

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS VEGETAL

**HISTO-NOA, Histoteca Vegetal Virtual de la Facultad de
Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo-UNT**

Dra. Patricia L. Albornoz

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS VEGETAL

ÍNDICE

Introducción	1
Material vegetal	1
Fijación	2
Técnicas de corte	3
Técnica de inclusión en parafina	5
Técnica para la obtención de epidermis	8
Técnicas de disociado o macerado	10
Técnicas de ablandamiento de materiales duros	11
Colorantes y técnicas de tinción	11
Test histoquímicos	16
Otras coloraciones	18
Limpieza del material de vidrio y técnicas de montaje	18
Observación	20
Instrumental óptico	20

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS VEGETAL

Introducción

Los materiales vegetales extraídos deben ser sometidos a distintos procedimientos y técnicas histológicas, hasta obtener las condiciones para observar al microscopio óptico o electrónico. Esto es debido a que la composición de los tejidos, generalmente, no tiene contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras mediante la observación directa en el microscopio. Por ello, las muestras se deben procesar para que no se deterioren, resaltar sus estructuras y poder estudiarlas.

Las técnicas histológicas que se detallarán son las comúnmente utilizadas en el laboratorio: material vegetal, fijación, corte, inclusión y tinción de tejidos. Además, se incluyen protocolos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos.

Material vegetal

El material puede presentarse fresco o conservado:

a) *Fresco*: Se utiliza cuando se desee observar ciertas características del material vegetal que podrían modificarse por la acción de conservantes o tratamientos para herborizar.

b) *Conservado*: El material se puede conservar en seco o con reactivos químicos. Material seco: mediante el proceso de herborización los materiales completos (hoja, flor, fruto y raíces, este último en caso de ser posible), recolectados a campo, deben colocarse entre hojas de papel madera y en carpetas de herbario, extendidos y prensados. Posteriormente, secados a 30 °C por varios días (hasta que el material está seco y con cambio del papel si fuera necesario), luego sometidos a -18 °C por 4 a 5 días, este proceso de frío y calor se debe repetir dos veces, finalmente mantener en recipientes cerrados con pastillas de alcanfor.

El material seco puede ser restablecido mediante tratamientos cuya duración varía de acuerdo al tipo de material:

- Hervir el material herborizado en agua, agua glicerina, o agua con unas gotas de detergente, luego lavar con agua destilada, secar con papel de filtro y manipular.
- Sumergir el material herborizado en Glicol de etileno por dos o más días, previos al tratamiento de hervir el material.

Material conservado en reactivos químicos llamados fijadores, los que producen la muerte y fijación del material (finalización de los procesos vitales y preservación de los elementos estructurales y celulares, respectivamente).

Los fijadores deben reunir dos características principales, rápido poder de penetración para que la fijación se produzca en las capas superficiales y en los tejidos más profundos, y debe ser ácido para que produzca una rápida coagulación de las proteínas, evitando la contracción de la célula. Solo en estudios de nucleolos y mitocondrias se utilizan fijadores básicos.

Fijación

Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas a las de su estado vivo. Así, los fijadores evitan la autólisis, protegen frente a ataques bacterianos, insolubiliza elementos solubles a estudiar, evita distorsiones y retracciones tisulares.

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. Incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. En el estudio de la actividad enzimática se debe usar un fijador que no altere el centro activo de las enzimas en las que estamos interesados, y quizá se tenga que sacrificar la morfología tisular. La mayoría de los fijadores no preservan los lípidos, los cuales permanecerán en el tejido mientras no usemos disolventes. Así, en el estudio de la ultraestructura celular se debe usar fijadores que fijen los lípidos y que protejan a las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, que conlleva el uso de solventes orgánicos. Asimismo, la mayoría de los fijadores no fijan los carbohidratos pero éstos permanecen en el tejido porque están unidos a las proteínas. Por otra parte, si se quiere teñir un determinado componente celular, difícilmente teñible, quizá debamos usar un fijador que lo modifique para que sea reconocido más fácilmente por los colorantes.

Los fijadores pueden ser simples o compuestos.

-Fijadores simples:

Alcohol etílico absoluto, alcohol 95%, formol, cloroformo, ácido acético glacial, ácido nítrico, cloruro de mercurio, entre otros.

-Fijadores compuestos:

FAA es el fijador más usado para estudios taxonómicos e histológicos. Puede ser preparado con uno o varios días de anticipación. Se aconseja utilizar el material después de 24-48 h de fijación como mínimo. No debe permanecer indefinidamente en el mismo fijador ya que el material se endurece y se torna quebradizo, lo más indicado es pasarlo a alcohol 70° luego del tiempo de fijación.

Craf III compuesto por dos soluciones que deben mezclarse, en partes iguales, antes de su uso. El tiempo de fijación es más o menos de 24 h. Este fijador es altamente corrosivo por lo que debe evitarse el contacto con la piel.

Farmer y Carnoy se utiliza para estudios meióticos y recuento de cromosomas de anteras o ápices de raíces. Se aconseja prepararlo en el momento del uso para que la acción sea efectiva. El tiempo de fijación varía de 30 minutos a 24 horas.

Procedimiento para la fijación del material

Una vez cortado el órgano a estudiar, colocarlo inmediatamente en el fijador. Si esto no es posible de hacer en el acto, para evitar la deshidratación del material, éste debe colocarse en bolsas plásticas cerradas conteniendo un algodón embebido en agua, y conservar en frío (-4 °C) hasta su fijación en el laboratorio.

El volumen del fijador debe cubrir el material a fijar. Si el material es grande, debe subdividirse en trozos chicos para que el fijador penetre fácilmente.

Técnicas de corte

Las características tisulares y celulares se observan con los microscopios. Sin embargo, con estos aparatos sólo se pueden observar muestras de tejido que tengan un grosor muy pequeño, ya que de no ser así hay problemas de difusión y penetración de la luz en el caso de los microscopios ópticos y de penetración de los electrones en el caso del microscopio electrónico de transmisión. Por tanto, las secciones de los tejidos que queremos estudiar pueden ir desde un grosor de unos cuantos nanómetros hasta centenares de micras. Algunos tejidos vegetales, por sus características celulares, permiten su observación en secciones de cientos de micras de grosor. Las secciones de un grosor de micrómetros se realizan con aparatos mecánicos denominados micrótomos y existen diferentes tipos según el grosor que deseamos conseguir en nuestras secciones.

