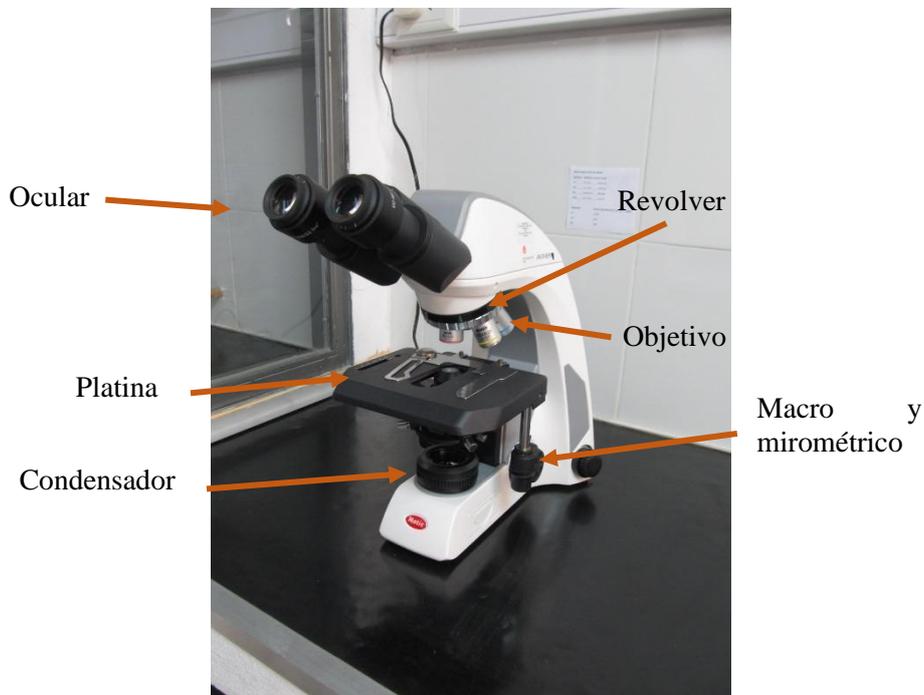


Figura 17. Microscopio.

Tanto los oculares como los objetivos tienen distintos aumentos, siendo para los últimos los más comunes: 4X, 20X, 40X, 60X y 100X (Figura 18); los dos primeros son lentes cortas, los últimos son largas. En particular el 100X se emplea como objetivo de inmersión (lente húmeda), dado que puede rozar el cubreobjeto siempre se usa con aceite de inmersión. El aumento obtenido se calcula multiplicando el aumento del ocular por el objetivo utilizado.

Debajo de la platina se encuentra el sistema de iluminación: la lámpara, el diafragma iris y el condensador.

La imagen se forma debido a los rayos luminosos provenientes de la lámpara que atraviesan el diafragma iris, llegan al condensador —sistema de lentes convergentes— que los concentra y proyecta sobre el material a observar a través de la abertura de la platina. El objetivo recoge estos haces y proyecta una imagen aumentada, real e invertida

que se forma dentro del tubo, la cual es captada por la lente ocular y finalmente se forma en la retina del observador una imagen virtual, aumentada e invertida del material.



Figura 18. Objetivo: 40x indica la escala de reproducción de la imagen, 0,65 indica la abertura del objetivo y 0,17 indica que el cubreobjetos con el que se observen los preparados deberá tener ese espesor en milímetros.

Uso del microscopio óptico

Posición. Ubíquese frente al microscopio, si necesita desplazarse hágalo usted, el microscopio no debe desplazarse lateralmente eso afecta el sistema de lentes. Utilice un asiento cómodo, regule la altura del mismo para que los oculares del microscopio queden a la altura de sus ojos. Ello evita posturas incorrectas de cervicales y espalda.

Observación:

1. Colocar el preparado sobre la platina y sujételo con la pinza, compruebe que el cubreobjeto esté hacia arriba.
2. Ubicar el material a la altura del objetivo de menor aumento o más corto moviendo los tornillos de la platina.
3. Prender el equipo, regule la luz de acuerdo con la intensidad necesaria, si es muy alta la vista se cansa rápidamente o inclusive puede ocasionar algún daño. Las lámparas tienen un tiempo de uso, recuerde apagarla cuando no esté observando el material para realizar un uso eficiente de las mismas.
4. Controlar que todo el campo esté iluminado puede abrir o cerrar el diafragma.

5. Enfocar primero con el objetivo de menor aumento. Mirando por los oculares, acerque o aleje el preparado del objetivo, moviendo el tornillo macrométrico hasta que aparezca la imagen.
6. Ajustar el foco con el tornillo micrométrico, siempre mirando por los oculares.
7. Controlar que los oculares estén ubicados para su distancia focal, con ambos ojos debe formar una sola imagen. Si ello no ocurre, observe por uno de los oculares con el otro ojo cerrado. Mueva el ocular, ambos oculares se desplazan lateralmente, hasta que quede centrado. Repita la acción con el otro ojo y ocular, después abra los dos ojos, debería observar solamente una imagen.
8. Si necesita cambiar de aumento gire el revolver hasta posicionar el próximo objetivo y ajuste el foco con el tornillo micrométrico. El cambio de objetivos debe ser gradual de menor a mayor aumento, antes de cada cambio asegúrese de estar observado el material nítidamente. Las lentes 40X, 60X y 100X son largas y aunque tienen un sistema retráctil que las protegen se pueden dañar al rozar el cubreobjeto.
9. Antes de usar el objetivo 100X coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjeto, para ello desplace el objetivo de 40X o 60X antes. Inmediatamente después de la observación enfoque con una lente corta, para no ensuciar objetivo de 40X o 60X, limpie del aceite de inmersión de la lente y la superficie del cubreobjeto.
10. Apagar la luz, una vez terminada la observación.
11. Colocar el revolver en la lente más corta o de menor aumento, girando en sentido inverso al usado de mayor a menor aumento y recién después retire el preparado. No mueva la platina, eso ocasiona pérdida de tiempo y gasto innecesario de la cremallera de la misma.

Variaciones en las características del microscopio óptico

Campo claro: el material se ilumina directamente, es decir, los rayos luminosos inciden directamente sobre el material y el objetivo. Es el más generalizado.

Campo oscuro: se basa en la dispersión de la luz por medio de un condensador de campo oscuro, que ilumina el material oblicuamente e impide que los rayos luminosos que inciden sobre el objeto entren al objetivo (Figura 19). Al observar a través del ocular se

ve al material iluminado sobre un fondo oscuro, permite descubrir estructuras de menor tamaño que las que se visualizan empleando campo claro.



Figura 19. Microscopio común con filtro retráctil, al colocarlo permite observar como uno de campo oscuro.

Contraste de fase: se usa especialmente para el estudio de células vivas. Es necesario contar con un condensador especial y con lentes objetivos de contraste de fase que poseen un "anillo de fase" dentro de un sistema óptico. Los pequeños cambios *de fase* que se producen en el material son ampliados y transformados en cambios de intensidad. El material (ejemplo una célula) que es transparente, se verá gris con diferentes tonalidades, las que dependen del producto entre el espesor del material y las diferencias entre los índices de refracción del material y el medio.

Fluorescencia: se basa en el hecho de que algunas sustancias son capaces de emitir fluorescencia cuando son iluminadas por la luz ultravioleta (longitud de onda promedio 3.600 \AA).

El microscopio de fluorescencia es un microscopio de campo claro modificado de modo que la longitud de onda que inducirá la fluorescencia en los compuestos que van a ser estudiados sea enfocada sobre el material y la fluorescencia emitida pueda ser observada.

Técnicas Generales Paso a Paso

Técnicas de fijación

FAA

1. Preparar el fijador.

- Formol 10 ml
- Alcohol etílico 95° 50 ml
- Ácido acético glacial 5 ml
- Agua 35 ml

2. Colocar el material en un frasco que pueda contener fijador en un volumen varias veces superior al propio. Si el material es muy grande, se lo debe subdividir en trozos pequeños para que el fijador penetre con mayor facilidad.

3. Agregar junto al material una tarjetita escrita con lápiz indicando el nombre de la especie, lugar de recolección y fecha, y número del ejemplar del herbario.

Es muy recomendable que, de todo el material destinado a estudios anatómicos, exista un ejemplar de herbario de referencia depositado en un herbario reconocido. Esto es indispensable en caso de que los preparados sirvan de base para investigaciones cuyos resultados se han de publicar.

4. Dejar actuar 48 horas como mínimo.

CRAF III

1. Preparar ambas soluciones.

2. Mezclarlas en partes iguales en el momento de usarlas.

3. Introducir el material y la tarjetita con las especificaciones.

4. Dejar actuar 12 horas como mínimo.

Farmer (comúnmente llamado Carnoy I)

1. Preparar el fijador en el momento de usarlo.

- Alcohol etílico 100° 3 partes
- Ácido acético glacial 1 parte

La solución debe prepararse en el momento de ser usada. El tiempo de fijación varía entre 15 minutos y 1 hora a 18-20 °C, se recomienda realizarlo por 24 hs.

Glutaraldehído

Posfijación con tetróxido de osmio

1. Preparar la solución buffer elegida. Ejemplo: cacodilato de sodio 0,2 M, pH 7,2-7,4, por cada 5 ml a emplear para cada muestra, tomar 4,4 ml del buffer y agregar 0,6 ml de glutaraldehído al 25%.

2. Sobre una base de cera rosa empleada en odontología colocar una gota de esta solución y sobre ella el material. Trabajar con guantes y, si es posible, bajo campana. Colocar bajo la lupa y obtener trozos muy pequeños, de 0,5 mm aproximadamente.

3. Pasar los trocitos seleccionados a un frasquito de vidrio que contenga los 5 ml del fijador en el buffer. Tapar y dejar en heladera (0-4 °C) durante 3 horas como mínimo (depende del material).

4. Si es necesario interrumpir la técnica en el día, una vez cumplido el tiempo, descartar el líquido y agregar solución buffer de cacodilato de sodio y sacarosa.

En esta solución puede quedar el material por un período de hasta 60 días.

Posfijación con tetróxido de osmio

1. Colocar el material en un frasquito que contenga 1 ml de fijador de Caufield. Guardar tapado en heladera durante 1-2 horas.

2. Enjuagar 2-3 veces con agua destilada (si es posible, bidestilada).

3. Colocar el material en acetato de uranilo al 2%.

Mantener el frasquito tapado, a temperatura ambiente, durante 2 horas. Este paso cumpliría la función de una coloración "en masa" (puede suspenderse).

4. Enjuagar 2-3 veces con agua destilada.

Ya está el material en condiciones de comenzar el proceso de deshidratación (ver parte b en deshidratación con alcohol etílico).

Técnicas de deshidratación

Alcohol etílico

a) Para realizar inclusiones en parafina, para colorear cortes de material fresco o herborizado:

1. Preparar la serie de alcoholes según la tabla de dilución (Anexo I).
2. Partir de alcohol 70° si el material está fijado en FAA o de alcohol 50° si está fijado con glutaraldehído.
3. Realizar cambios sucesivos hasta llegar al alcohol propuesto (alcohol 70°; 80°; 90° y 100°), dejando los materiales el tiempo correspondiente al indicado en la técnica que se esté realizando, ejemplo: inclusión en parafina. Los alcoholes 70° y 100° se descartan, los restantes se pueden reutilizar.
4. Continuar el tratamiento del material de acuerdo con la técnica que se desea realizar.

b) Para realizar inclusiones en resinas:

1. Partir de alcohol 50°, dejar actuar 15 minutos.
2. Descartar el alcohol 50° y agregar alcohol 70°, dejar actuar 15 minutos.
3. Retirar el alcohol del paso anterior y continuar con alcohol 80°, dejar actuar 15 minutos.
4. Retirar el alcohol del paso anterior y continuar con alcohol 96°, dejar actuar 12 horas.
5. Retirar el alcohol del paso anterior y continuar con alcohol 100°, dejar actuar 2 horas, realizando un cambio cada 10 minutos.

Otra posibilidad:

1. Alcohol 70°, 15 minutos,
2. Alcohol 96°, 15 minutos.
3. Alcohol 96°, 15 minutos.
4. Alcohol 100°, 30 minutos.
5. Alcohol 100° 30 minutos.

Si fuera necesario suspender la técnica, hacerlo en el primer pasaje de alcohol 96°.

Cumplir los tiempos con el frasco tapado y en la heladera (0-4 °C). Realizar por lo menos 2 cambios de alcohol en cada paso.

Es aconsejable mantener los alcoholes que se utilizarán en esta deshidratación en frascos tapados en heladera. Continuar la inclusión.

Acetona

Para realizar inclusiones en resinas:

1. Colocar el material previamente fijado con glutaraldehído y tetróxido de osmio en una solución de acetona al 30% durante 30 a 60 minutos.
2. Realizar cambios sucesivos por acetona al 50, 70 y 90% durante 15 minutos cada uno.
3. Dejar el material en acetona pura durante 30 minutos.
4. Continuar la inclusión.

Terbutanol -Etanol

Cuando los materiales son muy pequeños y delicados (nódulos, ápices), se aconseja este procedimiento para su posterior inclusión en parafina:

1. Partir de alcohol 70° si el material está conservado en FAA.
2. Realizar un vacío previo a la deshidratación. Puede hacerse utilizando un desecador con espita lateral, con tapa, en la que se coloca una junta de vaselina.

Los frasquitos que contienen el material y el alcohol 70° se introducen destapados en el desecador. Se desliza la tapa del desecador y se realiza un vacío moderado cuidando que no burbujee el alcohol de los frasquitos. Se suspende cuando se observa que no se desprenden burbujas desde el material hacia la superficie abierta del frasco.

3. Preparar terbutanol-alcohol etílico absoluto y agua y realizar pasajes del material cada 10 o 14 horas.
4. Una vez deshidratado, continuar el procedimiento para incluir en parafina.

Técnica de inclusión

Parafina o cera histológica

1. Partir de material previamente fijado en FAA.
2. Deshidratar con una serie ascendente de alcoholes etílicos y en tiempos que variarán según los materiales en estudio. Si no se dispone de un procesador automático, tomar frascos pequeños con tapa hermética, colocar los alcoholes en ellos y en el que contiene

el alcohol 70° introducir el material. Una vez cumplidos los tiempos, pasar el material de uno a otro frasco con la pinza de puntas finas.

Es muy importante tener en cuenta el solvente a utilizar y las características histológicas de cada material para determinar los tiempos de cada paso, varían según su consistencia, cutinización, edad y ambiente en el que crecieron. Es conveniente confeccionar una planilla tentativa de tiempos y ensayar con los materiales propios (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempos tentativos según el material a incluir.

Pasos	Soluciones	Ápices	Flores	Tallos herbáceos	Hojas
		Tiempo (horas)			
Deshidratación	Alcohol 70°	1	2		
	Alcohol 80°	1	2	24	12-24
	Alcohol 90°	1	2	24	12-24
	Alcohol 96°	1	2	24	12-24
	Alcohol 100°	1/2	2	12	
	Alcohol 100°	1/2	2	12	
Clarificación	Alcohol-disolvente (3-1)	1	2	3	
	Alcohol-disolvente (1-1)	1	2	3	
	Alcohol-disolvente (1-3)	1	2	3	
	Disolvente	1	12		
	Disolvente	1	1/2	2	
Infiltración	Disolvente-medio (3-1)	1	2	6	
	Disolvente-medio (1-1)	1	2	6	
	Disolvente-medio (1-3)	1	2	6	
	Medio de inclusión	3	6	24-48	
	Medio de inclusión	3	6	12-24	

3. Clarificar con disolvente. El alcohol y los medios de inclusión son insolubles entre sí. Por ello, resulta imprescindible el pasaje por un disolvente que puede ser un solvente aromático o no aromático. La impregnación del material por el disolvente de medio de inclusión se cumple cuando el alcohol es totalmente eliminado. Ese momento se reconoce por la transparencia del material, motivo por el cual a esta serie de pasos se los conoce como el de "aclarar el material" o clarificación.

4. Infiltrar el material en el medio de inclusión. Previamente se debe colocar el medio de inclusión a fundir en estufa, aproximadamente a 60 °C. Estos pasos se realizan con el frasco, donde se encuentra el material, destapado dentro de la estufa para mantener el

medio de inclusión líquido. Es conveniente tener, próximo a la estufa, un recipiente para volcar en él las mezclas de disolvente y el medio de inclusión que se van desechando. Se aconseja realizar los cambios del medio de inclusión muy rápidamente para que ésta no se solidifique.

5. Incluir, colocar el material y el medio de inclusión en un molde de inclusión, como se describió anteriormente.

Recomendaciones: es preferible emplear cantidades menores de alcohol y renovarlos una a dos veces en cada uno de los pasos mayores a 6 hs.

