

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

Tècniques senzilles d'obtenció de
preparacions vegetals

Autors: Mercè Dufort i Coll



 Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
Direcció General
d'Ordenació Educativa
Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

Pg. de la Vall d'Hebron, 64-70
08023 BARCELONA
Tel. 417.68.75/417.67.70

TÈCNiques SENZILLES D'OBTEncIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS

INTRODUCCIÓ

L'estudi de les estructures histològiques i citològiques dels vegetals és tècnicament més senzill que l'observació de material animal, ja que, amb habilitat, podem obtenir talls relativament fins sense necessitat de fer-ne inclusions; això és degut a la particularitat que tenen totes les cèl·lules vegetals de tenir parets cel·lulars, més o menys rígides, de cel·lulosa, lignina, cutina, suberina, segons llur categoria. Aquestes parets els donen una consistència i una duresa que fa possible l'obtenció de talls prou fins perquè puguin ser estudiats al microscopi. Cal tenir present que, en alguns casos, per a l'estudi d'unes determinades estructures no cal obtenir talls: amb raspats d'òrgans n'hi ha prou (és el cas del midó i dels tricomes).

Atès el títol del treball, descriurem solament aquelles tècniques que donen, generalment, bons resultats i que per dur-les a terme no cal tenir gaires instruments, i a més, són ràpides de fer.

I. ESTRUCTURES VEGETALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, NO CAL OBTENIR TALLS

Material tal com algues unicel·lulars o filamentoses, esporangis de falguera, fongs i bolets, grans de pol·len, tricomes, epidermis arrencades de fulles, etc., poden observar-se directament al microscopi posant-los amb una gota d'aigua entre portaobjectes i cobreobjectes. Algunes de les estructures esmentades tenen una coloració pròpia (espores, pol·len, tricomes) que permet de veure-les fàcilment. A les altres (diatomees i diverses algues unicel·lulars, etc.), en fer-ne l'observació, caldrà donar-los el màxim de contrast possible, mitjançant la tancada del diafragma i fent, en alguns casos, il·luminació obliqua, etc.

També és interessant l'observació en viu d'alguns orgànuls cel·lulars; així, hi ha materials propicis per a l'observació de cloroplasts, com ara els pèls estaminals de *Tradescantia* o bé, les fulles d'*Elodea*, en les quals, posades entre cobreobjectes i portaobjectes amb una gota d'aigua, podem observar com els cloroplasts són arrossegats pels corrents citoplasmàtics: moviment de **ciclosi**. Els cloroplasts destaquen per la forma i pel color verd que tenen.

Ara bé, si hom desitja obtenir preparacions permanents d'aquest tipus de material, en alguns casos caldrà fer una fixació prèvia en alcohol o formol al 6% i tot seguit hom podrà escollir diversos tipus de muntatge:

1. Posem el material en una gota de glicerina¹, de Höyer, d'albumina glicerinada, etc.
2. Primer el posem en una gota de goma aràbiga, el deixem assecar i seguidament hi posem una gota de bàlsam del Canadà i el cobreobjectes (aquesta tècnica fou proposada per Mossèn J. Pujula).
3. Deshidratem el material, és a dir, ho deixem:
 - de 5 a 10' en alcohol de 70°
 - de 5 a 10' en alcohol de 90°
 - de 5 a 10' en alcohol absolut
 - de 10 a 15' en essència (eucaliptus, creosota, etc.)
 - 5' en xilè (o toluè quan el muntatge és amb rhenohistol)
 - muntatge en una gota de bàlsam del Canadà, euparal, DPX o en qualsevol altre medi adient.²

1. Si el medi de muntatge és la glicerina, cal recordar que aquesta no s'asseca mai, per la qual cosa caldrà vorejar o cimentar la preparació mitjançant esmalt d'ungles, parafina fosa, etc. En cas de fer-ho en els altres medis de muntatge, hidrosolubles o no hidrosolubles, no cal fer aquest cimentat, ja que s'assequen.

2. El muntatge amb bàlsam és el recomanat, sempre que es pugui, car té un índex de refracció molt adequat per a les observacions microscòpiques habituals. (Vegeu al final.)

OBTENCIÓ I PREPARACIÓ PERMANENT DE DIVERSOS TIPUS DE MATERIAL

• Diatomees

Per fer preparacions de diatomees, podem partir d'una gota d'aigua dolça o marina que, després d'haver estat observada directament, ens hagi permès de veure que tenia algues d'aquest tipus, o bé, mostres de fitoplàncton que, prèviament, s'eluiran una mica amb aigua.

La gota d'aigua amb diatomees es deixarà assecat sobre un portaobjectes i, quan s'hagi evaporat l'aigua, hi posarem una gota de bàlsam.

També es poden provar altres medis de muntatge, de tipus Hyrax.

Una altra font que ens fornirà diatomees és la «diatomita» o terra de diatomees: en aquest cas, el material ja és sec, i pot anar directament al medi de muntatge desitjat.

• Esporangis de falguera

Raspem delicadament els sorus d'una falguera tendra o seca sobre una gota de goma àrbiga.

Escampem el material amb una agulla.

Deixem assecat la goma i hi posem la gota de bàlsam del Canadà.

En fer l'observació microscòpica, veurem esporangis: els uns sencers, els altres trencats; també espores dins dels esporangis o bé lliures. Aquests últims, és interessant d'observar-los a grans augments.

• Hifes i esporangis de fong

Deixant un tros de pa en un ambient humit, al cap d'una setmana surt un material vellutat, negre verdós: són les hifes de *Mucor mucedo* o de *Rhizopus nigricans*.

Dels fruits que es floreixen, en surten igualment uns altres fongs.

Agafem aquesta pelusa i la fixem amb alcohol de 70°.

La podem muntar amb el medi que vulguem (normalment glicerina o bé, gelatina glicerina-da).

Advertiment: Després de la fixació, hi podem fer una tinció de 5 a 10' en blau de metilè o amb blau cotó al 0,5% o bé, en fucsina àcida a l'1% durant 5'. Ara bé, normalment les hifes i els esporangis tenen pigmentació pròpia, i aquest pas pot no fer-se.