Unidades de uso Corriente en microscopía

La unidad más utilizada es el micrón, micra o micrómetro (μm).

Un micrómetro equivale a:

Un micrómetro equivale a una milésima de milímetro: $1 \mu\text{m} = 0,001 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ mm}$

Una millonésima de metro: $1 \mu\text{m} = 0,000 \ 001 \text{ m} = 10^{-6} \text{ m}$

Mil nanómetros: $1 \mu\text{m} = 1000 \text{ nm}$

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

$1 \text{ m} = 1 \ 000 \ 000 \mu\text{m}$

$1 \text{ nm} = 0,001 \mu\text{m}$

a)- Corte a mano libre: este tipo de corte se puede realizar bajo lupa o con soportes.

A mano libre bajo lupa: se coloca el material de estudio sobre el portaobjeto y los cortes se realizan con el elemento cortante (hoja de afeitar, navaja, trincheta o bisturí). Para asegurar un buen corte es necesario que los mismos se realicen en forma perfectamente paralela a la superficie del órgano, para evitar el seccionado a bisel. Una vez realizados los cortes se seleccionarán los más finos, donde los tejidos se observan con claridad y se debe tener en cuenta que el órgano a estudiar esté completo. No debe descartar los otros cortes ya que pueden contribuir en la interpretación del órgano en estudio. Posteriormente, se procede a clarificar los cortes realizados con hipoclorito de sodio 50% (50% lavandina concentrada: 50% agua destilada), el tiempo de exposición dependerá del material (generalmente entre 1 a 4 minutos). Luego se realizan lavados con agua destilada, repetidas veces, hasta quitar completamente la lavandina. Finalmente estos cortes pueden o no ser teñidos y montados.

A mano libre con soporte: se pueden utilizar como soporte a la médula de sauco (*Sambucus peruviana*) o zanahoria (*Daucus carota*).

Para ello se divide longitudinalmente el soporte elegido, luego se procede a calar un semicírculo, en cada parte, entre las que se colocará el material a ser seccionado.

b)- Corte con Micrótomo de mano: Existen distintos tipos de micrótomos manuales (Fig. 1).

Micrótopo de cilindro de Leitz, consta de un cilindro vertical hueco, con una pinza que sujeta el material, que se sostiene con una mano y que termina en un disco o plataforma de cristal por donde se hace deslizar una navaja. El micrótopo consta además de un tornillo calibrado que se hace girar de modo que levanta el material a cortar.



Fig. 1. Micrótopo de mano.

c)- **Corte con Micrótopo de cuchilla metálica.** Existen distintos tipos de micrótopos de cuchilla metálica.

Micrótopo de Minot, se utiliza para cortar materiales incluidos en bloques de parafina, materiales fresco o fijado en FAA contenidos en cera. El bloque se sujeta por tornillos y se desplaza sobre la cuchilla que está fija. Se procede a la graduación del espesor que se desea realizar los cortes y se acciona la manivela situada a la derecha del aparato, esta hace girar un engranaje que produce el acercamiento del bloque hacia la cuchilla. Las secciones se depositan sobre la cuchilla y se adhieren unas a otras formando una cinta. Se obtienen corte desde 5 hasta 25 μm de espesor. Las secciones deben observarse al microscopio para comprobar si están correctamente orientadas y si el grosor elegido es el adecuado (Fig. 2).



Fig. 2. Micrótopo de Minot.

Ultramicrótopos, son micrótopos de Minot a los cuales se les agrega una lupa binocular potente y cuchillas especiales de vidrio o de diamante. Con este tipo de aparato se pueden obtener cortes “gruesos” de 1 μm de espesor y cortes finos entre 750 y 900 μm . Los modelos actuales son automáticos.

Microtopo de congelación. Con él se consiguen secciones de 30 a 100 μm de grosor a partir de material congelado y se observan con el microscopio óptico.

Criostato. Consigue secciones a partir de material congelado y se obtienen grosores de 10 a 40 μm , para observar con el microscopio óptico.

Los aparatos de corte más usados tradicionalmente para estudiar las características generales de los tejidos y de las células son el micrótopo para material incluido en parafina para observaciones con el microscopio óptico y el ultramicrótopo para observaciones con el microscopio electrónico de transmisión. El criostato se usa también frecuentemente en microscopía óptica por el ahorro de tiempo que supone ya que no necesita incluir el tejido, incluso se puede cortar material no fijado.

Tipos de cortes

Los cortes o secciones pueden ser transversal y longitudinal (Fig. 3).

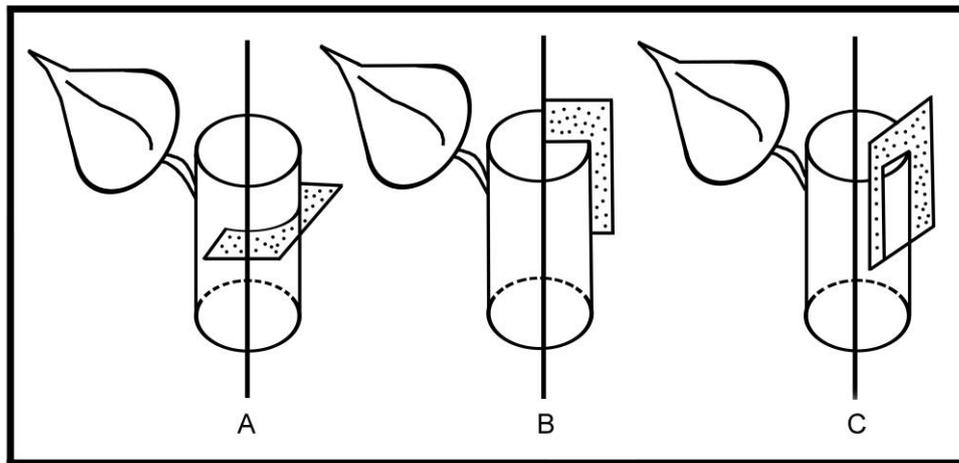


Fig. 3. A. Corte transversal. B. Corte longitudinal radial. C. Corte longitudinal tangencial.