El alcohol 70° y los 100° se descartan.

No interrumpir el tratamiento cuando el material esté en alcohol absoluto o en el disolvente porque los tejidos se tornan quebradizos.

Para material leñoso dejar 24 horas en cada uno de los pasos de todo el procedimiento de deshidratación; 6 horas en los de clarificación y 12 horas en los de infiltración.

Técnicas de corte

Mano alzada o mano libre

Sin soporte

1. Colocar una gota de agua sobre un portaobjeto limpio.
2. Ubicar el material según el plano de corte elegido.
3. Sostener el material con una mano y con la otra deslizar perpendicularmente una hoja de afeitar nueva, cortando como si fuera una guillotina, sin serruchar.
4. Realizar varios cortes.
5. Seleccionar los cortes más delgados bajo la lupa.
6. Colocar cubreobjeto limpio.

Con soporte

1. Seccionar un trozo de raíz fresca de zanahoria, de una longitud aproximada de 2 centímetros.
2. Cortar en sentido longitudinal por el centro, dejando la base entera y colocar el material a cortar entre ambos semicilindros.
3. Sostener con una mano y con la otra deslizar perpendicularmente una hoja de afeitar nueva, cortando como si todo fuera una unidad. Es conveniente mantener húmeda la superficie a cortar.
4. Recoger los cortes en vidrio de reloj con agua destilada.
5. Seleccionar los cortes más delgados bajo la lupa.
6. Si no son procesados en el momento, guardarlos en alcohol 70°.

Micrótopo de mano

1. Preparar el material como para cortarlo a mano.
2. Colocar un soporte (trozo de zanahoria) con el material dentro del cilindro del micrótopo.
3. Ajustar y desplazar de modo que su superficie superior coincida con el disco del micrótopo.
4. Cortar deslizando la navaja sobre el disco.

Micrótopo de deslizamiento

1. Preparar el material como para cortarlo a mano libre.
2. Colocar la unidad médula de saúco-material en el soporte correspondiente. Ajustar bien.
3. Colocar la cuchilla elegida previamente asentada y darle un ángulo de inclinación que resulte adecuado.
4. Mover el tornillo de elevación del soporte del material hasta que éste coincida con el filo de la cuchilla.
5. Marcar en la escala graduada en micrones el espesor a que se desea cortar.
6. Deslizar la cuchilla y retirar los cortes con pincel.

7. Colocar los cortes en agua destilada.

Micrótopo de congelación

1. Cortar previamente el material a procesar con hoja de afeitar en trozos pequeños (5-8 milímetros).
2. Embeber un trocito en una solución acuosa de goma arábica con consistencia de jarabe espeso.
3. Congelar sobre la platina del micrótopo una capa de 2-3 mm de este jarabe y luego ubicar el material a cortar.
4. Verter sobre él, muy lentamente, más adhesivo y dejar congelar hasta que forme un bloque suficientemente duro.
5. Marcar en la escala graduada el espesor a que se desea cortar.
6. Colocar la cuchilla previamente asentada.
7. Mover el tornillo de elevación de la platina hasta que coincida el bloque congelado con la cuchilla.
8. Modificar el ángulo de inclinación de la cuchilla si fuera necesario.
9. Cortar, levantando los cortes con pincel y colocarlos en agua destilada.

Micrótopo rotatorio o Minot

1. Colocar el taco de madera con el bloque de parafina previamente tallado en el soporte del micrótopo.
2. Marcar en la escala graduada de 0 a 25 μm el espesor a que se desea cortar.
3. Colocar la cuchilla cuidando que la superficie frontal del bloque de parafina coincida con el filo de la misma en forma paralela.
4. Accionar la manivela para que el bloque de parafina se deslice repetidas veces sobre la cuchilla formando la cinta.
5. Sostener la cinta de parafina con una aguja histológica hasta que alcance una longitud adecuada.
6. Colocar el trozo de cinta de parafina en una caja plana, de fondo oscuro, con la cara brillante hacia abajo (Figura 20).

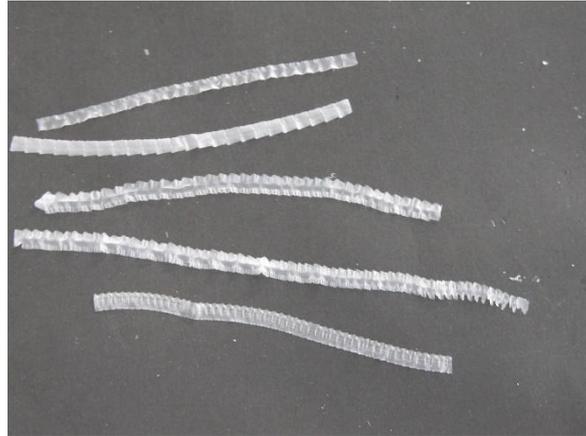


Figura 20. Cintas de parafina.

7. Cortar, con hoja de afeitar, porciones de cinta de un largo apropiado al tamaño del cubreobjetos que se va a utilizar.

8. Adherir al portaobjeto las cintas de material en parafina.

Para ello seguir cualquiera de los procedimientos que se indican a continuación para pegar el material al portaobjeto.

a) Tomar portaobjeto perfectamente limpios, desengrasados con alcohol 96° y extender sobre los mismos una capa delgada de albúmina de Meyer. Encima agregar unas gotas de agua y el trozo elegido de cinta parafina-material con la cara brillante hacia abajo para facilitar la adherencia al portaobjeto. Colocar la preparación sobre la plancha térmica, calentada a 40 °C aproximadamente y agregar unas gotas más de agua. A medida que el agua se calienta, el material y la parafina se irán expandiendo hasta quedar completamente lisos y extendidos. Una vez logrado esto, eliminar el exceso de agua y ubicar los portaobjeto en una caja para guardar preparados en cuyo fondo se habrá colocado previamente un papel de filtro. Esta caja, destapada, se lleva a estufa (35-40 °C) para su secado durante 1 ó 2 días.

b) Pasar los trozos de cinta parafina-material a un cristalizador con agua tibia (aproximadamente 40 °C). Cuando se han expandido, rescatarlos con un portaobjeto limpio, desengrasado y con adhesivo, ayudándose con una aguja histológica. Volcar el exceso de agua inclinando el portaobjeto y colocarlo en una caja como en el caso anterior. Llevar a la estufa.

c) Pasar los trozos de cinta parafina-material a un cristalizador o a un baño térmico con agua tibia (aproximadamente 40 °C) en la que previamente se ha disuelto una cantidad

pequeña de gelatina sin sabor. Una vez que se han expandido, rescatar los cortes con portaobjeto limpios y desengrasados con alcohol 96°, pero sin albúmina de Meyer, ya que la gelatina disuelta actuará como adhesivo. Eliminar el exceso de agua, colocarlos en una caja de preparados y llevar a estufa (35 °C).

9. El siguiente paso es desparafinar y colorear (ejemplo, coloración safranina verde rápido).

Dificultades más comunes que suelen presentarse en la obtención de los cortes hechos con micrótopo Minot:

1. La cinta de parafina no se forma:

- a) La temperatura ambiente es muy baja o la parafina muy dura.
 - i. Use parafina más blanda (de punto de fusión más bajo).
 - ii. Caliente la cuchilla soplando sobre ella, o sumérgala en agua *tibia* (no caliente).
 - iii. Acerque una lámpara de tal modo que la luz y el calor que irradian sean recibidos por la cuchilla y el bloque de parafina.
- b) Incline menos la cuchilla.
- c) Corte secciones más delgadas.
- d) La cuchilla puede estar desafilada.
- e) Sumerja el bloque con el material en parafina más blanda y alise con la espátula de tal modo que quede una capa delgada de parafina en los bordes superior e inferior del bloque.
- f) Desenrolle la sección y sosténgala suavemente contra la cuchilla con un pincel. Si las primeras secciones pueden desenrollarse, es probable que la cinta comience a formarse.

2. Las cintas salen torcidas o curvas

- a) Cuando las secciones no tienen forma normal es porque los lados del bloque de parafina con el material no son paralelos.
- b) El borde del bloque no es paralelo al borde de la cuchilla.
- c) Pruebe a cortar con otra parte de la cuchilla; algunas veces las irregularidades del filo producen cintas curvadas.

3. Secciones comprimidas, arrugadas, encimadas

- a) Cuchilla muy desafilada.

- b) Temperatura ambiente muy alta. Enfríe el bloque y la cuchilla con agua helada inmediatamente antes de cortar o reincluya en una parafina más dura.
- c) La cuchilla está poco inclinada y su borde posterior roza el bloque. Aumente la inclinación de la cuchilla.
- d) Borde de la cuchilla sucia con parafina. Limpie con un algodón embebido en solvente.
- e) Se está cortando muy rápido. Las secciones muy delgadas deben cortarse lentamente.

4. Las secciones se desmenuzan y el material se desgarran

- a) El material está incompletamente deshidratado o no bien clarificado.
- b) Cuando el material está blando y pulposo, la infiltración es incompleta. Reinfiltre e incluya de nuevo.
- c) El alcohol no ha sido desplazado completamente por el clarificante.
- d) El material se dejó demasiado tiempo en el baño de parafina.
- e) El material está duro y quebradizo debido al solvente. Pruebe, solamente si es absolutamente necesario, con tolueno o una mezcla de tolueno y aceite de cedro con suma precaución el tolueno es muy tóxico y altamente inflamable.
- f) Pruebe la inclusión de celoidina o una mezcla de parafina de látex para el material delicado.
- g) Pruebe la deshidratación con dioxano.

5. Cintas rajadas o con raspaduras longitudinales

- a) Debido a las melladuras de la cuchilla. Use otra parte de la cuchilla o afílela.
- b) Inclina menos la cuchilla para que no raspe.
- c) El borde de la cuchilla debe estar sucio (ver 3, d).
- d) El bloque puede tener partículas duras que producen raspaduras.
 - i. Puede estar sucia la parafina. Fúndala y fíltrela o decántela.
 - ii. Presencia de cristales del líquido fijador debido a un lavado insuficiente.

6. La cuchilla golpea y las secciones son raspadas

- a) Cambie la inclinación de la cuchilla. Hay que lograr que el borde, posterior del filo de la cuchilla sea paralelo a la superficie frontal del taco.
- b) El material es demasiado duro.
 - i. Sumérjalo en agua para ablandarlo (ver 12, d).
 - ii. Clarificación no adecuada (ver 4, c).

- c) Use una cuchilla más gruesa o cuneiforme.
- d) El material es muy duro para ser incluido en parafina. Pruebe con celoidina o resinas sintéticas.

7. Las secciones se separan de la cuchilla (levantándose)

- a) Aumente la inclinación de la navaja.
- b) La temperatura ambiente es muy cálida o la parafina muy blanda. Pruebe con parafina más dura, o enfríe el bloque (ver 3, b).
- c) La cuchilla está desafilada.

8. Las secciones se pegan a la cuchilla (ver 3, 4)

- a) Filo de la navaja sucia (ver 3, d).
- b) Aumente la inclinación de la navaja.
- c) Pruebe con una cuchilla de filo más agudo.

9. Ondulaciones en la superficie de las secciones

- a) Revise el ajuste de todos los tornillos, pinzas de la cuchilla y del bloque y cerciórese que el sostén de la cuchilla está sujeto firmemente a la base del micrótopo.
- b) Reduzca una posible inclinación excesiva de la cuchilla para evitar la vibración (ver 6, c, 12).

10. Ruido de raspaduras ante los cortes

- a) El material puede ser muy duro o algunas de sus partes más duras que otras (ver 4, c, d; 5, e).

11. Las secciones "vuelan"

Ello es debido a la electricidad estática producida por la fricción del cortado. Esto ocurre comúnmente en invierno, cuando el aire está más seco.

- a) Aumente la humedad del ambiente hirviendo agua en un recipiente abierto.
- b) Ionice el aire por un método eléctrico.
- c) Sumerja el bloque en parafina blanda, enfríe rápidamente, alise las caras del bloque y corte. La parafina blanda unirá las secciones y evitará la rotura de la cinta.

12. Las secciones varían en grosor o son omitidas

- a) La navaja está poco o demasiado inclinada y el tejido se comprime y se expande produciendo una sección gruesa.
- b) Algunos de los tornillos de la platina o del sostén de la navaja no están bien ajustados.
- c) El mecanismo del micrótopo necesita lubricación o no está bien ajustado.
- d) Bloques muy grandes o bloque con partes duras que hacen saltar el borde de la cuchilla cuando se corta: sumerja el bloque en agua para ablandarlo. Use otros métodos para ablandar el material, por ejemplo: mediante inmersión en glicerina al 50% en estufa (35-40 °C) toda la noche. Este ablandamiento se hará más rápido si se saca la parafina de un lado del bloque para exponer el tejido. La cantidad de agua que absorbe es muy pequeña, pero este proceso a veces hace posible el corte de material duro o resistente.

Técnicas de coloración

Cualquier material ya sea incluido o no puede colorearse, es importante considerar el espesor del corte debido a la velocidad de difusión del colorante.

También es importante controlar que los líquidos del set de coloración (alcoholes, solventes y colorantes) son recuperables y cuales no, de modo que una vez cumplidos los tiempos se vuelven a guardar cada uno en su botella correspondiente.

Materiales no incluidos

Se usan cortes realizados a mano libre, con micrótopo de mano, deslizamiento y congelación.

Una vez realizados los cortes, recogerlos en una cápsula con agua destilada; elegir bajo lupa los mejores y tratarlos con hipoclorito de sodio diluido para su clarificación. Lavar bien varias veces. Se aconseja tener preparado un set con los reactivos y colorantes necesarios antes de empezar la coloración de modo tal que la técnica se reduzca a pasar los materiales de un recipiente a otro, respetando los tiempos. Los cortes pueden ubicarse en el interior de un colador pequeño de malla fina, de cobre o de vidrio perforado, y evitar así el manipuleo individual de cada corte.

Directa: *Safranina*

1. Clarificar los cortes con hipoclorito de sodio al 50% hasta que se observen blancos o casi transparentes (según el material).
2. Lavar varias veces con agua destilada (5-6 veces).
3. Pasar por alcohol 70°.
4. Colorear con safranina diluida al 1% con agua destilada durante 2-5 minutos según el material.
5. Lavar con agua destilada.
6. Montar en gelatina-glicerina.

Resultado: Las paredes secundarias lignificadas se tiñen de rojo intenso y también la cutícula. Los parénquimas toman color rosado.

Combinada sucesiva doble: *Safranina - Verde rápido*

1. Clarificar los cortes con hipoclorito de sodio al 50%.
2. Lavar varias veces con agua destilada (5-6 veces).
3. Pasar por alcohol 70°.
4. Colorear con safranina a saturación en alcohol 80° durante 10 minutos a 24 horas según el material.
5. Realizar un pasaje rápido por alcohol 96°.
6. Colorear con verde rápido a saturación en alcohol 100° durante 30 segundos a 1 minuto.
7. Realizar un pasaje rápido por alcohol 100° (2 cambios).
8. Pasar por solvente (2 cambios).
9. Montar en bálsamo.

Resultado: Los tejidos con paredes secundarias lignificadas se colorean de rojo (algunas veces puede ser oscuro o castaño). Los tejidos con paredes primarias o secundarias no lignificadas se colorean de celeste verdoso.

Combinada sucesiva triple: *Safranina - Cristal violeta y Naranja G.*

Es apta para estudios de xilema y floema porque proporciona un contraste muy marcado entre paredes celulósicas lignificadas y no lignificadas.

1. Pasar los cortes ya clarificados por ácido crómico al 1% (actúa como mordiente) durante 12 horas.
2. Colorear con safranina al 1% en solución acuosa durante 4 a 24 horas.
3. Lavar con agua destilada 3 veces.
4. Colorear con cristal violeta al 1% en solución acuosa durante 10 minutos a 1 hora.
5. Lavar con agua destilada 3 veces.
6. Realizar un pasaje* por alcohol 50°.
7. Efectuar un pasaje* por alcohol 90°.
8. Realizar un pasaje* por alcohol 96°.
9. Efectuar 2 pasajes* por alcohol absoluto.
10. Colorear con Naranja G en solución saturada de aceite de clavo durante 10 segundos.
11. Dejar unos segundos en aceite de clavo.
12. Observar al microscopio, montado en aceite de clavo. Si el color violeta parece suficiente, poner los cortes en solvente, hacer 2 pasajes más en éste y montar en bálsamo.

* Los pasajes por alcohol deben ser rápidos.