• Espores de bolet

Si el material és fresc, cal disgregar les làmines sobre un portaobjectes, dins d'una gota de goma àrbiga i seguir la tècnica ja descrita.

Si el material és sec, cal deixar trossos de làmines dins d'amoníac durant uns minuts (de 5 a 10), amb la qual cosa s'inflen. Tot seguit hom fa un rentatge amb aigua i el muntatge que vulguem.

• Pol·len

Espolsem anteres madures de la planta escollida dins d'una botella que tingui alcohol de 70° o de 90°, a fi de fixar i conservar el material. Podem considerar com a temps normal de fixació unes 24 hores.

Abans de muntar-les, cal fer un rentatge amb aigua destil·lada. Prèviament decantarem l'alcohol i hi posarem tot seguit l'aigua; això, si el medi de muntatge escollit ha estat un medi aquós. Si volem muntar amb bàlsam, cal seguir els passos indicats anteriorment.

Advertiment: Els grans de pol·len solen tenir una pigmentació variable, segons les plantes, a causa de la composició química de l'exina (capa exterior molt gruixuda de la cèl·lula reproductora masculina), per la qual cosa no cal tenyir-los.

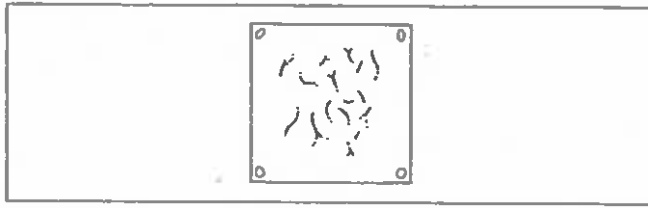
Recomanem: Fer observacions de pol·len de pi (per les vesícules aeríferes o flotadors que té), i també el de la carabassa, per la morfologia de l'exina i perquè és fàcil l'observació dels porus germinatius operculats.

• Tricomes

Les tiges i fulles són cobertes de pèls, més o menys abundants, extraordinàriament polimorfs (estrellats, esquamiformes, peltats, etc.) i llur estudi ens permetrà, una vegada més, comprovar a nivell cel·lular la gran variabilitat existent a la natura.

Com a material, cal escollir, lògicament, plantes pubescents, vellutades, llurs fulles i tiges han de ser rascades suaument i hom podrà fer-ne un muntatge amb aire o bé en un dels medis citats.

Advertiment: El muntatge amb aire consisteix a posar directament el cobreobjectes sobre el material. Perquè s'aguanti, cal posar gotetes de bàlsam a cada costat o bé vorejar-lo amb esmalt.



Aquest material no cal fixar-lo, ja que, generalment, els tricomes són formats per una o diverses cèl·lules mortes.

Molt curiosos són els tricomes estrellats d'*Eleagnus angustifolia*, els de la fulla d'olivera, d'alzina, etc.

És particularment interessant l'estudi dels estomes d'epidermis foliars. Arranquem amb compte l'epidermis de fulles; les monocotiledònies, pel fet d'ésser paral·lelinèrvies, ho permeten bé.

Fixem aquesta pell arrencada amb alcohol de 70°; com que és tan prima, amb 10' n'hi ha prou.

Ho tenyim amb hematoxilina, o bé amb blau de metilè al 0,1%, violeta de genciana a l'1%, amb qualsevol altre colorant nuclear i de la cel·lulosa, durant 5'.

Ho rentem durant 5' en aigua destil·lada.

5' en eosina.

Deshidratació i muntatge.

Advertiment: La pell arrencada i muntada directament sobre una gota d'aigua es veu, observada amb poca llum, força bé.

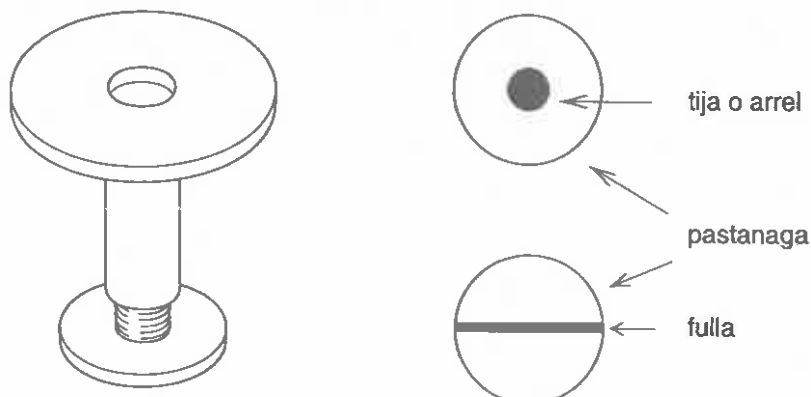
Recomanem l'epidermis de fulla de liri i l'epidermis de les fulles carnoses de la ceba. Són molt curiosos els estomes de les fulles de gramínies i de fulles d'*Agave americana* o de plantes similars.

II. ESTUDI DE TALLS VEGETALS

Per a l'estudi histològic de fulles, tiges i arrels, cal obtenir talls que siguin com més fins millor.

L'obtenció d'aquests talls es fa per la tècnica de la mà alçada, o bé mitjançant un micròtom de mà.

Tant en l'un cas com en l'altre, generalment és necessari fer una englobació de l'òrgan en qüestió, és a dir, es rodeja amb medul·la de saüc (mètode tradicional), o bé amb pastanaga (patata, rave, etc.) per augmentar la superfície i la consistència del material, a fi que es talli més bé. Tot seguit podem passar a tallar amb una navalla histològica, o bé prèviament posar el material així englobat en un aparell molt senzill: el micròtom de mà o de RANVIER.



Cal recordar que la navalla histològica i el material a tallar han de mullar-se (lubrificar-se) amb alcohol de 70°.

Els talls es deixen en aigua i, posteriorment, se seleccionaran els més fins per tenyir-los. El material a tallar pot haver estat prèviament fixat en alcohol de 90° o en formol al 6%.