Técnica de inclusión en parafina

La técnica consta de los siguientes pasos: deshidratación, clarificación, infiltración e Inclusión.

Deshidratación

El material previamente fijado en FAA se debe deshidratar con una serie ascendente de alcoholes etílicos y en tiempos que varían según los materiales en estudio (Planilla 1).

Planilla 1. Modelo tentativo de tiempos.

Deshidratación	Apice de raíz y callos	Flores pequeñas y ápices de tallo	Tallos herbáceos	Hojas
Alcohol 70°	1 h	2 h	2 h	2 h
Alcohol 80°	1 h	2 h	24 h	12-24 h
Alcohol 90°	1 h	2 h	24 h	12-24 h
Alcohol 96°	1 h	2 h	24 h	24 h
Alcohol 100°	1/2 h	2 h	12 h	12 h
Alcohol 100°	1/2 h	2 h	12 h	12 h

Importante: No interrumpir el tratamiento cuando el material esté en alcohol absoluto porque torna quebradizos los tejidos.

Clarificación

Este procedimiento permite que el material se aclare y esto se reconoce por la transparencia del mismo. El material debe pasar por un disolvente de la parafina que puede ser xilol, toluol o benzol (Planilla 2).

Planilla 2.

Clarificación	Apice de raíz y callos	Flores pequeña y ápices de tallo	Tallos herbáceos	Hojas
Alcohol 100° - xilol (1:1)	1 h	2 h	3 h	3 h
Alcohol 100° - xilol (1:3)	1 h	2 h	3 h	3 h
Alcohol 100° - xilol (3:1)	1 h	2 h	3 h	3 h
Xilol puro	1 h	1 noche	1 noche	1 noche
Xilol puro	1 h	1/2 h	2 h	2 h

Importante: No interrumpir el tratamiento cuando el material esté en xilol puro porque produce un efecto semejante al del alcohol 100°.

Infiltración

Esta etapa se realiza en estufa aproximadamente a 60 °C. Colocar previamente la parafina a fundir. El recipiente que se lleva a estufa debe permanecer abierto. Los materiales infiltrados por un disolvente de la parafina ya están en condiciones de ser impregnadas por ésta. Volcar la mitad del xilol puro del frasco que contiene el material y agregar igual cantidad de parafina pura. Los cambios de parafina deben ser rápidos para que esta no solidifique (Planilla 3).

Planilla 3.

Infiltración	Apice de raíz y callos	Flores pequeñas y ápices de tallo	Tallos herbáceos	Hojas
Xilol** - parafina	1 h	2 h	6 h	6 h
Xilol* - parafina	1 h	2 h	6 h	6 h
Parafina pura	3 h o 1 noche	6 h o 1 noche	1 noche	1 noche
Parafina pura	1 h	2 h	2 h	2 h

*, ** Cumplido el tiempo, volcar la mitad de la mezcla y agregar parafina pura; dejar actuar en estufa y al paso siguiente volcar todo y llenar con parafina pura.

Planilla 4. Planilla de tiempos para método rápido

	Tejidos meris- temáticos	Tejidos adultos
Deshidratación		
Alcohol 96°	2 o 3 días	2 o 3 días
Alcohol 100°	1 hora	12 horas
Alcohol 100°	1 hora	12 horas
Clarificación		
Alcohol 100° - xilol (3:1)	1 hora	2-4 horas
Alcohol 100° - xilol (1:1)	1 hora	2-4 horas
Alcohol 100° - xilol (1:3)	1 hora	2-4 horas
Xilol puro	1/2 hora	1 hora
Xilol puro	1/2 hora	1 hora
Xilol puro	1 noche	1 noche
Infiltración		
Xilol - parafina (3:1)	1 hora	2 horas
Xilol - parafina (1:1)	1 hora	2 horas
Xilol - parafina (1:3)	1/2 hora	1 hora
Parafina pura	2 horas	2-4 horas
Parafina pura	1 noche	1 noche
Parafina pura	1 hora	1 hora

Importante: para frutos secos y semillas con epicarpo duro, previo ablandamiento (ver técnica de ablandamiento para materiales duros), se aconseja seguir los tiempos para “material adulto” en el método rápido. Para material leñoso dejar 24 horas en cada uno de los pasos del procedimiento de deshidratación, 6 horas en clarificación y 12 horas en infiltración.

Manejo del material infiltrado y corte

El material infiltrado se vuelca en una cajita de cartulina blanca de dimensiones adecuadas a la cantidad de material con que se está trabajando. Una vez en la caja, orientar el material según convenga con una aguja calentada a la llama. Luego, se coloca la caja sobre una superficie horizontal y cuando se ha enfriado el fondo, se pasa a un recipiente con agua helada, para la solidificación rápida de la parafina. Posteriormente, desprender con cuidado la cartulina y dividir en bloques más pequeños (tantos como materiales se hayan incluido en la misma caja), lo que se logra con bisturí o espátula calentada a la llama. El bloque se talla para obtener caras perfectamente paralelas y sin exceso de parafina, antes, se debe observar y orientar el material según el tipo de corte que se desea obtener. El bloque puede o no adherirse a un taco de madera. En este punto, el material está listo para ser cortado con micrótopo rotativo Minot.

Así, se obtiene una cinta continua con el material incluido. Esta cinta tiene una cara opaca y otra brillante, la superficie opaca debe mantenerse hacia arriba, ya que el cubreobjeto o portaobjeto se adherirá con mayor firmeza a la superficie brillante. La cinta se secciona en partes más pequeñas que el cubreobjeto a emplear. Estas secciones más pequeñas se levantan con el cubreobjeto o portaobjeto, luego se las lleva a un recipiente con agua tibia para asegurar que el material se extienda (planchado). Los mismos se colocan en cartulinas plegadas, que se ubican en la parte superior de una estufa para evaporar el agua y fundir la parafina (40°, 50 °C), sin dañar el material y permitiendo que el mismo se adhiera al vidrio.