Resultado: La safranina colorea de rojo las paredes lignificadas, la cutina y eventualmente los cloroplastos. El violeta de genciana o el cristal violeta colorean las paredes celulósicas no lignificadas de color violeta. El Naranja G colorea el citoplasma de anaranjado.

Combinada simultánea: *Carmín-Verde Mirande*

1. Clarificar los cortes con hipoclorito de sodio al 50% hasta que se observen blancos o casi transparentes (según el material).
2. Lavar varias veces con agua destilada (5-6 veces).
3. Preparar el colorante Carmín-Verde Mirande. Filtrar y colorear durante 15 minutos.
4. Preparar una solución de carbonato de sodio al 2% y pasar los cortes durante 2 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Montar con gelatina-glicerina.

Resultados: Se colorean de verde los tejidos cuyas células tienen paredes secundarias lignificadas y de rosado o violeta aquellos cuyas células tienen paredes primarias celulósicas.

Esta coloración realizada como sucesiva, primero el verde iodo y luego el carmín, es la llamada coloración Verde iodo-Carmín alumbre. En forma sucesiva se logran mejores resultados y mayor intensidad en el color.

Materiales incluidos (para cortes realizados con micrótopo rotatorio)

Coloración directa: *Violeta de Cresilo* (es una coloración *metacromática estable*)

1. Partir de los cortes pegados a los portaobjeto y previamente secados en estufa.
2. Colocarlos en cajas de Koplín (Figura 21) con solvente durante 4-12 horas para desparafinarlos.



Figura 21. Conserveras de Koplín.

3. Cambiar el solvente por otro limpio y dejar actuar 15 minutos.
4. Siempre en la misma caja de Koplín realizar pasajes por alcohol 100°, 95°, 90°, 80°, 70° y 50° dejando actuar durante 2 o 3 minutos en cada uno.
5. Dejar al mismo tiempo en agua destilada.
6. Colorear con Violeta de Cresilo o Azul de Cresilo al 0,5% en solución acuosa durante 1 minuto.
7. Realizar pasajes por alcohol 70, 90, 96 y 100°.
8. Dejar en la caja de Koplín con solvente hasta su montaje, puede que los cortes se despeguen si transcurren más de 12 hs.
9. Montar en bálsamo.

Resultados: Los tejidos que tienen células con paredes primarias no lignificadas se tiñen de rojo violáceo; las células con paredes secundarias lignificadas lo hacen de color verde-azulado.

Combinada sucesiva doble: *Safranina - Verde rápido*

1. Partir de los cortes pegados a los portaobjeto y previamente secados en estufa.
2. Colocarlos en cajas de Koplín con solvente durante 2 horas o el tiempo sugerido según el solvente seleccionado, para desparafinarlos.
3. Cambiar el solvente por otro limpio y dejar actuar 15 minutos.
4. Siempre en la misma caja de Koplín realizar pasajes por alcohol 100°; 96° y 80° dejando actuar 2 o 3 minutos cada uno.
5. Colorear con safranina a saturación en alcohol 80° durante 2 a 24 horas, según el material.
6. Pasar por alcohol 96°.
7. Colorear con verde rápido (Fast-green) durante 30 segundos a 1 minuto.
8. Pasar por alcohol 100° 2 veces.
9. Dejar en solvente hasta el momento de montar.
10. Montar en bálsamo.

Resultados: Los tejidos con paredes secundarias lignificadas se colorean de rojo (-algunas veces puede ser oscuro o castaño). Los tejidos con paredes primarias o secundarias no lignificadas se colorean de celeste verdoso (Figura 22).



Figura 22. Raíz de *Zea mays* “maíz” en corte transversal con endodermis interrumpida por formación de raíz lateral desde el periciclo. Barra equivale a 300 μm .

Combinada sucesiva triple: *Hematoxilina - Safranina - Verde rápido*

1. Partir de los cortes pegados a los portaobjeto y previamente secados en estufa.
2. Colocarlos en cajas de Koplín con solvente durante 30 minutos o el tiempo sugerido según el solvente seleccionado, para desparafinarlos.
3. Cambiar el solvente por otro limpio y dejar actuar 15 minutos.
4. Siempre en la misma caja de Koplín realizar pasajes por alcohol 100°; 90°; 80° y 70° dejando actuar 2 o 3 minutos cada uno.
5. Colorear con hematoxilina con un pasaje y lavar con agua corriente.
6. Dejar en diferenciador 1" o 4" según el material, hasta que los cortes se observan blancos.
7. Pasar por alcohol 70°.
8. Colorear con safranina a saturación en alcohol 80° durante 2 a 24 horas, según el material.
9. Pasar por alcohol 70°; 80° y 90°.
10. Colorear con verde rápido (Fast-green) durante 30 segundos a 1 minuto.
11. Pasar por alcohol 95° y 100° 2 veces.
12. Pasar por solvente 2 veces y montar.

Resultados: Los núcleos se colorean de bordó (Figura 23). Los tejidos con paredes secundarias lignificadas se colorean de rojo. Los tejidos con paredes primarias o secundarias no lignificadas se colorean de celeste verdoso.

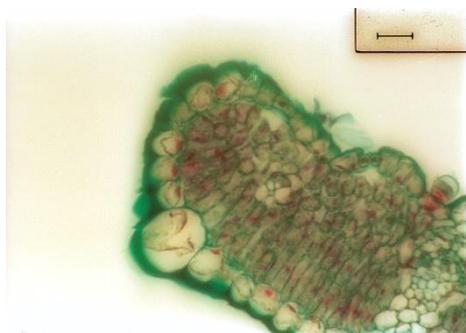


Figura 23. Núcleos de color bordó se observan en células epidérmicas y del clorénquima en el extremo apical de la hoja de *Aloysia citriodora* “cedrón”, en corte transversal y con coloración combinada sucesiva triple. Foto en 40x.

Indirecta: *Hematoxilina férrica de Heidenhain*

1. Partir de los cortes ya pegados a los portaobjeto y secados en la estufa.
2. Colocarlos en cajas de Koplín con solvente durante 2 horas para desparafinarlos.
3. Cambiar el solvente por otro limpio y dejar actuar 15 minutos.
4. Siempre en la misma caja de Koplín realizar pasajes por alcohol 100, 96, 90, 70 y 50°, dejando actuar durante 2 ó 3 minutos en cada uno.
5. Dejar 2 ó 3 minutos en agua destilada.
6. Volcar el agua y agregar la solución " A " (mordiente) dejándola actuar durante 4 horas.
7. Realizar 5 pasajes de 1 minuto cada uno por agua destilada.
8. Teñir con la solución "B" (colorante) durante 4 a 24 horas.
9. Realizar 3 pasajes por agua destilada.
10. Diferenciar con una solución de alumbre férrico al 2% o cloruro férrico al 2%. El tiempo es muy variable dependiendo del grosor de las secciones y del tipo de material.
11. Realizar 3 pasajes por agua destilada.
12. Lavar en agua corriente, bajo canilla abierta, durante 5 minutos.
13. Realizar pasajes sucesivos por la serie ascendente de alcoholes etílicos, partiendo de alcohol 30 hasta 100°.
14. Pasar por solvente.
15. Montar en bálsamo.

Resultado: Paredes celulares violeta oscuro. Núcleos azul oscuro. Se pueden diferenciar bien los cromosomas.

Otras coloraciones

Dependiendo del material y las estructuras o células a observar, los tiempos y cantidades de cada colorante pueden estar sujetos a variaciones, se recomienda realizar pruebas de manera sistemática.

Acetato cúprico. Se emplea en solución acuosa 0,1 % en materiales frescos o desparafinados.

Resultado: detecta cristales de oxalato de calcio, los que se disuelven y el ácido oxálico difunde hacia los espacios intercelulares donde se forman cristales de oxalato cúprico.

Azul de anilina o azul de algodón. Se obtiene una buena solución agregando 1 g de colorante en 100 ml de alcohol 90° o lactofenol.

Dejar actuar unos minutos, lavar el excedente con alcohol 96°, pasar por solvente y montar en bálsamo.

Resultado: Tiñe de azul proteínas, citoplasma, mucílagos y paredes celulósicas; por lo tanto, puede realizarse una coloración sucesiva doble con safranina reemplazando el verde rápido. En coloraciones directas es muy buen colorante para algas. En soluciones muy diluidas, al 0,05% en agua destilada, induce a la fluorescencia de la calosa.

Azul brillante de Cresilo. Se utiliza en solución acuosa al 0,05 % (0,05 gr de Azul de Cresil en 10 ml de agua destilada).

Resultado: colorea celeste claro la cutícula en la epidermis; amarillo verdoso la epidermis; azul claro núcleos y citoplasma; violeta intenso colénquima; rosa violáceo parénquima y floema; celeste turquesa el xilema; azul intenso esclerénquima; verde esmeralda estructuras secretoras y amarillo lípidos.

Azul de metileno. Es uno de los colorantes más usados en bacteriología, sobre todo para bacterias lácteas.

1. Preparar las soluciones:

Solución A: 0,3 gr del colorante en 30 ml de alcohol metílico.

Solución B: 0,01 gr hidróxido de Potasio.

2. Sobre un portaobjeto bien limpio extender una capa delgada de leche o yogur, para el caso de bacterias.

3. Dejar secar al aire.

4. Colorear durante 2 o 3 minutos.

5. Lavar suavemente con agua destilada y observar con objetivo de inmersión.

Resultado: Las bacterias se colorean de azul. Si se emplea en tejidos de plantas superiores sin los pasos 2; 3 y 5), las paredes lignificadas se tiñen de azul o azul verdoso, mientras que las paredes suberificadas y la cutina se tiñen de verde amarillento.

Azul de resorcina-ácido tánico. Es una coloración especial para observación de floema. Las siguientes soluciones deben ser preparadas y filtradas en el momento de usarlas:

Solución A: solución de bicarbonato de sodio.

Solución B: solución saturada de azul de resorcina en alcohol 30°.

Solución acuosa de cloruro férrico al 2%.

Solución acuosa de ácido tánico al 1%.

Solución de bicarbonato de sodio al 1% en alcohol 50°.

1. Partir con los cortes pegados a los portaobjeto y previamente secados en estufa.
2. Colocarlos en cajas de Koplín en solvente durante 2 horas para desparafinarlos.
3. Cambiar el solvente por otro limpio y dejar actuar 15 minutos.
4. Siempre en la misma caja de Koplín realizar un tratamiento de hidratación paulatina dejando actuar durante 5 minutos cada uno de los siguientes reactivos: alcohol 100°; alcohol 96°; alcohol 90°; alcohol 80°; alcohol 70° y dos pasajes por agua destilada.
5. Colocar en ácido tánico al 1% durante 5-10 minutos.
6. Realizar 3 lavados sucesivos con agua destilada.
7. Colocar en cloruro férrico al 2% durante 5 minutos.
8. Lavar 3 veces con agua destilada. En este momento el color de las paredes celulares debe ser gris o gris oscuro.
9. Colocar solución de bicarbonato de sodio al 1% llevada a 25° con alcohol 96° (solución A) y dejar por 30 minutos.
10. Colocar la solución B de azul de resorcina a saturación en alcohol 30° con 3-5 de bicarbonato de sodio al 1% y dejar actuar 12-18 horas. En este momento aparece la máxima tinción.
11. Colocar en solución de bicarbonato de sodio al 1% en alcohol 50° durante algunos minutos (2 o 3).
12. Realizar pasajes sucesivos durante 2 o 3 minutos en: alcohol 70°; alcohol 80°; alcohol 90°; alcohol 96°; alcohol 100°; alcohol 100° y solvente (1 y 1) y solvente puro.
13. Montar en bálsamo.

Resultado: La calosa se tiñe de color azul verdoso. Las paredes celulósicas, núcleos y citoplasma se tiñen de color pardo claro a pardo grisáceo.

Azul de Toluidina. Es una coloración metacromática (no demasiado estable; puede durar varios meses).

1. Clarificar los cortes con hipoclorito de sodio al 50% hasta que se observen blancos o transparentes (según el material).
2. Lavar varias veces con agua destilada (5-6 veces).
3. Colorear en solución acuosa de azul de toluidina al 1% durante 1 minuto y lavar con agua corriente para diferenciar.
4. Pasar por agua acidificada con unas gotas de ácido acético para que la diferenciación sea más rápida.
5. Lavar con agua destilada.
6. Montar con gelatina-glicerina.

Resultado: El ácido péctico y los pectatos se colorean entre rosa y púrpura. Los ácidos nucleicos y grupos fosfatados se colorean de púrpura verdoso. La lignina y los taninos se tiñen de verde, azul verdoso o azul brillante. De acuerdo con esto, las paredes primarias se teñirán de rosa a púrpura debido a su constitución química y las paredes secundarias lignificadas, de azul.

Carmín acético. Disolver 1 gr de carmín en 100 ml de ácido acético 45%, revolver calentando y filtrar.

Resultado: Es una coloración muy usada en citología para teñir cromosomas meióticos, tiñe de rojo la cromatina y el núcleo en general.

Fucsina ácida. Se la emplea en soluciones acuosas.

1. Partir de los cortes adheridos a los portaobjeto y previamente desparafinados e hidratados hasta alcohol 50°.
2. Teñir durante 1 a 5 minutos en una solución de fucsina acida al 1%.
3. Enjuagar en agua durante 30 segundos. Montar en gelatina-glicerina o en bálsamo.
4. Realizar pasajes rápidos por la serie de alcoholes etílicos y solventes, si se desea montar con bálsamo.

Resultado: La mayoría de los componentes celulares toman esta coloración. En tanto que el almidón, los polisacáridos de la pared celular y la lignina generalmente no se colorean. Las mitocondrias, los plastidos y los núcleos se colorean muy intensamente al teñir con la solución tibia. Los plasmodesmos se pueden observar muy coloreados en los cortes suficientemente delgados.

Fucsina básica. Muy usada en citología (ver Reacción de Feulgen).

Hematoxilina acética. Es una coloración empleada en citología.

Hematoxilina de Delafield.

1. Partir de los cortes pegados a los portaobjeto y previamente desparafinados e hidratados hasta alcohol 50°.
2. Teñir durante 10 minutos (o más, según el material).
3. Lavar con agua corriente durante 10 minutos hasta eliminar el exceso de colorante. Tratar con agua acidulada: a 100 ml de agua agregar 2 gotas de ácido clorhídrico hasta que adquieran los cortes un color rosado-púrpura*. Transferir rápido al agua corriente de canilla hasta que su color sea púrpura.
4. Realizar pasajes sucesivos de 3 minutos cada uno por alcohol 50, 70, 90, 96 y 100°.
5. Dejar 3 minutos más en una mezcla de alcohol 100°, solvente en una proporción de 1 a 1 y solvente puro.
6. Montar en bálsamo.

* Si después de lavar en agua la coloración resultó débil, colorear de nuevo hasta que parezca sobreteñido. Luego colocar en agua acidulada que reducirá la coloración rápido, aproximadamente en 10 segundos. Transferir a alcohol 70° y continuar con el proceso.

Resultados: Se obtienen muy buenas coloraciones nucleares. Es ideal para estudiar meristemas apicales.

Hematoxilina de Meyer modificada

1. Partir de los cortes pegados a los portaobjeto, previamente desparafinados e hidratados hasta alcohol 50°.

2. Teñir durante 5 minutos, raramente es necesario llegar a 10 minutos.
3. Lavar en agua corriente de canilla.
4. Pasar por la serie ascendente de alcoholes etílicos, llegar a alcohol 100°, solvente y montar con bálsamo.

Resultado: Las paredes lignificadas se tiñen de color violeta, las paredes suberificadas de rosa violáceo, el núcleo de azul oscuro y el citoplasma de rosa.

Hidróxido de sodio. Se emplea en solución acuosa al 3%. Colorea saponinas.

Ioduro de potasio. Disolver 1 gr de IK en 100 ml de agua destilada y agregar 1 gr de escamas de I. Tiñe almidón.

Naranja G. Diluir 1 gr del colorante en 100 ml de alcohol 95°. Tiñe citoplasma y proteínas.

Rojo Congo. Se lo emplea a veces como un colorante citoplasmático para contrastar con otros colorantes nucleares. También tiñe de rojo intenso las paredes primarias. En citología se usa en soluciones acuosas al 0,5%, y en histología en soluciones saturadas. Es un buen colorante para utilizar después del verde de malaquita o el azul de anilina.

1. Pasar los cortes por agua.
2. Teñir durante 15 minutos.
3. Lavar varias veces con agua destilada.

Rojo neutro. Aplicar directamente sobre la muestra en soluciones diluidas al 0,1% sobre tejidos vivos, especialmente vacuolas. Colorea entre la gama de rosa y rojo.