Advertiment: Si hom vol, els talls obtinguts poden deixar-se durant 10' en hipoclorit de sosa (Ileixiu) calent per destruir-ne el contingut cel·lular, així se'n conserven únicament les parets cel·lulars i en surten les preparacions més «netes».

Tot seguit cal rentar els talls durant 10' en aigua corrent abundant.

Seguidament, hom escull la tècnica de tinció.

Si no és per a un cas concret, sempre és millor deixar les estructures citoplasmàtiques, ja que és molt més il·lustrativa l'observació.

Per obtenir seccions més fines es pot recórrer al micròtom de congelació, adient en el cas d'estructures un xic gruixudes, tiges, arrels, etc.

Amb meristems radicals o caulinars, brots, com també fulles, és a dir, òrgans «tendres» podem fer una *inclusió en parafina*, amb la qual s'obtenen talls de l'ordre de 2 a 7 micròmetres de gruix.

Els òrgans vegetals formats per teixits heterogenis, amb quantitats importants de colènquima i esclerènquima i amb feixos de vasos considerables, és a dir, l'estructura que trobem en tiges i arrels de creixement secundari, presenten la dificultat que no deixen penetrar bé la parafina; per això, és difícil d'obtenir-ne bones inclusions si no disposem d'una estufa amb la qual es pugui fer el buit.

TINCIONS RECOMANADES

Semblen especialment recomanables per la informació considerable que donen i per llur senzillesa i rapidesa les tincions que enumerem a continuació.

Els temps que indiquem per a cada tècnica són els temps mínims en l'operació de la deshidratació i el temps convenient en la tinció; ara, aquest temps òptim, cal tenir-lo en compte en aquelles tincions de tipus progressiu, és a dir, en aquelles en què no es pot tornar enrere, mentre que pot ésser augmentat en aquelles tincions de tipus regressiu. De tota manera, aquest temps, convé ajustar-lo per al colorant preparat per cadascú, ja que també depèn del temps que faci que sigui preparat, i tenyirà més o menys segons el tipus de solució colorant preparada.

La sobretinció difícilment té esmena, mentre que amb una tinció feble, si en el moment de l'observació microscòpica tenim la precaució de graduar la llum convenientment, tancant el diafragma, podrem millorar considerablement la informació que ens doni.

• Tincions temporals

a) **PANORÀMIQUES**, recomanades per a tinció de talls de fulles, tiges i arrels.

Cloro-iodur de zinc: 10' en una solució de cloro-iodur de zinc.

Muntem els talls en una gota del mateix colorant, o bé en una gota d'aigua destil·lada.

Resultats: cel·lulosa blau violeta
lignina groga
midó blau fosc

b) **ESPECÍFIQUES**

Midó: Tinció sobre talls de patata, o bé de raspats.

Deixem actuar el LUGOL durant uns segons (tinció progressiva) fins que els talls agafin una tonalitat blau violeta.

Ho rentem amb aigua destil·lada.

Ho muntem en una gota d'aigua.

Advertiment: L'observació de raspats de patata muntats en una gota d'aigua, sense tinció prèvia, és molt interessant, ja que, diafragmant molt, es veuen molt bé l'«hilio», i les línies de creixement. Aquest és el tipus de muntatge més adequat per a l'observació amb llum polaritzada.

Cromosomes: Brots tendres de tiges o les puntes d'arrel de ceba o d'unes altres plantes es posen en un vidre de rellotge amb orceïna acètica.

Agafat amb pinces de fusta, es fa escalfar fins a l'emissió de vapors.

Enretirem el vidre i ho deixem refredar una mica.

Repetim dues vegades més la mateixa operació.

Muntem els meristemes tenyits així amb una gota d'orceïna «nova» (no escalfada). Hi posem els creobjectes i tot seguit procedim a l'escalfament («squash»).

Variant: La primera orceïna, és a dir, la que es fa esclafar, és la coneguda com orceïna «A» (orceïna acètica més àcid clorhídric). La que es fa servir per a muntar és l'orceïna «B» (és a dir, l'orceïna acètica sense àcid clorhídric).

Advertiment: Aquest tipus de preparació es guarda 5 o 6 dies a la nevera. Alguns autors diuen que, després de deixar-la en el congelador de la nevera, cal aixecar amb molta precaució el cobreobjectes, deshidratar el material i muntar-la definitivament amb bàlsam del Canadà, o bé directament, amb una gota de glicerina, i cimentar-lo. Es conserva així alguns anys.

• Tincions i preparacions permanents

a) **PANORÀMIQUES**, recomanades per a tinció de talls de fulla, de tija i d'arrel.

- **Fabil** • de 10 a 20' en líquid de Fabil
- ho rentem amb aigua destil·lada
- ho muntem en una gota de glicerina
- cimentem el cobreobjectes amb laca

Resultats:

| | |
|--------------------------|---------|
| cel·lulosa..... | blau |
| lignina..... | vermell |
| nucli i cloroplasts..... | vermell |
| midó..... | blau |

Advertiment: A la llarga, la preparació perd color.

• Mètode de VAN GIESON o tinció amb picrofucsina

- 15' en picrofucsina (sobretinció)
- 3-4 rentatges de 5' en alcohol de 90 o 96°, fins que l'alcohol deixi de ser tenyit.
- de 5 a 10' en alcohol absolut
- de 10 a 15' en essència (d'eucaliptus, llorer, creosota, etc.)³
- 5' en xilè
- ho muntem amb una gota de bàlsam del Canadà o amb qualsevol altre medi de muntatge d'aquest ipus.