Tabla de dilución de alcoholes según Gay Luzca (tomada de Langeron, 1949)

A 100 ml de alcohol 96° se debe agregar la siguiente cantidad de agua destilada:

Alcohol a obtener	ml de agua a agregar
30°	227,70
40°	147,22
50°	98,15
60°	64,92
70°	40,85
80°	22,45
90°	7,73

-Técnicas para la obtención de epidermis

a)- Métodos químicos

Diafanizado: proceso mediante el cual se logra la transparencia del material a estudiar. Se pueden emplear distintas técnicas: Foster, Dizeo de Strittmater y Bailey y Nast. Es frecuente el empleo de estas técnicas para estudios de venación y epidermis de hojas y pétalos de material fresco, fijado o de herbario.

- *Técnica de Foster*: emplea alcohol 70°, NaOH al 3-5% e hidrato de cloral.

1. Si el material es fresco, hervir unos minutos en alcohol 70° para remover la clorofila. Si el material es seco, hervir unos minutos en agua.
2. Colocar el material en caja de Petri con el hidróxido de sodio. Hacerlo a temperatura ambiente si el material es delicado o en estufa a 40 o 50 °C cuando se trate de hojas coriáceas o muy resistentes.
3. Cambiar el reactivo con frecuencia hasta que no decolore más. El proceso puede durar 1, 2 o más días, según el material.
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 se vea transparente, esto puede llevar algunos minutos, también puede conservarse en hidrato de cloral hasta colorear.

- *Técnica de Dizeo de Strittmatter con modificaciones*: esta técnica requiere de:

- Hidróxido de Na al 5% en solución acuosa.
- Hipoclorito de Na al 50% en solución acuosa
- Hidrato de cloral, al 5% en solución acuosa.
- Safranina (a saturación en alcohol 80%, en frío).

1. Se coloca el material fresco o previamente fijado en un vaso de precipitado con alcohol 96° y se lleva a ebullición (en baño María), durante 10 minutos.
2. Se pasa a una solución de alcohol 96° e NaOH al 5% en partes iguales y se lleva a ebullición de 5 a 10 minutos, según la consistencia del material.
3. Hacer varios lavados, hasta que el agua quede completamente limpia.
4. El material lavado se pasa a agua destilada, se hacen dos cambios.
5. Introducir el material en una solución de hipoclorito de Na al 50% y se deja hasta que se torne totalmente translúcido (este proceso de diafanización se puede

interrumpir conservando el material en alcohol 70°, previo paso por agua destilada, pudiendo permanecer el tiempo que sea necesario hasta continuar el proceso).

6. Pasar a agua destilada y hacer 5 cambios de 3 minutos cada uno.

7. Colocar en hidrato de cloral al 5% (5 g en 2 ml de agua destilada), durante 5 a 10 minutos, para quitarle opacidad.

No obstante, puede permanecer en esta solución todo el tiempo que sea necesario hasta realizar la coloración y montaje.

Una alternativa es utilizar KOH en concentraciones que varían de 1-10% dependiendo de la consistencia del material. Si el material es muy tenue se emplea KOH en concentraciones de 1-3% y durante 10 a 30 minutos a baño María.

En el caso que se requiera diafanizar pétalos o materiales muy delicados como cotiledones, se sugiere la utilización de hipoclorito de Na. El material se coloca en cápsulas de Petri con dicha solución, el tiempo de exposición varía de acuerdo a la consistencia del mismo. Mientras que en el caso de materiales coriáceos, se aconseja utilizar ácido nítrico al 10-50% durante uno o dos días. Este proceso se puede acelerar flameando a llama directa durante 2 a 5 minutos en tubo de ensayo, bajo campana de vidrio o al aire libre, ya que se liberan vapores altamente tóxicos. El ácido ataca las células del mesofilo, liberando así la epidermis. Los restos de mesofilo que pudiesen quedar son eliminados bajo lupa por raspado.

- *Técnica de Bailey y Nast*

1. Colocar el material fresco o fijado en solución acuosa de hidróxido de sodio al 3%. Tapar para evitar evaporación y colocar en estufa a 55 °C hasta que quede completamente transparente.

2. Lavar haciendo 1 o 2 cambios de agua destilada.

3. Consevar en alcohol 70 °C en frasco bien tapado hasta su coloración y montaje.

b)- **Métodos mecánicos:** se realiza manualmente con la ayuda de pinzas con punta fina o cinta adhesiva, así se extraen porciones pequeñas de epidermis, cutícula y tricomas.

- *Método de Peeling*

1. Se introduce la punta de la aguja histológica apenas por debajo de la epidermis de una hoja de la especie a estudiar.

2. Con la pinza de punta fina se levanta una porción pequeña de epidermis y se tira de ella hasta desprenderla.

3. Se monta la porción sin teñir en un porta objetos con unas gotas de agua glicerina al 50% o gelatina glicerina (ver técnicas de montaje), cuidando que la superficie exterior de la epidermis quede hacia arriba.

4. Si se desea colorear se emplea safranina diluida durante 5 minutos, se vuelca el excedente, se enjuaga con agua destilada y se monta en unas gotas de agua glicerina 50% o gelatina glicerina; en este último caso es necesario colocar peso sobre el preparado para asegurar un secado uniforme.

- *Método de raspado o técnica de Metcalfe*

1. Se coloca sobre el porta objeto una porción de hoja con la epidermis que desea estudiar hacia abajo.
2. Se raspa suavemente bajo lupa, con una hoja de afeitar, eliminando la epidermis expuesta y el mesofilo de la lámina. Esto se repite hasta alcanzar la epidermis a observar.
3. Se coloca sobre ellas una gota de solución concentrada o diluida (1:1) de hipoclorito de Na y se deja actuar durante unos minutos. El tiempo de permanencia del material varía dependiendo de las características del mismo.
4. Lavar 5 a 6 veces con agua, la penúltima vez usar agua con 2 o 3 gotas de amoníaco y la última con agua destilada. Colorear y montar como en el método anterior.