Rojo rutenio. Si bien se lo considera colorante específico para compuestos pécticos, ocurre como con otros tantos colorantes "específicos" ya que, además, tiñe los núcleos y otros constituyentes citoplasmáticos ricos en ácido ribonucleico.

1. Obtener los cortes incluidos.
2. Preparar la siguiente solución: 1 volumen de ácido clorhídrico y 3 volúmenes de alcohol etílico 96°.
3. Colocar los cortes en dicha solución durante 24 horas.

4. Pasar a amoníaco diluido durante 6 horas.
5. Colorear con rojo de rutenio, solución acuosa al 0,1%, 1 gr del colorante en 10 ml de agua destilada.

Sudán IV. Se emplea en solución alcohólica, disolver 0,09 gr del colorante en 100 ml de alcohol 95°. Tiñe de rojo sustancias grasas, cutina y suberina.

Verde Jano. Es una coloración empleada para la observación de tejidos vivos, porque permite una buena diferenciación de las mitocondrias*. Al igual que el rojo neutro, es una coloración vital; se emplea en soluciones muy diluidas (0,5 g en 100 ml de agua).

1. Colocar sobre el portaobjeto una porción del tejido a observar.
2. Agregar unas gotas del colorante, dejar actuar durante 20 a 30 minutos cuidando que no se seque (de lo contrario, agregar más colorante).
3. Deslizar con cuidado el cubreobjetos y observar.

* Si las mitocondrias no se vieran satisfactoriamente, preparar una solución más concentrada (1 gr en 100 ml de agua).

Resultado: Las paredes celulares se tiñen de verde y las mitocondrias de verde brillante, bien visibles.

Verde de Metilo. Se puede utilizar, al igual que el verde de metileno, para colorear de verde citoplasma y paredes celulósicas. Además, es un buen colorante nuclear. Se emplea en soluciones acuosas al 1% (1 gr del colorante en 100 ml de agua) o alcohólica (1 gr del colorante en 100 ml de alcohol etílico 95°). Colorea rápidamente y jamás sobretiene. No es una coloración que permanezca durante mucho tiempo.

Verde rápido o fast-green. Disolver 1 gr del colorante en 500 ml de alcohol 95°, dejar madurar 24hs y filtrar. Colorea de verde núcleo y citoplasma y de celeste verdoso paredes celulósicas.

Impregnaciones metálicas

Técnica argéntica nuclear en caliente

Preparar una solución de carbonato de plata amoniacal.

1. Colocar los ápices de raíces, previamente fijados con FAA, en agua destilada con algunas gotas de amoníaco durante 1 hora.
2. Lavar 3 veces con abundante agua destilada.
3. Colocar en una caja de Petri la solución de carbonato de plata amoniacal y el material. Agregar 4 gotas de piridina, líquido incoloro e inflamable, por cada 10 ml de solución.
4. Tapar la caja de Petri y colocarla sobre plancha caliente a 50 °C hasta que el material tome color amarillo tostado con la zona apical más oscura. Agitar la solución cada 2 minutos con varilla de vidrio (nunca con elementos metálicos porque precipita la plata).
5. Pasar las raíces con pipeta gotero a otro recipiente con formol al 10% y 3 gotas de piridina. El material toma un color castaño intenso o negro.
6. Pasar el material a alcohol 70° para comenzar el proceso de inclusión en parafina.
7. Cortar con micrótopo rotatorio.
8. Adherir los cortes al portaobjeto.
9. Dejar secar, desparafinar y montar con bálsamo.

Resultado: El núcleo de las células se tiñe de negro por precipitación de sales de plata, mientras que el citoplasma y las paredes se tiñen de amarillo oro.

Cortes realizados con ultramicrotomo

Los tejidos pueden ser teñidos antes o después de ser incluidos y seccionados.

Los principales colorantes usados son el acetato de uranilo y el citrato de plomo. Ambos son radiactivos y por eso se debe trabajar con las debidas precauciones.

Coloración masiva

Para hacer la coloración de todo el bloque antes de incluir se emplea el acetato de uranilo (pm 400) al 2% en agua.

Se deja el material de 2 a 4 horas, en frasco tapado, a temperatura ambiente.

Otros autores prefieren acetato de uranilo al 1% en acetona al 70%, dejando el material entre 30 y 60 minutos.

Coloración de "cortes gruesos" (de 1 μm)

Con el fin de seleccionar determinadas porciones de tejido y obtener de estos cortes. finos y ultrafinos, es necesario previamente lograr cortes gruesos y colorearlos para observarlos al microscopio óptico y de este modo poder orientarse en la búsqueda que interesa (ejemplo un detalle de la pared celular, una mitocondria, etcétera).

1. Partir de los cortes gruesos adheridos a portaobjeto.
2. Preparar una de las soluciones de azul de toluidina.
3. Cubrir los cortes con la solución recientemente filtrada.
4. Calentar suavemente a la llama y dejar unos segundos.
5. Volcar el excedente y lavar con agua empleando piseta o gotero.
6. Secar al aire y observar al microscopio óptico.
7. Si está sobreteñido, quitar el excedente pasándolo rápidamente por alcohol 70, 90 y 100°. Entre cada paso dejar secar al aire para evitar plegamientos.
8. Pasar por solvente y montar con bálsamo.

Coloración de los cortes en las grillas (finos y ultrafinos)

a) Solución de acetato de uranilo o al 2% en agua

La solución se debe filtrar dos veces. Se prepara una caja de Petri, con una base de parafina o cera rosa de uso odontológico. Se coloca una gota del reactivo y dentro de ella la grilla metálica (generalmente se usan de cobre de 3 mm).

Se deja entre 15 y 30 minutos, según el material. Luego se saca la grilla y se lava con agua bidestilada a temperatura ambiente.

Para conseguir mayor contraste, luego se puede teñir con:

b) Citrato de plomo.

Se prepara una caja de Petri con una base de parafina. En un costado se colocan lentejas de hidróxido de sodio (para eliminar el dióxido de carbono y la formación de una película de carbonato de calcio) y en el otro extremo una gota del reactivo.

Se ubica la grilla dentro de la gota, se tapa la caja de Petri y se deja 30 segundos.

Se destapa muy poquito, como para retirar la grilla con una pinza de puntas muy finas, y se lava con agua hervida y fría. Las grillas se dejan secar "de canto" sobre papel absorbente tipo tisú.

Técnicas de montaje

Glicerina – agua destilada

Solución al 50 %. Resulta muy útil tener siempre a mano un frasco gotero con esta preparación para realizar observaciones rápidas mientras se está trabajando.

Tiene la ventaja de no secarse tan pronto como el agua y los preparados pueden guardarse por varios días.

1. Sobre un portaobjeto perfectamente limpio colocar una gota de glicerina-agua destilada.
2. Ubicar sobre ella el material a observar.
3. Deslizar un cubreobjetos pasado por alcohol 70° y seco.
4. Observar.

Gelatina - glicerina

- Gelatina sin sabor 10 gr
- Glicerina 30 ml
- Agua destilada 34 ml
- Cristales de fenol 1,4 gr

1. Disolver la gelatina en el agua destilada en un baño de agua caliente.
2. Agregar la glicerina y el fenol agitando con una varilla de vidrio.
3. Dejar enfriar en un frasco de boca ancha.
4. Descartar la parte superior donde quedan burbujas.

Puede fraccionarse y guardarse, siempre una varilla de vidrio para facilitar su manipulación.

Es un medio soluble en agua. Al momento de usar:

1. Colocar a baño de maría un tubo de ensayo que contenga gelatina-glicerina y una varilla de vidrio.
2. Cuando la gelatina-glicerina esté líquida dejar caer una gota, con la varilla de vidrio, sobre un portaobjeto perfectamente limpio.

3. Ubicar el material sobre la gota ayudándose con la pinza de puntas finas o aguja histológica.
4. Pasar ligeramente por la llama suave para que la gelatina-glicerina se mantenga líquida y evitar así la formación de burbujas.
5. Deslizar suavemente un cubreobjetos limpio y seco. Dejar secar.
6. Quitar el excedente de gelatina-glicerina solidificada que haya quedado en los bordes del cubreobjetos, raspando con un bisturí.
7. Limpiar con tela de algodón humedecida en agua.

Bálsamo de Canadá

Es un medio soluble en xilol (solvente aromático). La desventaja que tiene es que demora en secar (24 hs o más) y tiene una tonalidad amarilla que con el transcurso del tiempo se acentúa (Figura 24).



Figura 24. Preparado permanente montado con bálsamo de Canadá, hoja de *Citrus limón* "limón".

Bálsamos sintéticos

Reemplazan ventajosamente al bálsamo de Canadá debido a que secan rápidamente a temperatura ambiente y son incoloros. Pueden ser solubles en solventes aromáticos o no, es conveniente consultar las recomendaciones del fabricante (ejemplo *DePeX*).

Procedimiento

1. Dejar caer, con varilla de vidrio, una gota de bálsamo sobre un portaobjeto limpio.

2. Ubicar la gota al costado del material a observar.
3. Deslizar el cubreobjetos en ángulo de 45°, previamente humedecido en el solvente compatible para evitar la formación de burbujas.
4. Presionar el cubreobjetos para que el bálsamo se extienda uniformemente y escapen burbujas de aire. Resulta práctico presionar suavemente con una pinza o aguja histológica.
5. Secar a temperatura ambiente o en estufa a 35-40 °C por no menos de 48 horas, según el bálsamo elegido.
6. Una vez seco se raspa con bisturí el excedente de bálsamo, con mucho cuidado, se pasa una gasa humedecida en solvente.

Lactofenol

1. Mezclar

- ácido láctico 10 ml
- glicerina pura 200 ml
- agua destilada 100 ml

2. Disolver

- cristales de fenol 100 gr

Dejar que los cristales se disuelvan antes de usar. Es un medio de montaje para preparados temporarios, puede afectar a muchos colorantes.

Técnicas Específicas de Estudio del Material Vegetal

Epidermis foliar

Las principales aplicaciones del estudio de la epidermis en materiales vegetales son las de resolver problemas taxonómicos, determinar alteraciones histológicas inducidas por diversas enfermedades o por contaminación ambiental, determinar la dieta de herbívoros, establecer las causas de envenenamientos, reconocer adulteraciones y contaminantes, inferir las condiciones ambientales en que vive la planta, etc. Además, a partir de la obtención de epidermis foliares o de sus improntas, se pueden determinar la frecuencia y el índice estomático, los cuales pueden estar influenciados por las condiciones ambientales y nutricionales, ya que en el cuerpo primario de la planta establece el límite con el exterior. A continuación, detallaremos algunas de esas técnicas.

Extracción o "Peeling"

1. Para extraer epidermis se puede proceder de la siguiente manera, dependiendo del material la epidermis se puede extraer:

Se toma la hoja con ambas manos dejando la cara hacia arriba de la epidermis a observar, una de las manos se mantiene firme y la otra desliza la parte de la hoja que sostiene sobre la otra parte de la hoja, desgarrando el material.

Se toma el órgano, se realiza un corte con bisturí, se introduce la punta de la aguja histológica apenas por debajo de la epidermis. Luego se levanta un trozo pequeño y tomándola con la pinza de punta fina se tira hasta desprenderla.

En todos los casos se observa un tejido transparente, unos pocos mm son suficientes.

2. Cortar con un bisturí dicho tejido epidérmico y montar el material sobre un portaobjeto con una gota de agua o glicerina al 50% cuidando que la superficie de la epidermis a observar quede hacia arriba.

3. Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio óptico: si los poros u ostiolas de los estomas se ven negros es porque quedó retenido aire en ellos. En este caso, retirar el cubreobjetos, agregar más glicerina y calentar suavemente a la llama hasta que se

desplacen las burbujas. Si con esto no se logra un buen resultado, pasar la epidermis por alcohol 96°.

Si se desea, se puede continuar con los siguientes pasos para obtener preparados semipermanentes, de lo contrario colocar el cubreobjeto nuevamente.

4. Colorear con safranina diluida durante 5 minutos en el mismo portaobjeto.
5. Volcar el excedente. Enjuagar con agua destilada.
6. Volcar el excedente y agregar una gota de gelatina-glicerina.
7. Deslizar el cubreobjetos. Dejar secar.
8. Sellar los bordes del cubreobjeto, opcional.

Técnica de Jeffrey

Utilizar la mezcla de Jeffrey, partes iguales de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%, diluida con agua destilada al 50%.

1. Colocar en una caja de Petri de vidrio el material cortado en trozos pequeño, 5 mm.
2. Agregar la mezcla de Jeffrey diluida.
3. Tapar y dejar a temperatura ambiente 12 a 48 horas según la textura de la hoja. La solución atacará al mesófilo; cuando se observa que ya no quedan restos de éste, volcar la mezcla y lavar con agua corriente varias veces el material.
4. Colocar el material sobre un portaobjeto con una gota de glicerina al 50%.
5. Cortar con bisturí los bordes del material para poder separar así ambas epidermis ayudándose con pinza y agujas histológicas.
6. Observar al microscopio óptico para asegurarse que ambas epidermis, superior e inferior queden con la superficie externa hacia arriba.

Continuar con los pasos 4 al 8 indicados en la técnica de extracción.

Técnica de Metcalfe o “raspado”

Esta técnica es especialmente recomendada para hojas de Poaceae (Figura 25) o aquellas que suelen ser coriáceas.

1. Colocar sobre un portaobjeto o cápsula de vidrio conteniendo unas gotas de agua, un trozo de hoja con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo.
2. Raspar suavemente la superficie con un bisturí u hoja de afeitarse.

3. Colocar sobre ella gotas de solución de hipoclorito de sodio 10%, dejar actuar 15 minutos.
 4. Raspar nuevamente la epidermis y el mesófilo procediendo con mucha suavidad al acercarse hacia la epidermis próxima al portaobjeto, eliminando la epidermis no deseada y el mesófilo.
 5. Agregar una gota de hipoclorito y con un pincel de escobilla plástica eliminar el resto de mesófilo.
 6. Lavar con un gotero o piseta 5-6 veces con agua destilada, la penúltima vez agregar al agua 2 o 3 gotas de amoníaco y la última con agua destilada.
- Continuar con los pasos 4 al 8 indicados en la técnica de extracción.



Figura 25. Epidermis en vista superficial y coloreada con safranina de *Setaria parviflora* “cola de zorro”. En primer plano se observan células epidérmicas propiamente dichas, silíceas, suberosas y tricomas aglandulares. En segundo plano estomas. Barra equivale a 60 μm .

Técnica de hidróxido de potasio

1. Preparar una solución de hidróxido de potasio al 1% o 3%, dependiendo del grosor de la hoja.
2. Colocar la hoja cortada en trozos pequeños en un vaso de precipitado y agregar la solución hasta cubrir holgadamente el material.
3. Tapar el recipiente y hervir durante 10 a 30 minutos según la textura de la hoja.
4. Lavar bien varias veces con agua destilada.
5. Colocar sobre un portaobjeto un trozo de hoja con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo.

6. Separar con aguja histológica y pincel la epidermis que quedó hacia la parte superior y el mesófilo.

7. Agregar una gota de agua para ayudar a retirar con el pincel los restos de mesófilo.

8. Pasar la epidermis limpia a otro portaobjeto, la epidermis a observar debe quedar hacia arriba.

Continuar con los pasos 4 al 8 indicados en la técnica de extracción.

Técnicas de improntas

Permite la observación y recuento de estomas abiertos y cerrados, se puede realizar en ensayos de campo y laboratorio con la hoja viva (Figura 26). Es una técnica no destructiva.

1. Colocar sobre la epidermis que se estudia una delgada capa de esmalte transparente, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, gelatina-glicerina o goma siliconada. Puede pegar sobre el borde del esmalte una etiqueta autoadhesiva.

2. Dejar secar unos minutos.

3. Levantar el esmalte o la etiqueta con la ayuda de una pinza.

4. Cortar con bisturí la etiqueta y los bordes, cuidando que el molde de la epidermis quede hacia arriba.

5. Montar con glicerina al 50% o con gelatina-glicerina.

Continuar con los pasos 7 y 8 indicados en la técnica de extracción.