Resultats:

| | |
|--------------------------|----------|
| cel·lulosa..... | vermell |
| lignina..... | groc |
| nucli i cloroplasts..... | vermells |

• Hematoxilina - Picrofucsina

- de 5 a 6' en hematoxilina (de Delafield o de Friedlander, etc.)
- 10' rentat amb aigua corrent, ja que les sals minerals de l'aigua provoquen el viratge o canvi de color de l'hematoxilina, que passa d'un color vermellós a un color blau violeta
- 10' en picrofucsina
- 3 o 4 rentatges amb alcohol de 90 a 96°, fins que l'alcohol deixi de tenir color
- ho acabem de deshidratar i ho muntem amb bàlsam, segons la tècnica ja esmentada

Resultats:

| | |
|------------------|----------|
| cel·lulosa..... | blau |
| lignina..... | groc |
| nuclis..... | blau |
| cloroplasts..... | vermells |

• Blau de metilè - Picrofucsina (tècnica molt semblant a l'anterior)

- 5' en blau de metilè a l'1%
- diversos rentatges amb aigua destil·lada, fins que no deixi de tenir color
- 10' en picrofucsina

3. Aquest pas per l'essència pot suprimir-se i allargar l'estada en el xilè a 10 minuts. En el cas que els talls haguessin quedat excessivament tenyits, caldrà deixar-los en essència i, fins i tot, allargar el temps a una hora.

- rentatge amb alcohol de 90 o 98° fins que deixi de tenir color
- ho acabem de deshidratar i ho muntem amb bàlsam, segons la tècnica ja esmentada

Resultats: cel·lulosa blau
 lignina verd
 nucli i cloroplasts vermells

- **Hematoxilina - Eosina** (doble tinció molt utilitzada en tècnica animal, també pot fer-se servir en histologia vegetal)

- 5' en hematoxilina
- 10' rentat amb aigua corrent
- 5' en eosina o eritrosina a l'1%
- 5' en alcohol de 70°
- de 5 a 10' en alcohol de 90°
- de 5 a 10' en alcohol absolut
- essència, xilè, bàlsam del Canadà

Resultats: cel·lulosa blau fort
 lignina rosa
 nucli i cloroplasts blavosos

- **Negre de chlorazol** (tinció recomanada per la seva especificitat envers la quitina; per tant, és molt adient per al tractament de les hifes dels fongs i bolets).

- 10' en negre de chlorazol (solució alcohòlica saturada)
- ho rentem amb alcohol de 90°
- de 5 a 10' en alcohol absolut
- de 5 a 10' en essència
- xilè i bàlsam del Canadà o similar

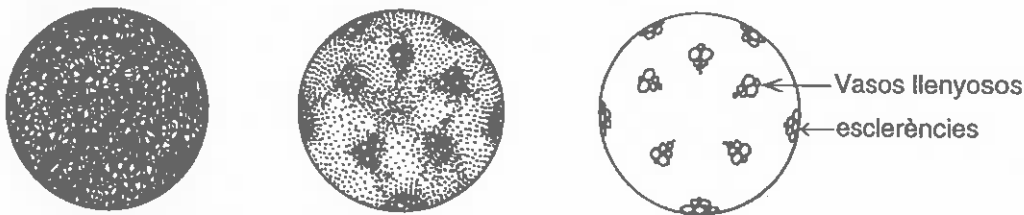
Resultats: quitina negre intens

- **Roig de ruteni** (tinció específica per als pectats de la làmina mitjana)

- 10' en roig de ruteni al 0,5%
- 5' rentat amb aigua destil·lada
- deshidratació
- ho muntem amb bàlsam del Canadà o equivalent

- **Tionina-Hematoxilina** (segons la tècnica de FERNÁNDEZ-GALIANO)

- 5' tionina a l'1% o 2% (si augmentem el temps, no passa res, ja que és una tinció regressiva)
- diferenciem en HCl al 50%: no hi ha temps; cal vigilar fins que només es vegin les àrees lignificades.⁴



- ho rentem amb aigua abundant bo i agitant, de 5 a 10'
- 5' en hematoxilina
- ho rentem 5' en aigua destil·lada⁵

4. A vegades hom fa una sobretinció; després es «diferencia», és a dir, és destenyit de mica en mica —en aquest cas amb HCl— fins que tot queda destenyit, menys les regions lignificades, a les quals, pel fet de tenir molta afinitat per la tionina, costa més de perdre el color. Quan només es veuen unes àrees verdoses, uns punts foscos, cal frenar la diferenciació i rentar-ho amb aigua abundant.

En alguns casos, la diferenciació se segueix al microscopi, com és el cas de la tinció de cromosomes per la tècnica de l'hematoxilina fèrrica de HEIDENHEIN.

5. Normalment, després de tenyir amb hematoxilina, hom fa un rentatge amb aigua corrent, de l'aixeta, per provocar el viratge anteriorment esmentat. Ara, en aquest cas, no ens convé que viri, ja que si conserva el color vermellós, tindrà més contrast amb el blau verd de la tionina.

- deshidratació: amb la sèrie d'alcohols, ho passem per l'essència, xilè i, finalment, ho muntem amb bàlsam

Resultats: cel·lulosa..... vermell
lignina..... blau verd

• **Safranina - Blau de metilè**

- de 15 a 30' amb safranina al 2%
- ho diferenciem amb alcohol-clorhídric (100 cc d'alcohol de 70° més 25 cc de HCl)
No hi ha temps; cal esperar que només hi quedin uns punts vermells que corresponen a les regions lignificades.
- ho rentem amb aigua de 5 a 10'
- ho tenyim amb blau de metilè al 2% i ho escalfem fins que se'n desprenguin vapors
- ho rentem 5' amb aigua destil·lada bo i agitant els talls
- deshidratació i muntatge

Resultats: cel·lulosa..... blau
lignina..... vermell fort

b) **MOLT ESPECÍFIQUES**

• **Hematoxilina fèrrica de HEIDENHAIN**

Malgrat que no és un mètode ràpid, el descriurem pels seus òptims resultats. Els meristems, siguin d'arrel o de brots caulinars o foliars, són fixats en alcohol de 90° o absolut (l'alcohol és un bon fixador dels nuclis i dels cromosomes), o bé amb CARNOY (cloroform, alcohol absolut i àcid acètic, en la proporció de 3:6:1). El temps de fixació és de 13 a 24 hores.