- **Técnicas de disociado o macerado**

La técnica utiliza reactivos que por disolución de la laminilla media permiten disociar los tejidos y observar en forma individual las células que los constituyen. Generalmente se emplean en estudios de maderas.

- *Método de Schultze*

Este método debe aplicarse solo si se puede trabajar bajo campana por que produce desprendimiento de gases tóxicos.

1. Se coloca en una vaso de precipitado unos cristales de clorato potásico, el material a estudiar y hasta ácido nítrico hasta cubrir. Luego se coloca sobre el mechero con llama suave bajo campana.
2. Interrumpir la reacción agregando agua fría cuando el material este de color blanco lechoso. Lavar muy bien varias veces con agua.
3. Colocar el material sobre un portaobjetos, aplastar suavemente con la aguja y agregar una gota de safranina diluida; escurrir el excedente y montar con gelatina glicerina.

- *Método de Jeffrey*

1. Se coloca en un frasco de vidrio, con tapa, el material y partes iguales de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%. Si se desea acelerar la reacción se coloca en estufa a 40 °C. El tiempo varía según los materiales entre 6, 12 o 48 h.
2. Se pincha el material con la aguja histológica, para retirarlo cuando haya adquirido una consistencia blanda y pulposa.
3. Luego se lava varias veces con agua y se coloca el material en un porta objetos aplastándolo suavemente con la aguja.
4. Se agrega una gota de safranina diluida para colorear, escurriendo el excedente y se monta.

- *Método de Boodle*

Es el método más rápido y menos drástico

1. Hervir el material con hidróxido de potasio al 10% y luego lavarlo bien con agua destilada.
2. Colocar el material así tratado en un tubo de ensayo con ácido crómico al 25% durante 30 a 60 minutos o más si es necesario.
3. Retirar cuando al pinchar el material tenga consistencia semejante a la manteca.

4. Se repiten los pasos 3 y 4 indicados en el método anterior.

Técnicas de ablandamiento de materiales duros

La dureza de determinados materiales como frutos secos, semillas y maderas, dificulta el procesamiento por lo que deben someterse a ablandamiento previo.

Maderas

1. Cortar cubos de 1 cm de lado (previamente orientados bajo lupa de modo de obtener cortes transversales, longitudinales radiales y longitudinales tangenciales).
2. Colocar en un vaso de precipitado con unas gotas de detergente y 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. 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.
3. Si llegado a este punto aún no es posible obtener cortes, colocar los cubos en una mezcla de glicerina y alcohol 96° y dejarlos en frasco tapado por 3 meses o más.

Frutos secos y semillas

Antes de comenzar la deshidratación realizar uno de los siguientes pasos (1, 2, 3 o 4).

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

Luego deshidratar, incluir en parafina, comenzar a cortar y luego de realizar los primeros cortes retirar el bloque del micrótopo y sumergirlo en una mezcla de agua glicerina (2:1) durante 2 a 5 días en estufa a 35-40°. 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.

Colorantes y Técnicas de Tinción

Las plantas poseen una gran variedad de pigmentos naturales (clorofila, carotenos, antocianos, etc) que permiten su observación directa con el microscopio óptico, las paredes celulares también ayuda en la delimitación celular y la identificación entre diferentes tejidos.

Para una mejor observación de los componentes celulares o de determinadas estructuras, se procede a teñir el material con ciertos compuestos químicos que al reaccionar con el mismo presentan una coloración característica.

Existen distintos tipos de colorantes

1)- **Generales:** métodos no compatibles con la vida por ser tóxicos y requerir la fijación previa del material

a- Directas o simples: la coloración se produce simplemente por inmersión en el baño de colorante. Ej.: Safranina.

b- Metacromáticos: el mismo colorante tiñe de manera diferencial distintas estructuras según su composición química. Ej.: Violeta de Cresilo, tiñe color rojo violáceo paredes primarias no lignificadas y de color verde azulado las paredes secundarias lignificadas.

c- Combinadas: se emplean varios colorantes, ya sea de manera sucesiva o simultánea.

-Combinados sucesivos: cada colorante actúa por separado. Ej: Safranina-verde rápido.

-Combinados simultáneos: se prepara la mezcla de ambos colorantes y se procede a la coloración. Ej. Carmin-verde Mirande.

d- Indirectas: es necesario que el material a colorear sea previamente tratado con un mordiente (sustancia que lo hace afín al colorante) por ej.: carbonato de Na al 2%, cloruro de Ba, etc. Ej.: Hematoxilina.

2)- **Vitales:** son colorantes poco tóxicos empleados en tejidos vivos ya que no afectan la vida celular, se utilizan en soluciones muy diluidas. Ej: rojo neutro y Verde de jano.

1) **Colorantes Generales**

a. Técnicas de coloración simple o directa:

Azul de Anilina (también llamado azul de algodón)

En solución alcohólica se disuelva 1g de anilina en 100 ml de alcohol etílico 85°. Además, se emplea en solución acuosa al 0,01% para fluorescencia.

-Tiñe: color azul las paredes celulósicas y las figuras acromáticas.

Azul de metileno

El azul de metileno en soluciones del 1% y 0,1% se utiliza sobre todo en preparaciones extemporáneas. Es un colorante poco limpio y tiñe muy desigualmente, por esto se recomiendan las soluciones más diluidas.

Modo de empleo: colorear durante 5 minutos con la solución de azul de metileno, lavar abundantemente para eliminar los precipitados y Observar al microscopio.

-Tiñe: paredes celulares de naturaleza celulósica.

Azul Astra

0,5 g de Azul Astra en 100 ml de agua destilada y 2 g de ácido tartárico.

-Tiñe: color azul cobalto las paredes celulósicas.

Carmín acético

Coloración muy usada en citología. Se lo emplea con ácido 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.

-Tiñe: cromosomas meióticos.

Cristal violeta o violeta de genciana o violeta de metilo

Todos los violetas pueden ser usados en soluciones acuosas al 1%

-Tiñe de azul las paredes celulósicas y las figuras acromáticas

Fast-green (verde rápido. FCF)

La concentración suficiente es de 0,5% a 0,2%. Es rápida.

La solución en 0,5% es la más usada, aunque muchos histólogos prefieren disolver el colorante en alcohol absoluto y diluirlo con aceite de ajo y luego mantener la solución en un frasco gotero.