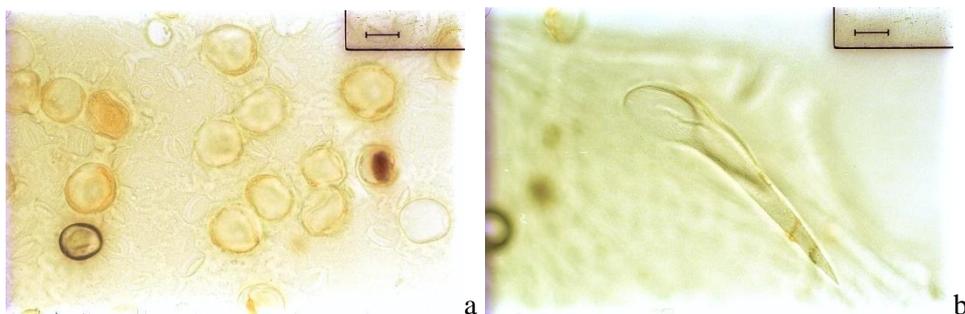


Figura 26. Improntas de hoja *Aloysia citrodora* “cedrón” con tricomas glandulares en cabezuela (a) y tricoma glandular de base bulbosa y extremo aguzado (b). Fotos 40x.

Técnica para epidermis y nervaduras

1. Colocar las hojas frescas o herborizadas en un vaso de precipitado de 100 ml y agregar 75 ml hidróxido de potasio al 1 % o 3 %, dependiendo del grosor de la hoja.
2. Poner en autoclave a la atmósfera de presión correspondiente y por el tiempo que requiera el material. El vaso de precipitado debe cubrirse con tapa de vidrio para evitar proyecciones del líquido.
3. Dejar que baje la presión lentamente antes de sacar el frasco del autoclave, para evitar que por ebullición se destruya el material.
4. Tomar una de las hojas y colocarla en una caja de Petri con una delgada capa de agua, de modo que la epidermis a estudiar quede hacia abajo.
5. Desprender la epidermis que quedó hacia arriba desde el pecíolo hacia el ápice ayudándose con aguja histológica y pinza de puntas finas.
6. Deslizar esta epidermis entera sobre un portaobjeto
Colocar todo en otra caja de Petri con hipoclorito diluido al 50% durante 5 minutos.
7. Lavar bien varias veces y teñir con safranina diluida o con violeta de Cresilo en solución acuosa al 1%, sobre el mismo portaobjeto.
8. Enjuagar y montar con gelatina-glicerina.
9. En la caja de Petri quedó la otra epidermis con la nervadura y el mesófilo adherido. Repetir desde el paso 6, cuidando de dar vuelta la epidermis.
10. La nervadura quedó en la caja de Petri. Presionar con pincel varias veces sobre la superficie hasta desprender el parénquima del mesófilo.
11. Enjuagar para retirar restos celulares que puedan dificultar la observación.
12. Eliminar el agua y agregar hipoclorito de sodio al 50%, dejar actuar 15 minutos.
13. Enjuagar.
14. Colocar la nervadura sobre un portaobjeto sin ningún medio de montaje ya que ésta al secarse quedará adherida.
15. Deslizar el cubreobjetos. Dejar secar.
16. Sellar los bordes del cubreobjetos, opcional.

Nota: cada material requiere una concentración de hidróxido de potasio, con una presión y tiempo óptimo de permanencia en el autoclave. A modo de ejemplo una hoja coriácea de *Laurus nobilis* “laurel” requiere HOK al 15%, presión de autoclave 2 kg/cm por 120

minutos. En tanto que una hoja herbácea de *Tilia cordata* “tilo” necesita HOK al 1%, presión de autoclave 1 kg/cm por 15 minutos.

Cromosomas en mitosis

Técnica aplastamiento o squash de ápices radicales

1. Colocar las raicillas frescas o conservadas en Carnoy I o II por 24 hs.
2. Colocar el material sobre un portaobjeto y agregar unas gotas de solución acuosa de ácido clorhídrico al 45%.
3. Aplastar el material con un bisturí.
4. Colocar el cubreobjeto y calentar a la llama de un mechero.
5. Retirar del mechero y cubrir con un papel de filtro.
6. Aplastar nuevamente, con cuidado que el cubreobjeto no se deslice.
7. Sellar el cubreobjeto al portaobjeto con esmalte y observar.

Técnica combinada para ápices radicales

1. Cortar las raíces en la zona apical, según el material 2 mm o 2 cm de longitud.
2. Aplicar pretratamiento, cuyos tiempos y temperaturas varían según el material. Esto inhibe la síntesis de proteínas lo que impide la formación del huso acromático y determina la detención de los cromosomas en metafase. En todo los casos las temperaturas y tiempos varían según el material.
 - a) Frío, colocar los ápice recién cortados en un tubo de ensayo con agua y sumergir en recipiente con agua y hielo para alcanzar los 0 °C, pasar a heladera 4 °C por 24 a 72 hs.
 - b) 8-hidroxiquinoleína (0,058 gr de 8-Hidroxiquinoleína en 200 ml de agua destilada a 60 °C) y mantenerlas a una temperatura entre 18 y 20 °C durante 3 a 5 horas.
 - c) Paradiclorobenceno (PDB) solución saturada en agua destilada, mantener a 18-20 °C entre 2 y 5 hs.
 - d) Colchicina, 0,02% en agua destilada a 18-20 °C por 1 o 2 hs.

e) Alfa-bromonaftaleno (ABN) en solución saturada, gotas de ABN en agua destilada a 40 °C. la temperatura y el tiempo del tratamiento varía conjuntamente: 18 a 20 hs a 4 °C o 2 o 3 hs a 18- 20 °C. Enjuagar con ácido acético 45%. Guardar en heladera.

3. Fijación, luego del pretratamiento, fijar en Farmer o Carmoy —recién preparado— durante un tiempo variable según el grosor de los ápices: 1 a 2 horas como mínimo y hasta 24 horas si los ápices fueran muy gruesos. Mantener a temperatura entre 18 y 20 °C. Es conveniente hacer 2 ó 3 cambios del fijador. Si fuera necesario suspender la técnica puede hacerse en este punto, pasando el material por alcohol 96°, 90°, 80° y guardarlo en heladera en alcohol 70°.

4. Hidrólisis, colocar el material en ácido clorhídrico 1 N en un baño a 60 °C durante 5 a 8 minutos. De este modo se ablandarán los tejidos, precipitan las proteínas y se destruye el ARN.

5. Cumplido el tiempo, parar la hidrólisis enfriando el tubo bajo agua corriente de la canilla.

6. Volcar el ácido clorhídrico y agregar 2-4 ml de reactivo de Feulgen. Dejar actuar 1 hora como mínimo en oscuridad y a 18-20 °C para que se produzca la tinción del ADN. El reactivo de Feulgen es incoloro, cuando reacciona con el ADN se torna violáceo.

7. Técnica de aplastado (*Squash*)

a) Tomar un portaobjeto limpio y desengrasado, colocar sobre él una gota de ácido acético al 45% o de orceína acética al 45%.

b) Sobre esta gota colocar una raíz y cortar y dejar solo el ápice de color violeta.

c) Deslizar con cuidado el cubreobjetos e iniciar el aplastado con un golpe seco dado con la mina de un lápiz. Continuar con varios golpecitos más realizados con una aguja histológica desde el centro hacia los bordes.

d) Flamear ligeramente y luego colocar el portaobjeto con el cubreobjetos hacia arriba entre papel de filtro y presionar más o menos fuertemente con el pulgar para que el material quede lo más esparcido posible. En estas condiciones ya puede observarse al microscopio.

8. Si se desea obtener un preparado definitivo, separar el cubreobjetos del portaobjeto por congelación (puede ser colocándolo durante 30 minutos en solución de hielo seco o bien 2-4 minutos sobre la platina de un micrótopo de congelado, criostato o criotomo). Completar la separación introduciendo la punta de un bisturí entre porta y cubreobjeto. Sumergir ambos en alcohol 90° y 96° durante 3 minutos, en alcohol 100°, 5 minutos y

luego realizar 2 pasajes por solvente no aromáticos. Montar en bálsamo sintético. Dejar secar a temperatura ambiente 24 h.

Cromosomas en meiosis

Es necesario trabajar con capullos de flores. Si el tamaño de las anteras lo permite, con la ayuda del microscopio estereoscópico o lupa binocular, retirar la epidermis y el tejido parenquimático dejando solo la masa de células esporógenas.

Técnica I de aplastado de anteras

1. Colocar una gota del colorante carmín acético sobre un portaobjeto y romper en ella una o varias anteras.
2. Colocar el cubreobjeto y calentar a la llama de un mechero sin dejar hervir.
3. Tapar con un papel de filtro después de retirar de la llama.
4. Aplastar suavemente el cubreobjeto y el material.
5. Sellar el cubreobjeto.

Los preparados se pueden conservar 1 o 2 días en frasco cubierto internamente con papel de filtro embebido con alcohol 100°. Los portaobjeto se colocan sobre las paredes del frasco con cubreobjeto hacia el centro del mismo. El frasco se tapa para formar una atmósfera saturada de alcohol.

Técnica II de aplastado de anteras

1. Fijar las anteras en Farmer (fijador anhidro para investigaciones citológicas) recién preparado durante 30 minutos a 24 horas en frascos bien tapados.
2. Reemplazar el fijador por alcohol 70° y dejar el tiempo suficiente para que las anteras se hundan. Volcar el alcohol y agregar agua destilada. Dejar 5 minutos.
3. Reemplazar el agua destilada por ácido clorhídrico 1 N y colocarlo en baño de 60°C. Hidrolizar durante 10 minutos en tubos destapados.
4. Coloración, reemplazar el ácido clorhídrico por el reactivo de Feulgen para la coloración. Volver a tapar los tubos y dejarlos en oscuridad durante 1 hora y media.

5. Pasar un cubreobjeto limpio por albúmina de Meyer y flamear muy suavemente.
6. Colocar sobre un portaobjeto una gota de ácido acético al 45% y una antera. Cubrir con el cubreobjetos.
7. Prensar entre papel de filtro para aplastar el material sin hacer movimientos laterales con el cubreobjetos.
8. Calentar, si es posible, muy débilmente con el mechero de alcohol.

Polen

Técnica acetólisis de Erdtman

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

1. Colocar las anteras frescas o herborizadas en un tubo de centrífuga conteniendo ácido acético glacial, centrifugar 3 minutos entre 1.500 - 2.000 rpm.
2. Escurrir el ácido y agregar 5 ml de una mezcla de (agregando gota a gota y en este orden):
 - 9 ml de anhídrido acético
 - 1 ml de ácido sulfúrico

Esta mezcla debe prepararse en el momento de usar.

3. Colocar una varilla de vidrio en el interior del tubo y calentar a baño de María, de ser posible bajo campana para gases, hasta una temperatura de 70 a 80 °C.
4. Retire del baño y lleve a temperatura ambiente.
5. Revuelva con una varilla de vidrio tratado de deshacer las anteras.
6. Centrifugar.
7. Decantar la mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético y agregar 10 ml de agua destilada. Sacudir hasta formar espuma y quitarla luego agregando una gota de alcohol o acetona. Centrifugar.
8. Decantar el agua. Si se desea colorear se agrega safranina al 1% y se deja 30 minutos.
9. Centrifugar y decantar el colorante.
10. Montar en gelatina-glicerina o gelatina de Kisser. Para ello tomar un portaobjeto bien limpio y colocar el material con varilla de vidrio, luego dejar caer una gota de gelatina-

glicerina y el cubreobjetos. Invertir inmediatamente la posición del preparado y dejar secar (con ello se logra que los granos de polen queden más cerca del cubreobjetos y se obtenga mejor visión).

11. El excedente de material que quedó en el tubo se puede guardar en una mezcla de glicerina y agua en partes iguales.

Germinación de polen

Técnica 1

1. Preparar una solución de sacarosa al 10% con agua destilada, y colocar una gota sobre un portaobjeto bien limpio.

2. Sembrar sobre ella los granos de polen.

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

Generalmente, una concentración de azúcar del 10% a 20-30 °C son adecuadas. Si la concentración de azúcar es muy baja, los tubos polínicos estallan poco después de comenzar la germinación. Si la concentración es demasiado alta, los tubos se retuercen y deforman por plasmólisis. Las condiciones óptimas deben determinarse en cada caso particular, ya que el polen de cada especie requiere para germinar diferentes concentraciones de azúcar y temperatura. La concentración de azúcar requerida por el polen de algunas Poaceae puede llegar al 30%.

El ácido bórico al 0,01% estimula la germinación y formación del tubo polínico.

4. Agregar el cubreobjetos. Puede montarse con glicerina al 50% o con gelatina-glicerina.

Técnica 2

1. Colocar en una caja de Petri una solución de sacarosa al 10% y sobre ella cuadraditos de papel celofán transparente de 1 x 1 centímetro. Espolvorear el polen sobre el celofán donde germinará.

2. Montar en un portaobjeto el polen junto con el cuadrado de papel celofán y agregar el cubreobjetos. Puede montarse con glicerina al 50% o con gelatina-glicerina.

Fertilidad del polen

Se puede realizar con polen fresco. Si se utiliza material de herbario se deberá hervir la flor previamente.

1. Espolvorear el polen sobre un portaobjeto con una gota de reactivo de Muntzing (glicerina y carmín acético 1:1, 2 gr de carmín en 100 ml de ácido acético 45%, hervir, enfriar y filtrar) o de azul de algodón en lactofenol (ácido fénico cristalizado 20 gr, ácido láctico 20 gr, glicerina 40 gr, agua destilada 20 ml y azul de algodón 5 gr en lactofenol 100 gr).
2. Coloca el cubreobjetos. Dejar por lo menos 12 horas para dar tiempo a que tome coloración.

Se cuentan entre 500 a 1.000 granos, se calcula granos fértiles con respecto del total (fértiles más estériles). Los granos fértiles tienen aspecto turgente y uniforme, los núcleos y los citoplasmas se tiñen intensamente. Los granos estériles no se colorean o lo hacen muy débilmente. Una fertilidad del 80% es muy buena, en híbridos se alcanza el 40%.

Análisis polínico y de mieles

Los granos de polen contienen características constantes que les otorgan importancia taxonómica a nivel de género: forma, tamaño, características de la exina, número, tipo y posición de ornamentaciones. Ello permite determinar la calidad de la miel y del polen comercial, análisis requeridos por la industria alimenticia por su valor nutritivo y la farmacéutica por sus propiedades terapéuticas y alérgicas.

1. Elaborar una colección de referencia con polen de plantas que se encuentran en el área de estudio o de la que se menciona en la muestra. Para ello se herboriza y determina las plantas colectadas. El polen colectado se monta con gelatina – glicerina o bálsamo sintético.
2. Diluir 10 gr de miel en 50 ml de agua destilada a baño María, entre 60 y 70 °C.
3. Centrifugar de 5 a 10 minutos, varias veces volcando cada vez el sobrenadante.
4. Guardar el material (sedimento) en glicerina.
5. Montar los granos de muestra con el mismo medio del paso 1.
6. Observar los granos de polen de la muestra y compararlos con los de referencia.

Separación de células (maceración)

El proceso se denomina maceración, consiste en disolver la laminilla media, pectinas que unen las paredes celulares, y con ello separar las células que forman los distintos tejidos. Al poder observar las células individualmente se puede apreciar su forma, longitud, conexiones intercelulares y paredes celulares que las caracterizan (Figura 27).

Cuando se utiliza para el estudio de las células del xilema secundario (madera) se recomienda cortar trozos pequeños, tipo virutas como si sacara punta a un lápiz.



Figura 27. Miembro de vaso en macerado de leño de *Ulmus pumila* “olmo”. Barra indica 40 μm .

Técnica de Boodle

Es la técnica más rápida y menos drástica.

1. Colocar en un vaso de precipitado el material y hervirlo con hidróxido de potasio al 10% hasta que se ablande.
2. Lavarlo bien con agua destilada. La solución del lavado se debe descartar en un recipiente para tal fin y no en el drenaje común.
3. Colocar el material así tratado en un tubo de ensayo con ácido crómico al 25% durante 30-60 minutos o más si es necesario.
4. Retirar cuando al pinchar el material tenga consistencia semejante a la manteca.
5. Lavar con agua destilada muy bien varias veces.
6. Colocar el material sobre un portaobjeto, aplastar suavemente con la aguja histológica y agregar una gota del colorante safranina diluida.

7. Escurrir el excedente y montar con gelatina-glicerina.
8. Se conserva en un frasco rotulado con alcohol 50°.

Técnica de Jeffrey

1. Colocar el material en un frasco de vidrio, con tapa y partes iguales de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%.
2. Colocar el frasco tapado en estufa a 40°C si se desea acelerar la reacción. El tiempo varía según los materiales, 6, 12 o 48 horas.
3. Pinchar el material con la aguja histológica y retirarlo cuando haya adquirido una consistencia blanda, pulposa.

Continuar con los pasos 5 al 7 indicados para en la técnica de Boodle, son iguales.