Calen talls molt fins, d'uns 10 microns, per la qual cosa cal fer una inclusió en parafina. Obtinguts els talls mitjançant un micròtom adient, els desparafinem i hidratem seguint el procés habitual que, molt esquematitzat, és:

- 30' en xilè
- 10' en alcohol absolut
- 10' en alcohol de 90°
- 10' en alcohol de 70°
- 10' en aigua destil·lada
(fins ací és la tècnica habitual)
- de 12 a 24 hores en sulfat fèrric amònic al 5% (alum de ferro) (fa de mordent)
- rentatge ràpid amb aigua destil·lada
- de 12 a 24 hores en hemotoxilina de HEIDENHEIN (tinció regressiva, és a dir, es fa una sobretinció)
- cal diferenciar amb alum de ferro al 2,5%, sota microscopi, fins que dins dels nuclis es vegin els cromosomes.
- 30' rentat amb aigua corrent
- 5' rentat amb aigua destil·lada
- deshidratació habitual, essència, xilè i, finalment, bàlsam del Canadà.

Aquesta tinció és permanent i dóna imatges molt interessants dels nuclis de les cèl·lules en repòs i dels cromosomes de les que estan en divisió.

• **Hematoxilina de Groat - Picrofucsina**

Mètode que pot substituir perfectament el de la tinció amb l'hematoxilina fèrrica de HEIDENHAIN. Dóna imatges molt bones dels cromosomes i té el gran avantatge de ser molt més ràpid.

És convenient d'aplicar-lo sobre talls obtinguts per inclusió en parafina.

- 15' en hematoxilina de Groat
- 10' rentat amb aigua corrent
- 3' en picrofucsina, que actua com a agent diferenciador.

• **Hematoxilina de Weigert**

- de 20 a 30' en hematoxilina de Weigert
- rentat durant 10' en aigua corrent

- deshidratació
- muntatge

Aquest mètode és en la línia del procedent. És recomanat per a la visió de figures de mito-
si i té el gran avantatge que és ràpid.

- **SUDAN III** (per a la tinció específica del súber o suro)
 - de 10 a 15' en Sudan III
 - rentatge ràpid en alcohol de 70°
 - rentatge amb aigua destil·lada
 - ho muntem amb glicerina i cimentem el cobreobjectes.

PREPARACIÓ DE REACTIUS

- **Lactofenol d'Amann** (100 cc)

| | |
|-------------------------|-------|
| àcid fènic | 10 gr |
| àcid làctic | 10 gr |
| glicerina | 20 gr |
| aigua destil·lada | 10 cc |

- **Blau de metilè** (específic del nucli i de la cel·lulosa)

| | |
|-------------------------|--------|
| blau de metilè | 1 gr |
| aigua destil·lada | 100 cc |

- **Cloro-iodur de Zinc** (líquid de Schultze)

| | |
|-------------------------|-------|
| clorur de zinc | 30 gr |
| iodur potàssic | 5 gr |
| iode | 1 gr |
| aigua destil·lada | 15 cc |

- **Eosina o Eritrosina**

| | |
|--|--------|
| eosina | 1 gr |
| aigua destil·lada | 100 cc |
| (una vegada dissolta l'eosina s'hi tira un parell de gotes d'àcid acètic). | |

- **Fabil**

Solució A:

| | |
|----------------------|--------|
| blau d'anilina | 0,5 gr |
| lactofenol | 100 cc |

Solució B:

| | |
|----------------------|--------|
| fucsina bàsica | 0,5 gr |
| lactofenol | 100 cc |

Solució C:

| | |
|----------------------|--------|
| iode | 0,3 gr |
| iodur potàssic | 0,6 gr |
| lactofenol | 100 cc |

Barregem:

| | |
|---------------------------------|--------|
| sol. A | 80cc |
| sol. B | 20 cc |
| sol. C | 100 cc |
| (la conservació és indefinida). | |

- **Hematoxilina**

Hematoxilina de Delafield

Solució A:

| | |
|-----------------------|-------|
| hematoxilina | 4 gr |
| alcohol absolut | 25 cc |

Solució B:

| | |
|---|--------|
| sulfat alumínic amònic (alum amoniacal) | 40 gr |
| aigua destil·lada | 400 cc |
| Barregem la solució A amb la B. Al cap de quatre o cinc dies, la filtrem i hi afegim: | |
| glicerina | 100 cc |
| alcohol metílic | 100 cc |

Passats quatre o cinc dies, la filtrem i ja es pot fer servir. Conservació il·limitada.

Abans de fer-la servir la diluïrem a la meitat amb aigua destil·lada i la filtrarem una altra vegada.

Hematoxilina de Friedlander

Solució A:

| | |
|-----------------------|--------|
| hematoxilina | 2 gr |
| alcohol absolut | 100 cc |

Solució B:

| | |
|--|--------|
| sulfat alumínic potàssic (alum potàssic) | 2 gr |
| aigua destil·lada | 100 cc |
| glicerina | 100 cc |

Barregem la solució A amb la B. La deixem catorze dies en una botella, sense tancar, perquè l'hematoxilina s'oxidi, és a dir, «maduri». Com més vella, millor. Filtrem i, abans de fer-la servir, la diluïrem a la meitat.

Hematoxilina de Groat

Solució A:

| | |
|--|--------|
| àcid sulfúric concentrat | 0,8 cc |
| sulfat fèrric amònic (alum fèrric) | 1 gr |
| aigua destil·lada | 50 cc |

Solució B:

| | |
|----------------------|--------|
| hematoxilina | 0,5 gr |
| alcohol de 96° | 50 cc |

Barregem la solució A amb la B. Passades una o dues hores, ho filtrem i ja es podrà fer servir.

Es conserva uns tres mesos, per la qual cosa és millor preparar-ne poc i sovint.

Hematoxilina de Heidenhain (hematoxilina fèrrica)

Solució mare:

| | |
|-------------------------|-------|
| hematoxilina | 1 gr |
| alcohol absolut | 10 cc |
| aigua destil·lada | 90 cc |

Aquesta solució mare ha de madurar durant un mes. Abans de fer-la servir, la diluïrem a la meitat.