Tiene la ventaja de conservar la coloración durante un largo tiempo.

-En tallos y hojas de plantas acuáticas y con la mayoría del material correspondiente a Gimnospermas, adopta una coloración azul a verde azulado, muy raro verde brillante.

Safranina

La solución stock se prepara disolviendo 2,25 g de safranina en 225 ml de alcohol etílico 96°. El fraccionamiento para su uso consiste en diluir parte de esta solución stock en volúmenes iguales de agua destilada o alcohol 50°.

El tiempo de exposición de los cortes va desde unos minutos hasta media hora. La coloración que se obtiene es duradera (salvo cuando el material se montó en gelatina glicerizada, que tiende a diluir el colorante).

-Tiñe: las paredes secundarias lignificadas se tiñen de rojo intenso y también la cutícula. Los parénquimas toman color rosado. Este colorante no es específico para la detección de lignina.

Safranina (Pfitzner-Flemming)

Esta safranina se emplea para coloraciones transitorias.

Safranina 1 g
Alcohol absoluto 100 ml
Agua destilada 200 ml

Safranina O,A

Esta safranina se emplea para coloraciones permanentes

Safranina 4 g
Methyl Cellosolve 200 ml
Alcohol 95° 100 ml
Agua destilada 100 ml
Acetato de sodio 4 g
Formalina 8 ml

Verde Iodo

Se disuelven 0,5 g de verde iodo en 100 ml de agua destilada.

No es necesario calentar ni filtrar. Se conserva en un frasco gotero.

Es un colorante que tiende a difundir en gelatina glicerinada.

-Tiñe: el xilema de verde azulado y la cutina y suberina de color verde amarillento.

Solución alternativa: 1 gr. de verde iodo se disuelve en 20 ml de alcohol 96% y 100 ml de agua destilada. El material debe permanecer en el colorante aproximadamente 3 minutos.

-Tiñe: selectivamente la cromatina y es excelente para paredes celulares lignificadas (no específico).

Verde Malaquita (sinónimo verde esmeralda)

Se puede usar una concentración de 0,5% o más en 95% de alcohol, agua destilada o aceite de ajo.

El tiempo de exposición puede ser 1 minuto cuando se emplea solo.

-Tiñe: nítidamente paredes celulares, endodermis, citoplasma, núcleo y cloroplastos. Cuando se trabaja en patología vegetal y después de safranina el núcleo del hospedante, xilema y paredes cutinizadas, así como también el núcleo del hongo puede aparecer rojo. Los citoplasmas y paredes celulósicas de los huéspedes se manifiestan de color verde.

b. Técnicas de coloración Metacromáticas

Azul de toluidina

Disolver 2,5 g de carbonato de sodio en agua destilada, agregar 0,1 g de azul de toluidina y completar a 100 ml con agua destilada.

Se emplea en solución acuosa de pH 11 a 11,1.

También se puede preparar una solución de azul de toluidina al 0,2%, otra de carbonato de Na al 2,5% y Mezclar partes iguales en el momento de usar.

-Tiñe: azul a rosado dependiendo de la naturaleza de la pared

Violeta de cresilo (también llamado Azul de cresilo)

Se coloca 0,5 g de colorante en 100 ml de agua destilada. Coloración estable.

-Tiñe: paredes primarias no lignificadas de color rojo violeta, las paredes secundarias lignificadas de color verde azulado y rosa el tejido parenquimático y la epidermis.

c. Técnicas de coloración combinadas

Azul de Anilina (también llamada azul de algodón)

Puede realizarse una coloración sucesiva doble con safranina, de materiales incluidos en parafina.

-Tiñe: azul las paredes celulósicas y de rojo las paredes lignificadas.

Azul Astra - Safranina

Los materiales se tiñen primero con azul astra y sobre éste se colorea con safranina.

-Tiñe: color azul-celeste pared primaria y color rojo pared secundaria.

Azul astra: colorea de azul cobalto la celulosa.

Azul astra 0,5 g

Agua destilada 100 ml

Ácido tartárico 2 g

Carmín - Verde Yodo

1. Se procede a decolorar y vaciar el contenido celular con hipoclorito de sodio.
2. Se lava con agua para eliminar el hipoclorito.
3. Se colorea con verde de iodo y carmín bórico considerando que el verde de iodo tiende a difundir en gelatina glicerinada.
Si es necesario, antes de pasar de un colorante a otro se debe lavar con agua.
-Tiñe: el xilema en verde azulado; si se emplea primero el carmín, el xilema se torna violáceo, mientras que si primero se utiliza el verde de iodo se obtienen contrastes perfectos.

Safranina - Fast Green

1. Clarificar los cortes con hipoclorito de NA 50%, lavar varias veces con agua destilada (5 a 6 veces).
2. Pasar por alcohol 70°.
3. Colorear con safranina a saturación en alcohol 80° durante 10 minutos -24 h (según el material).
4. Realizar un pasaje rápido por alcohol 96°.
5. Colorear con verde rápido a saturación en alcohol 100° durante 30 segundos a 1 minuto.
6. Realizar pasaje rápido por alcohol 100° (2 cambios).
7. Pasar por xilol (2 cambios).
8. Montar en bálsamo de Canadá.
-Tiñe: paredes secundarias lignificadas de rojo (a veces más oscuro o castaño), paredes primarias o secundarias no lignificadas se colorean de celeste verdoso.

Modificación de la técnica de coloración Safranina - Fast Green.

1. Se desparafina con xilol 10 a 15 minutos.
2. Se lava con alcohol absoluto durante 1 minutos; alcohol 96%, 1 minuto y alcohol 90%, 1 minuto.
3. Se colorea con Safranina a saturación en alcohol 80°, durante 1 a más horas.
4. Se pasa por alcohol 90°, 1 minuto y alcohol 96, 1 minuto.
5. Se colorea con Fast-Green en carboxilol que se obtiene mezclando 25 ml de ácido fénico (cristales fundidos a baño maría), 75 ml de xilol y 10 ml de Fast- Green en alcohol 100° a saturación), 2 minutos o menos.
6. Se monta directamente en bálsamo de Canadá.
-Tiñe: paredes lignificadas de rojo y las no lignificadas de verde-azulado.