Técnica de Schultze

Este método es el más agresivo, en todo momento se debe trabajar bajo campana extractora de gases, produce desprendimientos de gases tóxicos.

1. Colocar en un vaso de precipitado el material, unos cristales de clorato de potasio y ácido nítrico hasta cubrir.
2. Colocar sobre un mechero con llama suave bajo la campana.
3. Lejos de la llama, cuando el material está de color blanco lechoso interrumpir la reacción agregando agua fría.

Continuar con los pasos 5 al 7 indicados en la técnica de Boodle, son iguales.

Transparentado de tejidos

En ciertos casos puede ser de interés lograr la transparencia del material para realizar estudios de vascularización en hojas y flores o detectar hifas fúngicas en un tejido. Para ello se utilizan reactivos:

- diafanizantes, posibilitan que a través del material tratado pase la luz. Ejemplos: hidrato de cloral y el hidróxido de sodio en solución acuosa.

- clarificantes, eliminan el contenido celular. Ejemplo: hipoclorito de sodio, concentrado o diluido en agua según el grosor del corte y la consistencia del material, o solventes no aromáticos alifáticos.

Hojas y flores

Técnica para nervaduras

1. Poner las hojas en hidróxido de potasio al 5% o 10%, hervir con unas gotas de detergente. El tiempo de ebullición varía según la textura de la hoja.
2. Colocar la hoja en cápsula de Petri o portaobjeto según su tamaño con un poco del líquido y cepillar con un pincel grueso.
3. Poner en lavandina al 5%.
4. Pasarla a ácido acético al 1% o 2%, enjuagar y secar.
5. Colorear con verde rápido o azul de Cresilo diluidos al 1%.
6. Montar con gelatina-glicerina.

Técnica de Foster

1. Si el material es fresco, hervir unos minutos en alcohol 70° para remover la clorofila. Si el material está herborizado, hervir unos minutos en agua.
2. Colocar el material en caja de Petri con una solución de hidróxido de sodio al 3% ó al 5%. Hacerlo a temperatura ambiente si el material es delicado o en estufa a 40°C o 50 °C cuando se trata de hojas coriáceas o muy resistentes.
3. Cambiar el reactivo con frecuencia hasta que no decolore. El proceso puede durar 1; 2 o más días.
4. Dejar una noche en agua destilada.
5. Transferir a hidrato de cloral (5 g en 2 ml de agua destilada) hasta que el material esté bien translúcido: 24 horas o más.
6. Se puede conservar indefinidamente en hidrato de cloral.
7. Para colorear enjuagar previamente con agua destilada.
8. Montar con gelatina-glicerina.

Técnica de Fuchs

1. Colocar el material en alcohol 70° o en FAA durante varios días.
2. Preparar una solución de fucsina básica disuelta en 100 ml de agua hirviendo, a la que se agrega, cuando se enfría, 10 gr de hidróxido de sodio.
3. Colocar el material en la solución en estufa a 60 °C durante 10 a 14 h.
4. Lavar el material durante 12 h cambiando el agua con frecuencia hasta que las células del xilema se tornan de color rojo.
5. Deshidratar el material en alcohol 50°; 70° y 95° durante 12 h.
6. Pasar a alcohol 100° durante 1 o 2 h.
7. Colocar el material en solución de alcohol 100° y ácido clorhídrico concentrado (3-1), durante 1 a 15 minutos, la lignina se pone verde oscura.
8. Lavar por 24 h en alcohol 100°.
9. Realizar 2 pasajes de solvente.
10. Montar con gelatina-glicerina.

Técnica de Dizeo de Strittmater

Se aconseja para hojas que ofrecen mayor resistencia, ejemplo hojas coriáceas:

1. Colocar el material fresco o previamente fijado en un vaso de precipitado con alcohol 96° y llevar a ebullición durante 10 minutos.
2. Pasar a una solución de alcohol 96° e hidróxido de sodio al 5% en partes iguales. Llevar a ebullición durante 5 a 10 minutos, según la consistencia del material.
3. Hacer varios lavados, hasta que el agua corriente quede totalmente limpia.
4. Pasar el material lavado a agua destilada y realizar 2 cambios.
5. Introducir en una solución de hipoclorito de sodio al 50% y dejar hasta que se torne transparente. El tiempo requerido será desde unos pocos minutos a una hora.
6. Pasar a agua destilada y hacer 5 cambios de 3 minutos cada uno.
7. Colocar en hidrato de cloral (5 g en 2 ml de agua destilada) durante 5 a 10 minutos como mínimo, para quitarle opacidad. El material podrá permanecer sin dañarse en esta solución todo el tiempo que transcurra hasta su observación directa o su coloración y montaje definitivo.

Técnica de Bailey y Nast

1. Colocar el material fresco o fijado en solución acuosa de hidróxido de sodio al 3%. Tapar bien para evitar la evaporación y colocar en estufa a 55°C hasta que quede completamente transparente.
2. Lavar haciendo 1 o 2 cambios de agua destilada.
3. Conservar en alcohol 70° en frasco bien tapado hasta su coloración y montaje.

Técnica de coloración

Si se desea colorear el sistema vascular de rojo intenso, la epidermis y parénquima de color rosado, realizar los siguientes pasos:

1. Colocar el material en alcohol 70° durante 10 minutos.
2. Pasarlo a una solución saturada de safranina en alcohol 80° hasta que se observe el xilema completamente teñido de rojo (15 minutos aproximadamente).
3. Quitar el exceso de colorante con alcohol 80° durante 5 minutos.
4. Alcohol 70°, durante 5 a 10 minutos.
5. Alcohol 50°, durante 5 a 10 minutos.
6. Lavar con agua destilada 5 minutos.
7. Montar con una gota de gelatina-glicerina.

Técnica de autofluorescencia

Algunos compuestos vegetales que presentan marcada autofluorescencia (Figura 28).

Ellos son:

- ✓ lignina (verde-amarilla),
- ✓ cutina (amarilla),
- ✓ suberina (naranja-rosa),
- ✓ clorofila (rojo),
- ✓ carotenoides (amarillo) y
- ✓ esporopolenina (amarilla).

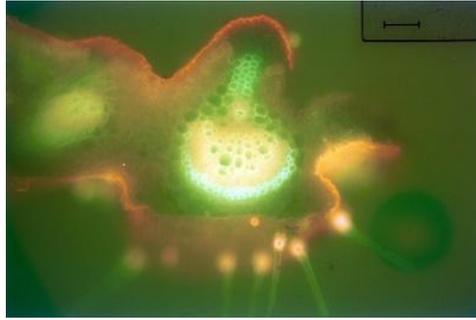


Figura 28. Autofluorescencia en hoja de *Glycine max* “soja”, corte transversal a mano alzada montado en agua.

La clorofila excitada por la luz ultravioleta puede ser usada para mostrar la distribución de los cloroplastos en cortes hechos a mano alzada sobre material fresco.

También, los pequeños cloroplastos de las células oclusivas se vuelven fácilmente localizables. Si el material es adecuado, pueden llegar a verse las granas debido a su intensa fluorescencia roja.

En hojas con estructura Kranz, los cloroplastos del mesófilo radiado presentan un color rojo vivo, mientras que los cloroplastos sin granas de la vaina se ven opacos y de color oscuro.

La fluorescencia de la clorofila palidece más rápidamente en las hojas de algunas especies que en otras, dejando visible la fluorescencia amarilla de los carotenoides.

Para observar la autofluorescencia:

1. Realizar un corte a mano alzada del material a estudiar.
2. Colocar en un buffer alcalino.
3. Montar en portaobjeto con dicho buffer y glicerina (solución salina tamponada).
 - Glicerina 90 ml.
 - Solución salina tamponada 10 ml.
4. Dejar reposar 3 días para eliminar burbujas.
5. Guardar en heladera.

Técnica con fluorocromos

Los fluorocromos son reactivos naturales o artificiales que posibilitan la fluorescencia de algunos tejidos.

1. Cortar el material a mano alzada.
2. Colocar sobre portaobjeto con unas gotas de una solución diluida al 0,01% de
 - ✓ sulfato de berberina de especies de *Berberis*.
 - ✓ sulfato de primulina de especies de *Prímula*.
 - ✓ azul de algodón o azul de anilina, dan fluorescencia amarilla en presencia de calosa.
 - ✓ naranja de acridina, da una fluorescencia metacromática: la lignina flúrese color verde brillante y la pectina lo hace color rojo o rosado.
 - ✓ blanqueador de ropa conocido en el comercio como "extracto de blanco", da fluorescencia blanco azulada para paredes celulares de plantas superiores y algas.
3. Montar en glicerina-buffer (SST). El pH básico acentúa la fluorescencia.

Fragmentos vegetales

La identificación de fragmentos vegetales (hojas, tallos, raíces o flores) se usa, entre otros, para:

- conocer hábitos alimentarios tanto de animales silvestres como domesticados. El material puede provenir de heces, de fístulas (esofágica, o de rumen, estómago o buches) o egagrópila (regurgitado de distintas especies);
- identificar adulterantes o contaminantes en muestras comerciales que puedan contener material vegetal molido o procesado (yerbas compuestas o no, plantas de uso aromático y medicinal).

El análisis se realiza de la siguiente manera:

1. Elaboración de colección de referencia con las partes a identificar (ejemplo epidermis) de plantas que se encuentran en el área de estudio.

Para ello se herboriza y determina las plantas colectadas. Una parte de las muestras se muele en una licuadora o se troza según el método de procesamiento comercial. Ello a fin de lograr fragmentos similares a los que se encuentran en la muestra a identificar. Para el estudio anatómico se diafaniza con la técnica de Dizeo de Strittmater o aclarado con hipoclorito de sodio. Luego se puede colorear con safranina al 50%.

2. Identificación de fragmentos vegetales en la muestra.

La muestra representativa se conserva en FAA o se seca en estufa a 60 °C, se separan los tejidos epidérmicos de los no epidérmicos y se eliminan restos de clorofila. Para ello el

material se diafaniza con hipoclorito de sodio y se filtra para eliminar fragmentos que por su tamaño no pueden ser identificados o resto de otros materiales (ejemplo tierra o arena). El material recolectado se monta de forma permanente o temporaria.

3. Cuantificación por especie, requiere de la observación de por lo menos 20 campos de microscopio por preparado.

Ectomicorrizas

Por las características de la interacción, las hifas de los hongos se observan sobre la epidermis de la raíz.

1. Colectar cuando se activa el metabolismo vegetal y el crecimiento de las raíces, preferentemente después de una lluvia. Se pueden conservar en la heladera en bolsa de nylon cerrada por un corto período de tiempo.

2. Lavar las raíces en un tamiz para retener los ápices radicales.

3. Identificar distintos morfotipos de ápices bajo la lupa (hifas emanantes, rizomorfos o haces de hifas, cambios de color, ramificaciones).

4. Procesar para microscopía óptica:

a) Peladura, cortar la zona próxima al ápice, pelar la raíz con la pinza retirando la epidermis y colocar en porta objetivo una porción hacia arriba y otra hacia abajo. Colorear con azul de anilina al 0,1%. Se pueden realizar preparados frescos, semipermanentes o permanentes.

b) Aplastado, colocar el ápice radical entre porta y cubreobjeto y presionar suavemente, puede ser con una goma, hasta aplastar la raíz, montar con agua - glicerina y observar.

c) Tratar el ápice con las técnicas usadas para obtener preparados permanentes de raíz.

Endomicorrizas

En este caso el sistema radical no presenta indicios del hongo en el momento de la recolección.

Técnica 1

1. Lavar la muestra de raíz cuidadosamente con agua corriente. Este material puede conservarse en la heladera por un corto periodo de tiempo (aproximadamente 24 h en agua).
2. Transferir el material a un tubo de ensayo etiquetado, conteniendo una solución de hidróxido de potasio al 10% en baño de agua a 90°C, para su clarificación durante 30 minutos bajo campana extractora de gases. Cuando el material pierde rigidez y toma color amarillo, está listo. Las raíces de color marrón oscuro pueden clarificarse antes con peróxido de hidrógeno.
3. Escurrir en un colador y lavar con agua corriente.
4. Acidificar las raíces por inmersión en ácido clorhídrico 10% durante 30 minutos. Cuando el material toma un color blanco está listo.
5. Escurrir en un colador y lavar con agua corriente.
6. Transferir a una placa de petri y colorear durante 10 minutos en una solución con azul de metileno, azul de tripan, azul de anilina o negro chlorazol E en lactofenol.
7. Escurrir en un colador y lavar con agua corriente.
8. Diafanizar con glicerol 50% y agua.
9. Montar las raíces con lactofenol, si su finalidad es realizar preparados permanentes. Si la visualización es inmediata, montar entre porta y cubreobjetos.

Nota: Los tiempos de coloración pueden variar (entre 10 y 30 minutos), dependiendo del material a analizar. En la zona de la corteza se pueden observar hifas, vesículas y arbuscúlos (Figura 29).

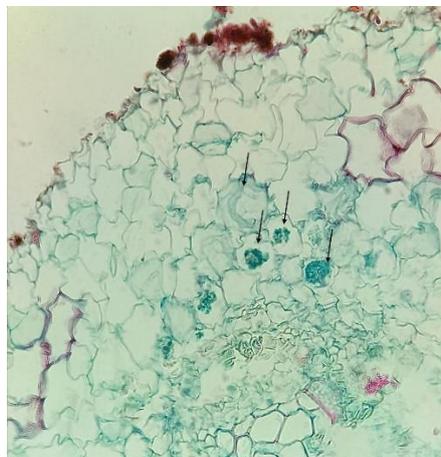


Figura 29. Arbúsculos e hifa en raíz de *Tagetes minuta* “chinchilla”.

Técnica 2

1. Lavar la muestra de raíz y transferir a un tubo de ensayo etiquetado.
2. Clarificar con solución de hidróxido de potasio al 10% en baño de agua a 90°C, usar campana extractora de gases. Cuando el material pierde rigidez y toma color amarillo, está listo. Las raíces de color marrón oscuro pueden clarificarse antes con peróxido de hidrógeno.
3. Escurrir en un colador y lavar con agua corriente.
4. Acidificar las raíces por inmersión en agua oxigenada o ácido clorhídrico al 10%. Cuando el material toma un color blanco está listo.
5. Colorear durante 10-30 minutos con fucsina ácida al 0,01% en un baño de agua a 90°C, usar campana extractora de gases.
6. Escurrir en un colador y lavar con agua corriente.
7. Diafanizar con ácido láctico, glicerol y agua (14:1:1) y lavar con agua. A veces es necesario dejar durante una noche o más antes de lavar.
8. Montar las raíces con la solución de ácido láctico, glicerol y agua (14:1:1).

Ablandamiento de maderas

1. Realizar cortes transversales o longitudinales (radiales o tangenciales) de los trozos que se van a procesar, dejando cubos de 1 cm de lado aproximadamente.
2. Colocar los cubos en un vaso de precipitado con unas gotas de detergente.
3. Hervirlos durante 12 horas como mínimo. Es conveniente retirar los cubos cada 4 horas sumergirlos en agua fría durante unos minutos, luego volverlos al vaso de precipitado y continuar hirviendo. El procedimiento termina cuando el cubo se ubica en el fondo del recipiente, indicación de que perdió todo el aire y el proceso de ablandamiento concluyó. Si son maderas muy duras continuar con el procedimiento durante varios días hasta que sea posible realizar fácilmente un corte a mano libre con hoja de afeitar o bisturí. Si no es posible obtener cortes colocarlos cubos en una mezcla de glicerina y alcohol 96° y dejarlos en frasco tapado por 3 meses o más.
4. Posicionar el material según el plano de corte en un xilótomo, micrótomo específico para estos materiales. Los cortes varían entre 20 y 60 μ de espesor y se conservan alcohol al 50%.

5. Colorear los cortes con safranina en solución alcohólica en una placa de petri, el tiempo inmersión en la solución puede variar de minutos a 2 horas.
6. Deshidratar con alcohol 80°; 90°; 100° y 2 pasajes de solvente, 5 minutos por cada alcohol.
7. Montar con bálsamo sintéticos, se recomienda ubicar los tres planos de corte en el mismo portaobjeto (Figura 30).

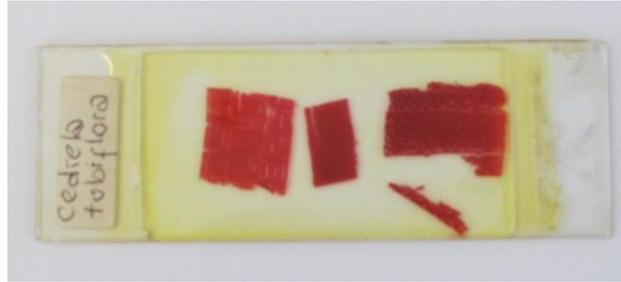


Figura 30. Tres planos de corte de xilema secundario de tallo *Cedrela tubiflora* “cedro misionero”, corte, coloreados con safranina y montados con bálsamo de Canadá.