Hematoxilina de Weigert

Solució A:

| | |
|----------------------|--------|
| hematoxilina | 1 gr |
| alcohol de 96° | 100 cc |

Solució B:

| | |
|--------------------------|-------|
| perclorur de ferro | 4 gr |
| àcid clorhídric | 1 gr |
| aigua destil·lada | 95 cc |

La solució A ha de madurar durant un mes, dins d'una botella oberta.

Les solucions A i B es guarden per separat, i deu o quinze minuts abans de fer servir el colorant es barregen a parts iguals. Aquesta solució no es conserva més de vint-i-quatre hores.

• **Lugol (solució iodo-iodurada) (específic per al midó)**

| | |
|--------------------------|--------|
| negre de chlorazol | 1 gr |
| iodur potàssic | 2 gr |
| aigua destil·lada | 100 cc |

- **Negre de chlorazol** (específic de la quitina)

| | |
|----------------------|--------|
| iode | 1 gr |
| alcohol de 70° | 100 cc |

Amb què obtenim una solució saturada del colorant. Caldrà filtrar-la sempre abans de servir-se'n.

- **Orceïna**

a) Preparació en fred

Solució mare:

| | |
|-------------------|-------|
| orceïna | 1 gr |
| àcid acètic | 45 cc |

Abans de fer-la servir, la diluïrem a la meitat amb àcid acètic.

b) Preparació en calent

Solució mare:

| | |
|-------------------|--------|
| orceïna | 0,4 gr |
| àcid acètic | 45 cc |

La deixem refredar i hi afegim àcid acètic fins a tenir 9 cc de solució; seguidament, hi afegim 20 cc d'aigua destil·lada. La filtrem i es conserva indefinidament.

És la solució mare.

Si a la solució mare d'orceïna, preparada d'una manera o altra s'hi afegeix HCl en la proporció de 9:1, tenim la solució A de la tècnica descrita anteriorment.

La solució B és la solució d'orceïna diluïda a la meitat.

- **Picrofucsina**

fucsina àcida a l'1% amb aigua destil·lada..... 10 cc

àcid pícric en solució aquosa saturada..... 100 cc

La conservació no és il·limitada; dura de 8 a 10 mesos, és millor preparar-ne poc i sovint.

- **Roig Congo**

roig Congo..... 0,5 gr

aigua destil·lada..... 100 cc

- **Roig de ruteni** (específic de la pectina)

roig de ruteni..... 0,5%

aigua destil·lada..... 100 cc

Atès que és un reactiu molt car, és possible preparar-lo al 0,01% i duplicar-ne o triplicar-ne el temps d'actuació.

- **Safranina** (específic de la lignina)

safranina..... 1 gr

aigua destil·lada..... 100 cc

- **Sudan** (específic per tenyir lípids)

Solució saturada amb alcohol de 70° (la qualitat depèn de la marca del colorant)

- **Tionina** (específic de la lignina)

tionina..... 1 o 2 gr

aigua destil·lada..... 100 cc

Advertiment: Si no diem el contrari, la conservació del colorant és il·limitada. En alguns casos, com més temps fa que el colorant és preparat, més bé tenyeix, com és el cas de les hematoxilines. És convenient guardar-los en botelles òpals.

Si no diem el contrari, acabat de preparar el colorant ja es pot fer servir; tanmateix, és més recomanable la preparació d'un dia per l'altre. A excepció de les hematoxilines, que han de «madrar». És convenient filtrar els colorants abans de fer-los servir.

Nòtula: En els darrers anys diverses cases comercials han elaborat, amb èxit, solucions tintorials ja preparades per fer servir. L'únic inconvenient és que surten més cares.

MEDIS DE MUNTATGE MÉS EMPRATS PER FER PREPARACIONS PERMANENTS

Hidrosolubles

Aquatex
Gelatina glicerina
Glicerina
Goma aràbiga
Lactofenol

No hidrosolubles

Bàlsam del canadà (és el medi de muntatge més clàssic)
Clearium
DPX (asseca molt ràpidament i solament és idoni per muntar els talls de meristems)
Hyrax
Mycromount

Muntatge doble amb:
goma aràbiga-bàlsam

Recordem que, en casos especials, és interessant muntar amb aire (tricomes, suro, etc.).
L'elecció del medi de muntatge és condicionada per diverses motivacions, una de les quals és la rapidesa en el procés. Els medis hidrosolubles són els més adients, ja que no cal deshidratar el material. Ara, a part de la rapidesa, allò fonamental a tenir en compte, és l'índex de refracció, la qual cosa va íntimament relacionada amb el tipus d'estructura a preparar.

A continuació, indiquem alguns índex de refracció dels medis més emprats:

| | | | |
|-------------------|------|-------------|------|
| Lactofenol..... | 1,44 | Bàlsam..... | 1,53 |
| Glicerina..... | 1,49 | DPX..... | 1,55 |
| Oli de cedre..... | 1,51 | Hyrax..... | 1,60 |
| Clorofenol..... | 1,52 | | |

ON RECÓRRER PER TROBAR:

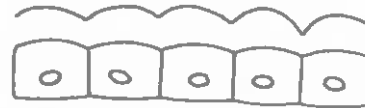
- **Epidermis cutinitzada**

fulles: *Nerium*, *Eucalyptus*
tiges: *Ruscus*, *Olea*, etc.



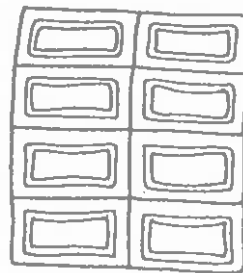
- **Epidermis cerificada**

fulles: *Ficus* i semblants, clavell, ...
tiges: clavell, roser



- **Epidermis mineralitzada**

fulles: Equisets, gramínies
tiges: Equisets, gramínies



- **Epidermis suberificada**

tiges: qualsevol que presenti creixement secundari
arrels: pràcticament totes
fulles: no s'empren mai



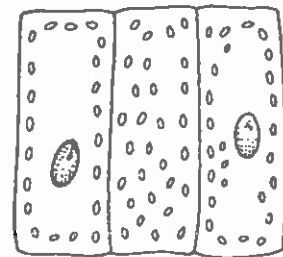
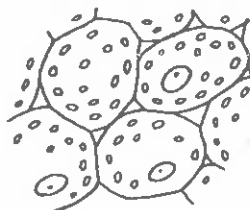
- **Parènquima clorofil·lic**

fulles: a l'anvers parènquima en palissada
al revers parènquima de cèl·lules rodones

Si la fulla no té simetria bilateral, no hi haurà difències histològiques entre les dues cares de les fulles, *Viscum album* (vesc).