Safranina - Verde brillante

1. Colorear en solución débil de verde brillante (en 100 ml de solución alcohólica de verde brillante se agregan 2 gotas de ácido clorhídrico), luego con safranina durante 6 a 8 h.
2. Lavar rápidamente en alcohol acidulado, lavar con agua.
3. Incluir en gelatina glicerinada.
-Tiñe: núcleos de color rojo y el plasma de verde.

Una variante de esta técnica: se siguen los pasos anteriores, pero primero se coloca el material en alcohol 30% por 5 a 10 minutos, se pasa a safranina, luego se realiza el paso 2 del método original, se colorea con verde brillante y se repite los pasos 2 y 3.

2) *Colorantes Vitales*

Verde Jano

Se prepara en solución acuosa de 0,5 g en 100 ml de agua. El colorante debe actuar entre 20 a 30 minutos sobre el tejido a observar (cuidar que no se seque, agregando más colorante).

-Tiñe: paredes celulares de verde y mitocondrias de verde brillante, bien visible.

Si las mitocondrias no se vieran satisfactoriamente, preparar una solución mas concentrada de 1 g en 100 ml de agua.

Rojo Congo

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. Los cortes deben permanecer con el colorante durante 15 minutos, se lavan varias veces con agua destilada y se observa.

Test histoquímicos

Acetato cúprico. Para detectar oxalato de calcio

Agregar una solución saturada de acetato cúprico a los cortes. Los cristales de oxalato de calcio se disolverán y el ácido oxálico difundirá hacia los espacios intercelulares donde se formarán cristales de oxalato cúprico.

Ácido sulfúrico concentrado: Para detectar saponinas

Cortes de material fresco agregar una 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.

Azul de anilina: Para detectar calosa (Martin, 1959, con modificaciones)

Cortes Ttransversales de la porción media de hoja se clarifican con lavandina, luego se lvan y posteriormente se teñen con azul de anilina al 0,05 % en KH₂PO₄ al 0,15 M y mantenidos en oscuridad durante 2 horas y posterior observación con UV.

Azul de cresilo: Para detectar mucílagos

Los mucílagos incluyen una cantidad de sustancias químicas distintas por lo que no hay una prueba lo suficientemente satisfactoria para su detección. Pero, son de fácil reconocimiento en cortes de material fresco por su carácter viscoso y tratados con Azul de cresilo al 1% dan una colorción azul Francia.

Clorioduro de cinc: Para detectar celulosa

Cloruro de cinc	30 g
Ioduro de potasio	5 g
Iodo	0,9 g
Agua destilada	15 ml

La celulosa se tiñe de azul o violeta. Las paredes lignificadas de amarillo oro.

Cloruro férrico al 10% y carbonato de sodio al 2%: Para detectar taninos

A los cortes frescos agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico con una pequeña cantidad de la solución acuosa de carbonato de sodio, dejar actuar 2 a 3 minutos y lavar.

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.

Floroglucina: Para detectar lignina

1. Al material clarificado agregar la floroglucina al 1% en alcohol 96°.
2. Colocar el cubre y flamear sobre llama, suavemente.
3. Retirar de la llama y colocar, en el borde del cubreobjeto, una gota de solución de ácido clorhídrico al 25%, este penetrará coloreando de rojo violáceo las paredes lignificadas. Es una tinción temporal.

Ioduro de potasio (Reactivo de Lugol): Para detectar almidón

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 disuelva.

El almidón se tiñe de color azul o azul violáceo.

Lugol y cloruro de cinc: Para detectar quitina

Tratar el material con lugol durante unos minutos, luego agregar una gota de solución acuosa saturada de cloruro de cinc y lavar.

La quitina toma una coloración violeta.

Reactivo de Millon: Para detectar proteínas

Ácido nítrico 9 ml

Mercurio 1 g

Una vez disueltos, diluir con igual volumen de agua.

Agregar este reactivo al material y calentar con llama suave.

Las proteínas que contengan tirosina, toman un color rojo ladrillo o rosado.

Sudán III: Para detectar grasas y aceites

1. A la mezcla de alcohol 70% y 50 ml de glicerina se añade 0,25 g de Sudán III.
2. La solución saturada, después de varias horas, se transfiere a un frasco gotero.

La resina, grasa, cera, cutina, suberina y látex dan una coloración que varía de amarillo a naranja. Las células exodérmicas adquieren una coloración naranja-pálida y las células suberosas de color rojo-naranja vivo.

Sudán IV: Para detectar lípidos

Se utiliza una solución alcohólica saturada por alrededor de 10 minutos y se lava rápidamente en alcohol, como el alcohol es un solvente de lípidos, se debe evitar dejar en los alcoholes más tiempo del necesario. Los tejidos podrían fijarse en una solución que no extraiga ni disuelva las grasas.

Las lecitinas, resinas, látex, ceras, cutículas y cloroplastos, adoptan un color rojo mate

Otras Coloraciones

Recuentos de fertilidad de pólen

1. Se procede a hervir flores cercanas a la antesis, con granos de polen maduros.
2. Se extraen las anteras, se las corta en dos partes en una gota de mezcla de Muntzing (1:1) de glicerina y carmín acético, este último se obtiene haciendo hervir 2 g de carmín en 100 ml de ácido acético 45%, se enfría y se filtra; o en azul de algodón en lactofenol. (ácido féncico cristalizado 8 g, ácido láctico 8 g, glicerina 16 g, agua destilada 8 ml, 5 g de azul de algodón y 100 g de lactofenol).
3. Se presionan las anteras sobre el portaobjeto, para liberar los granos de polen y luego se coloca el cubreobjeto.

Es importante dejar las preparaciones durante unas horas antes de la observación para lograr una mejor tinción de los granos de polen.

-Se debe realizar un recuento de los granos fértiles con respecto al total. Los granos fértiles se colorean intensamente tanto el citoplasma como el núcleo y son granos más grandes y de forma uniforme. Los granos estériles no se colorean o lo hacen débilmente, son más pequeños y de forma irregular.