Ablandamiento de frutos secos y semillas

Antes de comenzar la deshidratación realizar uno de los siguientes pasos, colocar el material en:

- ácido pícrico concentrado, durante 1-2 meses.
- alcohol butílico, durante 1-2 meses.
- agua con gotas de ácido clorhídrico concentrado, durante 24 horas.
- Hervir el material varias horas con unas gotas de detergente.

Luego deshidratar, incluir en parafina, comenzar a cortar y después de realizados los primeros cortes retirar el bloque del micrótomo y sumergirlo en una mezcla de agua y glicerina (2:1) durante 2 a 5 días en estufa a 35-40°C. Si el material es muy duro emplear una mezcla de ácido acético y alcohol 60° durante los mismos días y a igual temperatura. Retirar de la estufa, dejar unas horas a temperatura ambiente y continuar cortando.

Técnicas para Pruebas Histoquímicas

Muchas pruebas histoquímicas son indispensables aún para estudios elementales, ejemplo para detectar grasas o almidón, en determinados tejidos. Las siguientes son las más utilizadas.

Para detectar *almidón*: reactivo de *lugol*.

1. Colocar el material fresco a analizar cortado a mano alzada sobre un portaobjeto.
2. Agregar una gota de lugol.
3. El almidón se colorea de azul o azul-violáceo.

Para detectar *grasas y aceites*: *sudán III* o *sudán IV*.

1. Colocar el material en cortes delgados sobre un portaobjeto.
2. Agregar la solución.
3. Dejar actuar durante 10 minutos.
4. Lavar rápidamente con alcohol 70°. Las grasas y los aceites se tiñen de rojo; además de la cutina y suberina.

Para detectar *polisacáridos*: prueba de ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS).

1. Desparafinar los cortes tratándolos con solvente puro, solvente y alcohol 100° (1-1), alcohol 96°; 70°; 50°, cada paso dejar de 10 a 15 minutos.
2. Colocar los cortes en la solución acuosa de ácido peryódico durante 5 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Lavar con agua destilada.
5. Acomodar los portaobjeto en una superficie plana y cubrir con reactivo de Schiff.
6. Colocar una caja invertida sobre los portaobjeto para generar oscuridad. Dejar actuar el reactivo unos minutos y desechar el sobrante.
7. Realizar tres baños sulfurosos consecutivos. El primero se agita suavemente y se quita, los otros dos se dejan actuar 5 minutos cada uno.
8. Deshidratar el material nuevamente: alcohol 50°; 70°, 96° y 100°, alcohol 100° y solvente (1-1), solvente puro. Cada paso 10 minutos.
9. Montar.

Nota: la reacción PAS positiva produce una coloración rojo intenso o magenta (Figura 31).

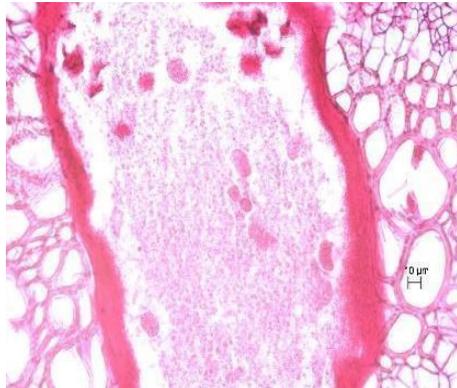


Figura 31. Pared celular PAS positiva de la célula gigante en raíz de *Tagetes minuta* “chinchilla” parasitada con *Meloidogyne incognita* “nematodo de la agalla”.

Para detectar *proteínas*: reactivo de *Millon*

1. Ubicar el material sobre un portaobjeto.
2. Secar con papel de filtro todo exceso de agua.
3. Agregar reactivo suficiente para cubrir el material.
4. Calentar con llama suave. Las proteínas que contienen tirosina, toman un color rojo ladrillo o rosado.

Para detectar *quitina*: *lugol* y *cloruro de zinc*.

1. Colocar el material sobre un portaobjeto.
2. Tratar con lugol durante unos minutos.
3. Agregar una gota de solución saturada de cloruro de cinc.
4. Lavar bien con agua. La quitina toma una coloración violeta.

Nota: también PAS positiva.

Para detectar *taninos*: *cloruro férrico al 10 %* y *carbonato de sodio*.

1. Colocar los cortes de material fresco sobre un portaobjeto.
2. Agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10% con una pequeña cantidad de carbonato de sodio.
3. Dejar actuar 2-3 minutos.

4. Lavar con agua destilada. Una coloración azul-verdosa indica la presencia de taninos.

* Otra alternativa para detectar taninos es colocar los cortes en una solución de formol al 10% en la que se ha disuelto 2 g de sulfato férrico. Si hay taninos se observa una coloración azul oscura.

Para detectar *saponinas*: *ácido sulfúrico concentrado*

1. Colocar los cortes de material fresco sobre un portaobjeto.
2. Agregar la gota de ácido sulfúrico concentrado. El corte tomará primeramente color amarillo, a los 30 minutos cambiará a rojo y finalmente a violeta o azul-verdoso. Esta secuencia indica la presencia de saponinas.

Para detectar *oxalato de calcio*: *acetato cúprico*,

1. Colocar los cortes sobre un portaobjeto.
2. Agregar unas gotas de solución saturada de acetato cúprico.
3. Si hay cristales de oxalato de calcio se disolverán y el ácido oxálico se difundirá hacia los espacios intercelulares donde se formarán cristales de oxalato cúprico.

Para detectar *mucílagos*:

No hay ninguna prueba que sea lo suficientemente satisfactoria para detectarlos ya que los mucílagos incluyen una cantidad de sustancias químicamente distintas, pero son de fácil reconocimiento en cortes de materiales frescos por su carácter viscoso y tratados con Azul de Cresil al 1% dan una coloración azul Francia.

Para detectar *sustancias pépticas*: *rojo de rutenio* al 0,1%.

Colocar las secciones en una solución muy diluida de rojo de rutenio hasta que las paredes se tiñen de rojo. En ese momento se observarán y se verán las sustancias pépticas coloreadas de rosa (o rojo menos intenso que en las paredes).

Reactivos y Formulaciones

- ❖ *Acetato cúprico*. Se lo emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Acetato de uranilo*. Se lo emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Acetona*. Se la emplea pura o en diluciones acuosas.
- ❖ *Ácido acético glacial*. Se lo expende en botellas de 1 litro. Se emplea puro o en soluciones acuosas.
- ❖ *Ácido bórico*. Se expende en polvo. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Ácido clorhídrico*. Se expende en botellas de 1 litro. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Ácido clorhídrico 1 N*.
 - Para densidad 1,12 tomar 128 ml de ácido y llevar a 1.000 ml con agua destilada.
 - Para densidad 1,16 tomar 102 ml de ácido y llevar a 1.000 ml con agua destilada.
 - Para densidad 1,18 tomar 90 ml de ácido y llevar a 1.000 ml con agua destilada.
 - Para densidad 1,19 tomar 82 ml de ácido y llevar a 1.000 ml con agua destilada.
- ❖ *Ácido crómico*. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Ácido fluorhídrico*. Se emplea en soluciones acuosas (al 10%) para eliminar sílice (por ejemplo, en hojas de poaceas).
- ❖ *Ácido nítrico*. Se emplea en soluciones acuosas o puro.
- ❖ *Ácido peryódico*.
 - Peryódico 5 gr
 - Agua destilada 100 ml
- ❖ *Ácido sulfúrico*. Se emplea concentrado (para detectar saponinas) o en soluciones acuosas.
- ❖ *Ácido tánico*. Se lo emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Agua*. Salvo indicación específica contraria, siempre debe utilizarse agua destilada.
- ❖ *Agua acidificada*. Agua destilada a la que se le agrega unas gotas de ácido acético.
- ❖ *Albúmina de Meyer*. Batir una clara de huevo a punto nieve. Filtrar. Agregar igual volumen de glicerina y 1 gramo de timol o salicilato de sodio (para evitar que se formen hongos). Mezclar bien con varilla de vidrio y guardar en frascos color caramelo.
- ❖ *Alumbre*. Sulfato doble de fórmula general, potasio, sodio o amonio y aluminio, hierro o cromo (SO₄)₂ 12 H₂O.

- ❖ *Amoníaco*. Se emplea en diluciones acuosas.
- ❖ *Azul de algodón*. Se lo emplea en soluciones acuosas muy diluidas (ejemplo, al 0,01 para trabajar con fluorescencia).
- ❖ *Azul de algodón en lactofenol*. Disolver 5 g de azul de algodón en 100 ml de lactofenol.
- ❖ *Azul de anilina*. Se emplea en soluciones acuosas o alcohólicas. Solución alcohólica: disolver 1 g de azul de anilina en 100 ml de alcohol etílico 85°. Para fluorescencia en soluciones acuosas muy diluidas, al 0,01%.
- ❖ *Azul de anilina en ácido láctico*. Disolver 0.25 g de azul de anilina en 25 ml de agua destilada y 475 ml de ácido láctico. Se usa para tinción de endófitos de raíz.
- ❖ *Azul de metilo*. Puede reemplazar al azul de anilina.
- ❖ *Azul de metileno (Lófler)*. Según modificación del Comité de Bacteriólogos Americanos.
 - *Solución A*: azul de metileno 0,3 g, alcohol metílico 30 ml.
 - *Solución B*: hidróxido de potasio 0,01 g en 100 ml de agua. Mezclar ambas soluciones.
- ❖ *Azul de resorcina*. Técnica de coloración para observación de floema: solución "B ". Preparar una solución a saturación en alcohol 30° (aproximadamente 5 g en 100 ml) y agregar 3-5 ml de bicarbonato de sodio al 1%.
- ❖ *Azul de toluidina*. Se emplea en soluciones acuosas.
Solución para colorear "cortes gruesos" de material incluido en resinas:
 - Azul de toluidina 0,1 g
 - Carbonato de sodio 2,5g
 - Agua destilada hasta 100 ml
 Disolver primero el carbonato de sodio en una parte de agua destilada, luego agregar el azul de toluidina y completar a 100 ml con agua destilada. El pH debe ser de 11 u 11,1. En algunos casos resulta más efectivo preparar una solución de azul de toluidina al 0,2%; otra de carbonato de sodio al 2,5% y mezclar partes iguales en el momento de usar.
- ❖ *Bálsamo de Canadá*. Hay dos tipos: natural y artificial. Se aconseja el natural que se extrae de *Abies balsamea* y *Abies canadiensis* pues no se pone amarillento con el tiempo.
- ❖ *Baños sulfurosos*.
 - Agua destilada 100 ml

- Metasulfito de Na 0,6 gr
- CIH al 10% 5 ml
- ❖ *Benzol*. Puede reemplazar al xileno, aunque no es tan efectivo como éste último.
- ❖ *Bicarbonato de sodio*. Se lo emplea en soluciones acuosas o en soluciones alcohólicas. Solución alcohólica: diluir al 1% en alcohol 50°.
- ❖ *Bicarbonato de sodio*. Técnica de coloración para observación de floema "solución A".

Preparar una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 1% y agregar alcohol 96° (trabajar con alcoholímetro) hasta obtener una concentración de alcohol de 25°.

- ❖ *Bicromato de potasio*. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Calcofluor*. Blanqueador de ropa, comercialmente conocido como "extracto de blanco". Se lo emplea en soluciones acuosas muy diluidas, ejemplo: 0,01% para fluorescencia.
- ❖ *Carbonato de plata amoniacal*. Mezclar nitrato de plata al 10% y carbonato de calcio al 10%. Se obtiene un precipitado amarillo lechoso que se disuelve agregando amoníaco gota a gota hasta que quede trasparente. Se mide el volumen en una probeta y se lleva al doble con agua destilada. Se debe preparar en el momento de usarlo y guardarlo en frasco oscuro.
- ❖ *Carbonato de sodio*. Se emplea en solución acuosa (al 2% como mordiente).
- ❖ *Carmín*.
- ❖ *Carmín acético*.
 - Ácido acético 45 ml
 - Agua destilada 55 ml
 - Carmín 0,1 g

Calentar durante 60 minutos en balón de destilación con refrigerante a reflujo. Filtrar y guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente.

- ❖ *Carmín alumbre*. Preparar una solución saturada de alumbre de potasio en agua (aproximadamente 4 g de alumbre de potasio en 100 ml de agua destilada). Agregar 1 g de carmín. Hervir a fuego lento durante 15 a 20 minutos, filtrar y agregar un cristal de ácido fénico.
- ❖ *Carmín propiónico*. Se prepara igual que el carmín acético reemplazando el ácido acético por el ácido propiónico.

- ❖ *Carmín-Verde Mirande*. A 10 ml de solución saturada de carmín alumbre agregar 1 ml de solución de Verde Iodo al 75%.
- ❖ *Carnoy I*.
 - Alcohol etílico 96° 75 ml.
 - Ácido acético glacial 25 ml.
- ❖ *Carnoy II*.
 - Alcohol etílico 96° 60 ml.
 - Ácido acético glacial 10 ml.
 - Cloroformo 30 ml.
- ❖ *Caufield*. Se emplea como fijador:
 - Solución madre de tetróxido de osmio al 2% 2,5 ml
 - Solución madre de buffer veronal-acetato 1 ml
 - Ácido clorhídrico 0,1 N 1 ml
 - Sacarosa 0,22 g
 - Agua destilada 0,5 ml
- ❖ *Citrato de plomo*. También llamada *Solución de Reynolds*.
 - *Solución A*: colocar 1,33 g de nitrato de plomo en una probeta de 25 ml y completar a 15 ml con agua bidestilada. Tapar y agitar.
 - *Solución B*: colocar 1,76 g de citrato de sodio en una probeta de 25 ml y completar a 15 ml con agua bidestilada.

Mezclar ambas soluciones (A y B). Agitar. Se formará una solución lechosa y grumosa; se debe agitar fuertemente para obtener una solución blanca.

Agregar 8 ml de hidróxido de sodio (1 g en 25 ml) hasta que se convierta nuevamente en una solución incolora y transparente. Dejar actuar medio minuto sobre la grilla.

- ❖ *Clorato de potasio*. Se lo emplea puro en cristales.
- ❖ *Clorioduro de zinc*:
 - Cloruro de cinc 30 g.
 - Ioduro de potasio 5 g.
 - Iodo 0,9 g.
 - Agua destilada 15 ml.
- ❖ *Cloruro de bario*. Se lo emplea en soluciones acuosas (como mordiente al 2%).
- ❖ *Cloruro de zinc*. Se emplea en solución acuosa saturada.
- ❖ *Cloruro férrico*. Se emplea en soluciones acuosas.

❖ *Craf III:*

- *Solución A*

Ácido crómico sólido 1 g

Ácido acético glacial 7 ml

Agua destilada 92 ml

- *Solución B*

Formol al 40% 30 ml

Agua destilada 70 ml

Mezclar las dos soluciones en partes iguales antes de usar.

❖ *Cristal violeta.* Se emplea en soluciones acuosas.

❖ *Cromato de amonio.* Se emplea en soluciones acuosas, como mordiente al 4%.

❖ *DePeX.* Es una mezcla de Diftene 80, ftalato de butilo y xilol. Se usa para montaje como pegamento. Presenta gran ventaja sobre otros medios de montaje debido a que es incolora, de rápido secado (5-10 minutos) y fácil limpieza. Los restos que exceden del cubreobjetos se retiran con una pinza cortando y desprendiendo una delgada película.

❖ *Diferenciador.*

✓ Agua destilada 500 ml

✓ Alumbre de Fe 7,5 gr, se disuelve en 250 ml del agua destilada calentándolo en mechero sin llama directa, cuando está frío se agrega el resto del agua y

✓ SO_4H_2 0,3 ml

✓ Ácido acético glacial 2,5 ml, filtrar y guardar.

❖ *Euparal.* Medio de montaje empleado en citología, aunque en la actualidad ha sido reemplazado por DePeX.

❖ *FAA:*

- Alcohol etílico 96° 50 ml

- Formol 10 ml

- Ácido acético glacial 5 ml

- Agua destilada 35 ml

❖ *Fast - green.* Ver Verde rápido.

❖ *Floroglucina.* Se emplea en soluciones alcohólicas para detectar lignina se prepara al 1% en alcohol 96°.