El primer cas és el més freqüent.

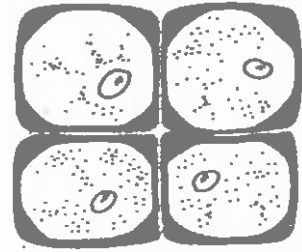
tiges: Normalment sota l'epidermis hi ha una o dues capes de colènquima i tot seguit ve el parènquima clorofil·lic de cèl·lules rodones.



La biodiversitat d'espècies és tan gran que l'experiència indica que hi ha nombroses variacions al model tradicional que indiquen els llibres. Per exemple, en el cas de la tija del fonoll, *Foeniculum vulgare*, sota l'epidermis biseriada hi ha nòduls de colènquima o d'esclerènquima que separen franges per dues capes d'un parènquima clorofil·lic en palissada.

• **Colènquima**

- fulles: Poc freqüent (*Ficus Olea* pel que fa al nervi central)
- tiges: Molt freqüent, acostuma a ser sota l'epidermis, formant una o dues capes. Les tiges fistonades, en cada sortint, presenten acúmuls de colènquima, de tipus perifèric o de tipus angular.
Tiges de julivert, d'api, d'ortiga, etc.



• **Esclerènquima**

- fulles: Quasi mai; ara, a la fulla de pi, sota mateix de l'epidermis, hi ha una capa d'esclerènquima ben desenvolupada, és la hipodermis. També n'hi ha entre l'epidermis i els feixos de vasos conductors de les fulles de les monocotiledònies en general.
Al nervi central de la fulla magnòlia trobem una magnífica anella d'esclerènquima envoltant els feixos vasculars.

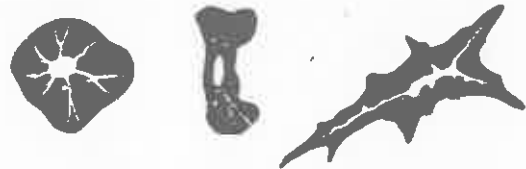


- tiges: Molt freqüent sota l'epidermis (fonoll), o bé entre els vasos llenyosos, on constitueixen una franja contínua (vinya). Acompanyant els feixos de vasos conductors, sempre acostuma a haver-hi esclerènquima.

Segons l'edat de l'òrgan vegetal en estudi, i també segons l'hàbitat, podem trobar colènquima en una zona determinada. Posteriorment, en el mateix indret podem trobar esclerènquima, ja que aquest teixit pot derivar de l'altre. Els feixos vasculars acostumen a anar protegits pels teixits esquelètics: colènquima i esclerènquima.

• **Cèl·lules pètries**

- fulles: No gaire freqüent (*Camellia japonica*)
- fruits carnosos: la pera i la poma i, sobretot, el codony són un bon lloc per trobar-ne.
L'observació detinguda de les parets de les cèl·lules pètries permet veure-hi els plasmodemes.



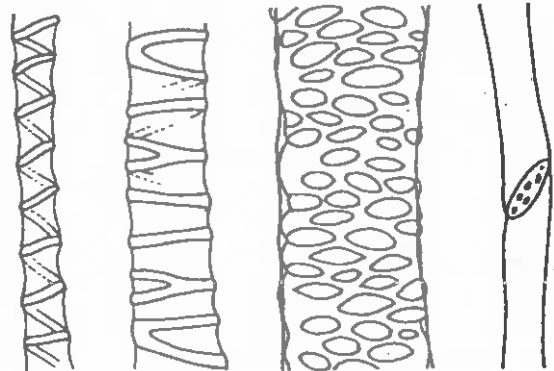
• **Vasos conductors**

Fulles, tiges i arrels.

Són interessants les seccions transversals de fulles de nerviació no paral·lelinèrvia, ja que ens permetran veure talls transversals i longitudinals dels vasos.

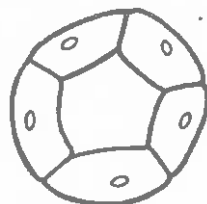
Els talls longitudinals són particularment interessants per veure la morfologia dels vasos llenyosos (espiralats, anellats, puntejats, escale-riformes, etc.), i també per poder estudiar els vasos crivellats.

Recomanem les tiges de cucurbitàcies per estudiar els feixos de vasos bicollaterals.



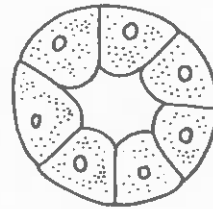
• **Conductes reinífers**

Fulles i tiges de pi i d'avet.



- **Conductes d'essència**

Talls de fulles i tiges de plantes aromàtiques (romaní, espígol, api, julivert, etc.)



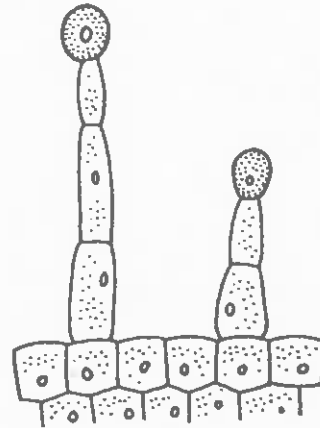
- **Bosses d'essència**

Fulla de taronger, llimoner, d'eucaliptus, etc.



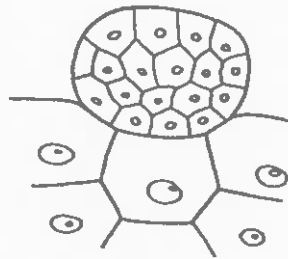
- **Glàndules peltades**

Fulles, a l'epidermis, sobretot de plantes aromàtiques (romaní, espígol, etc.).