La cuantificación debe hacerse entre 500-1000 granos. En especies fértiles, la fertilidad es mayor del 80%. Para híbridos los valores oscilan entre 0-40%.

Coloración de material diafanizado

Si se desea observar con nitidez la vascularización del material diafanizado, se puede colorear de la siguiente manera:

1. Alcohol 70% durante 10 minutos.
2. Solución saturada de safranina en alcohol 80%, en la que se deja el material hasta que el xilema se observe completamente teñido de rojo, lo que puede demorar de 15 a 20 minutos.

Limpieza del material de vidrio y Técnicas de montaje

Limpieza del material de vidrio

En el caso que portaobjetos y cubreobjetos sean nuevos se lavan con detergente y agua caliente, se enjuagan con abundante agua y se lo deja 24 h en mezcla sulfocrómica. Posteriormente se lava con abundante agua corriente y luego con agua destilada, para finalmente guardarlos en alcohol 50%. Una modificación a esta técnica se realiza de modo similar a lo descrito, pero obviando el paso por la solución sulfocrómica.

Mezcla sulfocrómica	
Bicromato de potasio	100 g
Ácido sulfúrico	100 g
Agua	1000 ml

Disolver el bicromato de sodio en agua y lentamente agregar, con agitación, el ácido sulfúrico. Preparar esta mezcla en un vaso de precipitado de vidrio al borosilicato, ya que el calor producido puede causar la rotura de envases de vidrio común. La mezcla sulfocrómica es sumamente corrosiva e higroscópica y debe ser almacenada en botellas con tapón de vidrio en un lugar seguro. Cuando la mezcla adquiere color

verde debe descartarse cumpliendo con las reglamentaciones vigentes sobre protección y seguridad del medio ambiente.

Técnicas de montaje

a) Preparados temporales o transitorios

En los preparados temporales se utiliza como medio de montaje agua-glicerina (1:1). Para evitar la contaminación, principalmente de hongos, se debe sellar los bordes del cubreobjeto con esmalte.

b) Preparados semidefinitivos

Los preparados semidefinitivos se montan en gelatina glicerinada. Con el material se procede de la siguiente manera:

Alcohol 70°	10 minutos
Safranina saturada en alcohol 80°	15-20 minutos
Alcohol 80°	5-10 minutos
Alcohol 70°	5-10 minutos
Alcohol 50°	5-10 minutos
Agua destilada	3-5 minutos

Se coloca, sobre el material, una pequeña cantidad de gelatina glicerinada (previamente fundida), y se coloca el cubreobjeto.

Gelatina Glicerinada: se disuelven 10 g de gelatina incolora en 60 ml de agua, luego se agregan 60 ml de glicerina. A 100 g de esta mezcla se le incorpora 0,1 g de fenol para evitar la descomposición. Se calienta a Baño María, removiendo constantemente hasta que se aclare. Luego se filtra en caliente a través de una lana de vidrio.

Los preparados montados en Gelatina Glicerinada deben ser sellados una vez que se endureció la gelatina, utilizando esmalte.

c) Preparados permanentes

En los preparados permanentes se utiliza como medio de montaje el Bálsamo de Canadá u otro medio sintético como el DPA. Con el material se procede de la siguiente manera:

Alcohol 70°	10 minutos
Safranina saturada en alcohol 80°	15 a 20 minutos
Alcohol 96°	5 a 10 minutos
Alcohol 70°	5 a 10 minutos
Xilol, dos cambios	5 minutos cada uno
Montaje en una gota de Bálsamo de Canadá natural o DPA	

Bálsamo de Canadá natural: resina que se obtiene de diversas coníferas. Se seca en contacto con el aire. Soluble en benzol, xilol, cloroformo, aceite de clavo, aceite de cedro, poco soluble en alcohol e insoluble en agua. Se utiliza como medio de montaje para preparados permanentes.

Actualmente se recomienda utilizar los medios sintéticos, dado que el bálsamo se torna amarillo con el tiempo.

Observación

El último paso de todo proceso histológico es la observación del resultado producido por la técnica aplicada al material vegetal en estudio. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm (poder de resolución: distancia mínima a la que se discriminan dos puntos), mientras que una célula eucariota típica suele tener dimensiones que oscilan entre 10 y 50 μm ($1 \mu\text{m}=10^{-3} \text{ mm}$), el diámetro de una mitocondria es de 0,1-1 μm . Además, si queremos estudiar la ultraestructura celular hay que tener en cuenta que el grosor de una membrana celular es de unos 5-10 nanómetros. Todo ello implica que necesitamos de microscopios que nos permitan aumentar la imagen para discriminar estructuras tisulares diminutas como son las células o sus compartimentos.

Instrumental óptico

Microscopio estereoscópico o lupa binocular, produce una imagen derecha y aumentada del objeto. Utiliza luz reflejada. La distancia focal es grande, lo que favorece la manipulación en el trabajo de cortes.

Microscopio óptico o de campo claro, utiliza la luz visible y lentes de cristal que permiten un aumento de las muestras de unas 1000 veces, con un poder de resolución de unos 0,2 micrómetros. Ésta es la máxima resolución que permite la luz visible por sus propiedades de onda. El microscopio óptico se usan para observaciones generales, características celulares y tisulares, este tipo de microscopio se encuentra presente en todos los laboratorios de histología vegetal.

Al microscopio óptico se le puede añadir dispositivos que permiten ampliar su potencialidad. Por ejemplo, se le puede adaptar una fuente luminosa y una serie de filtros para observar moléculas fluorescentes, o filtros para destacar cambios de densidad en el tejido, etcétera.

Microscopio electrónico, se basa en la alta frecuencia de los electrones para conseguir un poder de resolución de 1 nanometro. Se usa para observar la ultraestructura de la célula y los tejidos, es decir, para estudiar el nivel subcelular, como orgánulos, membranas u organizaciones moleculares (por ejemplo, se pueden observar los ribosomas). Hay dos tipos de microscopios electrónicos: de **transmisión**, que se usan para estudiar la ultraestructura de la célula en secciones muy finas, y el de **barrido**, que permite estudiar superficies.