- ❖ *Formaldehído*. Comúnmente llamado formol o formalina. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Fucsina ácida*. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Fucsina básica*:
 - Fucsina básica 1 g
 - Alcohol 96° 100 ml
 - Agua destilada 100 ml
- ❖ *Fucsina básica* (para la *Reacción de Feulgen*). Disolver 2 g de fucsina básica en 400 ml de agua destilada hirviendo. Dejar enfriar y pasar a un frasco color caramelo. Agregar 60 ml de ácido clorhídrico 1 N e inmediatamente poner 6 g de metabisulfito. Dejar 24 horas en oscuridad. Agregar carbón activado. Agitar y filtrar con papel de filtro doble.

Si se dispone de un agitador magnético, se puede preparar el reactivo a temperatura ambiente agitando durante 2 horas:

- Fucsina 1 g
- Metabisulfito 1,9 g
- Ácido clorhídrico 0,1 N 100 ml

En un recipiente con tapa. Una vez cumplido el tiempo agregar 2 g de carbón activado, dejar reposar y filtrar con papel de filtro doble.

- ❖ *Gelatina – glicerina o gelatina de Kisser*:
 - Gelatina sin sabor (grado alimenticio) 50 g
 - Agua destilada 170 ml
 - Glicerina 150 ml
 - Cristales de fenol 7 g

Disolver la gelatina a baño de María en el agua destilada agitando con varilla de vidrio. Agregar la glicerina y los cristales de fenol. Colocar en frascos de boca ancha y dejarlos destapados. La mezcla se solidifica al enfriarse y las burbujas de aire subirán a la superficie. Si quedaron muchas burbujas, conviene desechar la porción superior y luego volver a fundir, a baño de María, para fraccionar en tubos de ensayo. En cada tubo de ensayo dejar una varilla de vidrio permanente.

- ❖ *Glicerina - agua*. Se emplea en solución al 50%.
- ❖ *Glutaraldehído*. Es una droga de alto riesgo, irritante, tóxica y cancerígena. Se emplea como fijador con soluciones buffer.

❖ *Goma arábica*. Se extrae de la *Acacia senegal* y otras especies afines.

Disolver 50 g de goma arábica en 200 ml de agua fría. Tarda en disolverse. Si fuera necesario entibiar hasta la disolución completa.

❖ *Hematoxilina*. Se emplea como colorante para núcleos.

❖ *Hematoxilina acética*. Se emplea para recuento de cromosomas meióticos.

- Hematoxilina. 1 g
- Ácido acético 45 ml
- Agua destilada 55 ml

Se mezclan y se deja aproximadamente 20 días antes de usarla para que madure. Si se necesita el uso de mordiente, se emplean unos cristales de citrato férrico disueltos en ácido acético al 45%. Calentar y filtrar.

❖ *Hematoxilina de Delafield*. Prepara 100 ml de una solución acuosa saturada de alumbre amoniacal (sulfato de amonio y aluminio); añadir gota a gota una solución de 4 g de hematoxilina en 25 ml de alcohol etílico 96°. Puede agregarse 25 ml de glicerina y 25 ml de alcohol metílico; filtrar a las 5 horas de haberlo agregado (esta adición hace que precipiten pequeños cristales de alumbre amoniacal).

Esta solución debe ser expuesta a la luz y en botella destapada durante dos meses como mínimo, hasta que su color sea oscuro. Es la solución madre. Para realizar las coloraciones diluir el volumen que se tome con un volumen igual de agua destilada. Filtrar antes de usar. Si resultara aún muy concentrada, diluir en la proporción de 1 gota de colorante en 5 gotas de agua destilada. Luego de unos meses pierde su capacidad óptima de tinción.

❖ *Hematoxilina férrica de Heidenhain*

- *Solución A*: preparar una solución acuosa de alumbre de hierro al 3% para que actúe como mordiente. Usar en el momento.
- *Solución B*: preparar una solución acuosa de hematoxilina al 0,5%. Los cristales de hematoxilina pueden tardar varios días hasta disolverse en el agua. Durante este tiempo es conveniente agitar el recipiente. Dejar madurar durante 1 mes antes de usarla tapando el balón o erlenmeyer con un tapón de algodón en lugar de un corcho para facilitar el proceso de oxidación.

Además, se debe preparar una solución acuosa de alumbre férrico al 2% o cloruro férrico al 2% para que actúe como diferenciador.

❖ *Hematoxilina de Meyer modificada*. La ventaja de ésta es que no necesita maduración previa.

Disolver 1 g de hematoxilina en agua destilada y calentar. Agregar 0,2 mg de iodato de sodio, 50 g de alumbre de potasio y 50 g de hidrato de cloral. Colocar en una probeta y llevar a 1.000 mililitros. Se obtiene una solución color rojo vinoso.

- ❖ *Hidrato de cloral*. Se emplea solución acuosa, mezclar 5 volúmenes de hidrato de cloral en 2 volúmenes de agua destilada.
- ❖ *Hidróxido de potasio*. Se lo emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Hidróxido de sodio*. Se lo emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Hidroxiquinoleína*: 8-hidroxiquinoleína (Oq.). Disolver 0,29 g de Oq. en un litro de agua bidestilada a 60 °C. Puede ser reemplazada por otros inhibidores del huso acromático, como paradiclorobenzol (paclosol) en solución saturada o colchicina al 0,05%.
- ❖ *Hipoclorito de sodio*. Puede utilizarse la lavandina comercial concentrada o diluida con 1 ó 2 volúmenes de agua destilada (según el tipo de material con que se trabaje).
- ❖ *Histowax*: plástico utilizado como medio de inclusión.
- ❖ *Lactofenol de Amann*
 - Ácido fénico 1 g
 - Ácido láctico 1 ml
 - Glicerina 2 ml
 - Agua destilada 1 ml

Disolver el ácido fénico en agua, luego agregar la glicerina y el ácido láctico.

- ❖ *Lugol*. Disolver 1 g de ioduro de potasio en 100 ml de agua destilada. Agregar 0,3 g de yodo sublimado. Agitar hasta que el yodo se disuelve.
- ❖ *Mezcla sulfocrómica*. Se prepara para la limpieza del material de vidrio.
 - Bicromato de potasio 100 g
 - Ácido sulfúrico concentrado 250 ml
 - Agua 1.000 ml

Disolver el bicromato en el agua y agregar lentamente el ácido sulfúrico.

- ❖ *Naranja de acridina*. Se emplea en soluciones acuosas muy diluidas para fluorescencia (al 0,01%).
- ❖ *Naranja G*. Disolver 1 g de colorante en 100 ml de solvente. El solvente varía de acuerdo con la técnica utilizada; puede ser agua destilada o alcohol etílico 96°.
- ❖ *Nitrato de sodio*. Se lo emplea en soluciones acuosas.

- ❖ *Orceína acética*. Disolver 4,4 g de orceína en 100 ml de ácido acético glacial. Calentar desde 30 minutos hasta 24 horas en un balón de destilación con refrigerante a reflujo hasta observar que el colorante se ha disuelto totalmente.

Filtrar y guardar a temperatura ambiente en frasco color caramelo. Usar diluida según las siguientes proporciones:

- al 2%: 9 partes de la solución madre 11 partes de agua destilada.
- al 1%: 1 parte de la solución madre al 2% 1 parte de ácido acético al 45%.
- ❖ *Orceína propiónico*. Se prepara igual que la anterior, pero reemplazando el ácido acético por ácido propiónico.
- ❖ *Óxido de propileno*. Se recomienda trabajar con guantes y bajo campana porque sus vapores son tóxicos y cancerígenos.
- ❖ *Permanganato de potasio*. Se emplea en solución acuosa al 1% como mordiente.
- ❖ *Piridina*. Se la usa pura y en cantidades pequeñas para diluir colorantes.
- ❖ *Reactivo de Millon*:
 - Ácido nítrico 9 ml
 - Mercurio 1 gr

Una vez disueltos se diluyen con igual volumen de agua.

- ❖ *Reactivo de Muntzing*. Glicerina y carmín acético en proporción 1:1.
- ❖ *Reactivo de Schiff (PAS)*.
 - Agua destilada 100 ml
 - Fucsina básica 0,5 gr
 - CIH al 10% 10 ml
 - Bisulfito sódico 0,5 gr

En un erlenmeyer se coloca el agua destilada y la fucsina básica, se lleva sobre llama con amianto y se deja hervir unos minutos. Se enfría la solución a 50°C (medir con termómetro) y agregar el CIH. Cuando la solución se enfría a 25°C se agrega el bisulfito sin diluir, se agita, se tapa el recipiente con un papel oscuro y se coloca dentro de un mueble al resguardo de la luz. Dejar reposar unas 48 hs o hasta que vire el color a amarillo paja. Agregar tres paletas de carbón activado, agitar. La solución toma coloración negra. Filtrar, la solución debe ser de coloración amarilla clara. El papel de filtro se torna de color fucsia. La solución está lista para usar, se guarda en la heladera en frasco oscuro.

- ❖ *Resinas*. Se adquiere una resina base, un endurecedor, un acelerador y un plastificador. Además, de las indicaciones de proporciones posibles, que varían según

la marca. Es muy importante hacer las mezclas tal como se indica y revolver lentamente con varilla de teflón hasta que desaparezcan las estrías. Se puede utilizar un agitador magnético.

- ❖ *Reynolds (solución de)*. Ver citrato de plomo.
- ❖ *Rojo Congo*. Colorante, se usa en pequeña cantidad.
- ❖ *Rojo neutro*. Se emplea en soluciones acuosas muy diluidas (0,1%).
- ❖ *Rojo de rutenio*. Solución madre: 1 g en 10 ml de agua destilada. Esta solución madre se emplea para obtener una solución al 0,001% (también en glutaraldehído o en tetróxido de osmio para microscopía electrónica de transmisión).
- ❖ *Sacarosa*. Se emplea en soluciones acuosas.
- ❖ *Safranina*. Colorante que se une a la lignina y suberina. Se emplea en soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas.
 - Safranina 3,69 gr
 - Alcohol 95° 369 ml
 - Agua destilada 131 ml

Dejar reposar al menos 48 hs, filtrar y guardar en frasco oscuro.

- ❖ *Soluciones buffer o tampones*: Al rotularlas no olvidar de indicar pH, molaridad y fecha de realización.
- ❖ *Solución de calcio*:
 - Cloruro de calcio 10 g
 - Agua destilada 1.000 ml

Se agrega 1 ml cada 100 ml de fijador. Los iones calcio favorecen la acción fijadora del osmio.

- ❖ *Solución salina tamponada (SST)*:
 - Fosfato monopotásico anhidro 0,226 g
 - Fosfato dipotásico anhidro 1,455 g
 - Cloruro de sodio 0,8 g
 - Agua destilada hasta 1.000 ml; pH: 8,5.

Se emplea con glicerina como medio de montaje para observar la autofluorescencia.

- ❖ *Sudán III o Sudán IV*. Se emplean en soluciones alcohólicas saturadas (alcohol etílico 80°). Filtrar siempre en el momento de usar. También puede prepararse mezclando partes iguales de alcohol 70° y acetona: saturar con Sudán.
- ❖ *Sulfato férrico*. Para detectar taninos.

- Sulfato férrico 2 g
- Formaldehído 10 ml
- Agua destilada 90 ml
- ❖ *Tampones.* Ver Soluciones buffer.
- ❖ *Terbutanol - etanol.* Mezcla para deshidratar (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidades calculadas para preparar 50 mililitros de terbutanol - etanol.

Terbutanol	Alcohol 100° (ml)	Agua destilada
3,5	22,5	25
5	25	20
7,5	25	18,5
10	25	15
15	25	10
20	22,5	7,5
25	20	5
30	20	
35	15	
42,5	7,5	

- ❖ *Tetróxido de osmio.* Droga de alto riesgo, irritante, tóxica y cancerígena.
 - *Solución madre:*
Tetróxido de osmio al 2% (aproximadamente 1 g en 50 ml de agua destilada). Congelar 48 horas antes de usarla.
 - *Solución madre del buffer veronal - acetato,* se usa con tetróxido o de osmio:
Veronal sódico 14,714 g
Acetato sódico 3 H₂O 9,714 g
Agua destilada 500 ml
Ambas soluciones se guardan en heladera por separado.
 - *Solución de trabajo,* ver Caufield
Se debe corregir el pH a 7,4 con algunas gotas de C1H 0,1 N o buffer veronalacetato.
 - *Fijador según Sorensen:*
Tetróxido de osmio 1 g
Buffer fosfato 50 ml
Cloruro de calcio al 1% 5 gotas

Preparar esta solución en un recipiente de vidrio con tapa. Decantar en heladera, debe quedar clara. Puede guardarse por una semana.

- ❖ *Urea*. Solución acuosa al 20%.
- ❖ *Verde de malaquita*. Se emplea en soluciones acuosas al 2%. En coloraciones dobles sucesivas puede usarse con fucsina ácida.
- ❖ *Verde de metilo*. Se emplea en soluciones alcohólicas; en alcohol etílico 70° al 1%. Dejar actuar por 24 horas.
- ❖ *Verde iodo*. Se usa en soluciones acuosas al 0,75%.
- ❖ *Verde Jano*. Se emplea en soluciones acuosas muy diluidas. Es uno de los colorantes vitales, ideal para teñir mitocondrias.
- ❖ *Verde rápido o "fast-green"*. Se usa en soluciones saturadas de alcohol etílico absoluto.
- ❖ *Violeta de cresilo*. Se emplea en soluciones acuosas, 0,5-1 gr en 100 ml de agua destilada.
- ❖ *Violeta de genciana*. Se usa en soluciones acuosas al 1%.
- ❖ *Xileno o Xilol*. Se emplea como solvente puro o en distintas proporciones con alcohol etílico o parafina.

Bibliografía

- Carmona Valdovinos T. F. 2007. Manual de prácticas de la experiencia educativa Biología Vegetal. Modelo educativo integral y flexible. Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, 1-89.
- D' Ambrogio de Argüeso A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, Argentina.
- Dottori N., Cosa M.T., Bruno G., Stiefkens L. Perícola N. y M. Hadid. 2001. Técnicas de histología vegetal. Cátedra de Morfología Vegetal, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas Física y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- Harris N., Oparka K.J. 1994. Plant cell biology. A practical approach. Oxford University Press Inc, New York, USA.
- Johansen D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw – Hill Book Co. Inc., New York, USA.
- Litwin J.A. 1985. Light microscopic histochemistry on plastic sections. Progress in histochemistry and cytochemistry, 16(2):1-79. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, USA.
- Mercado M.I. y G.I. Ponessa 2021. Nuevo soporte para obtención de cortes de material vegetal con micrótopo rotativo. *Dominguezia*, 37(1):29-35.
- O'Brien T.P, Mc Cully M.E. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termacarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia.

Anexos

Anexo 1

Tabla 6. Cantidades de alcohol 95° y agua destilada para preparar 100 ml de solución de distintas graduaciones de alcohol.

Alcohol	Alcohol 95° (ml)	Agua destilada (ml)
10°	10,5	89,5
20°	21	79
30°	31,6	68,4
40°	42,1	57,9
50°	52,6	47,4
60°	63,1	36,9
70°	73,7	26,3
80°	84,2	15,8
90°	94,7	5,3

Anexo 2

Tabla 7. Cantidades de alcohol 100° y solvente para preparar 250 ml de la solución.

Solución (proporción)	Alcohol 100° (ml)	Solvente (ml)
3 - 1	200	67
1 - 1	125	125
1 - 3	67	200



Técnicas de histología vegetal

Un abordaje para su utilización en microscopía óptica

Susana A. Suárez, M. Albana Di Palma,
Paula G. Cardozo y Claudia N. Travaglia

Para comprender como están formados los organismos vivos es necesario basarse en la observación de las estructuras adecuadas. La Histología vegetal se basa en el conocimiento de la estructura microscópica de las plantas. El estudio de los vegetales incluye los grupos comúnmente conocidos como "musgos", "helechos", "gimnospermas" y "angiospermas" entre otros. Estos organismos se caracterizan por poseer tejidos simples y complejos, para lo cual es necesario el reconocimiento y caracterización de sus células y de ellos mismos. Esto permite, a su vez, caracterizar anatómica y funcionalmente órganos y estructuras vegetativas y reproductivas. De allí que las técnicas de histología para microscopía óptica constituyen una herramienta indispensable con aplicación en el ámbito tecnológico, académico e industrial. El libro *Técnicas de histología vegetal. Un abordaje para la utilización en microscopía óptica* provee de información actualizada, con lenguaje técnico-coloquial, obtenida mediante estudios experimentales.

Colección
Académico-Científica

e-book

ISBN 978-987-688-506-5



UniRío
editora

10 años



Universidad Nacional
de Río Cuarto
Secretaría Académica