- **Glàndules sèssils**

Fulles, a l'epidermis (gerani, romaní, etc.).



- **Estomes**

Fulles (epidermis) i tiges sense creixement secundari.

- **Cambres estomàtiques**

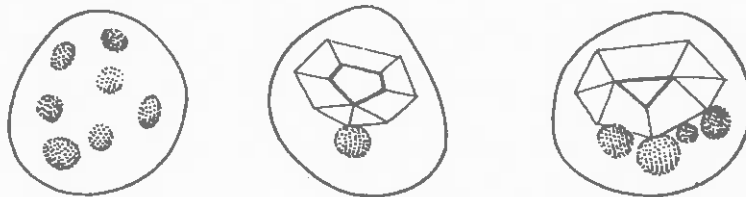
Fulles: epidermis del revers. El cas més típic és el del baladre (*Nerium oleander*).

- **Lenticel·les**

Epidermis suberificades de tiges: rosers, patata, etc.

- **Midó**

Tubercles i d'altres òrgans de reserva: patata, pastanaga, plàtan.



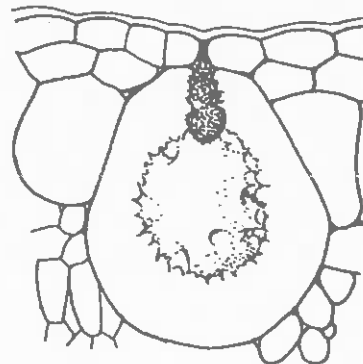
- **Aleurona**

Llavor de ricí.

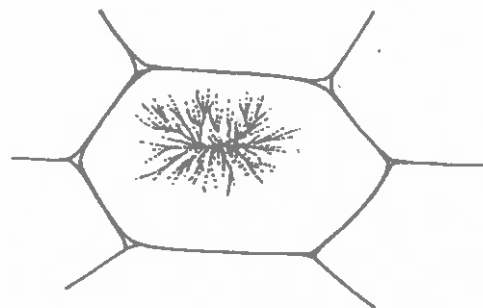


- **Cristalls**

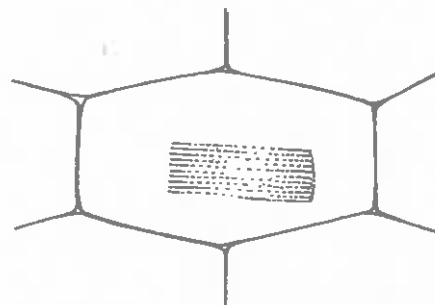
Cistòlits: un nivell de l'epidermis de fulles de *Ficus*, *Parietaria officinalis*, ortiga.



Druses de carbonat i d'oxalat càlcic: Fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben a nivell del parènquima no clorofil·lic (*Magnolia*, *Lonicera*, *Vitis*, etc.).



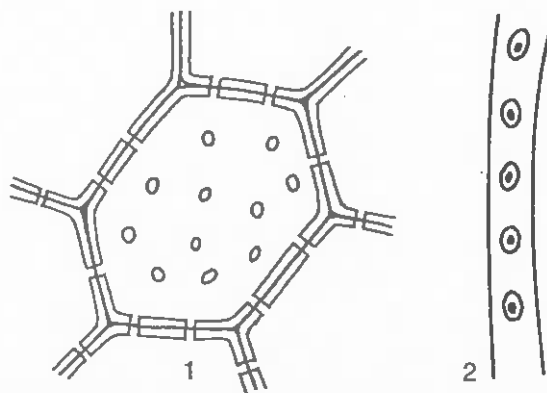
Rafidis: Fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben en parènquima no clorofil·lic. Vinya (*Vitis vinifera*).



• **Puntuacions paret cel·lular**

1 senzilles: Medul·la de saüc (*Sambucus nigra*), de *Ruscus aculeatus*

2 aerolades: Fusta de pi



Advertiment: Als dibuixos, les línies gruixudes representen engruiximents de les parets cel·lulars; aquests engruiximents són específics de cada tipus de teixit.

Nòtula: Recomanem treballar amb espècies autòctones de l'àrea mediterrània. És altament interessant fer deduccions de les adaptacions tissulars als hàbitats en què viuen els exemplars estudiats.

BIBLIOGRAFIA

- BERNIS MATEU, J. (1976). «Atlas de Microscopia», Ed. Jover, Barcelona.
- BRACEGIRLE, B.; MILES, P.H. (1975). «Atlas de estructura vegetal». Ed. Paraninfo, Madrid (per interpretar).
- ESAU, K. (1985). «Anatomía vegetal», Ed. Omega, Barcelona.
- GARCÍA ESTEBAN, L.; GUINDEO, A. (1988). «Anatomía e identificación de las maderas de coníferas españolas». Aitim., Madrid.
- GARCÍA ESTEBAN, L.; GUINDEO, A. (1988). «Anatomía de frondosas españolas». Aitim., Madrid.
- JOHANSEN, D.A. (1940). «Plant Microtechnique». McGraw-Hill Book, Co. Inc. (part tècnica).
- KROMMENHOEK, W.; SEBUS, J. VAN ESCH, G.J. (1985). «Atlas de histología vegetal». Ed. Marban, Madrid.
- NEZELOF, C.; HINGLAIS, N.; GALLE, P. (1975). «Técnicas microscópicas». Ed. Jims, Barcelona.
- PUJIULA, J. (1957). «Citología. Parte práctica». Tip. Cat. Casals, Barcelona (part tècnica) (exhaurit).
- ROBERT, D.; RONALD, J.C. (1989). «Biologie Végétale». Doin, Ed. París.
- SEGUY, R. (1949 i 1951). «Le microscope, emploi et applications» T.I, II. Ed. Lechevalier, París (part tècnica).

- STRASBURGER, E. (1994). «Tratado de Botánica». Ed. Omega. 8ena edició. Barcelona (per interpretar).
- WALLIS, C.J. (1955). «Biología práctica». Ed. Aguilar, Madrid (part tècnica).

VÍDEOS

- DURFORT, M. (1991). «Tècniques d'obtenció de preparacions vegetals». I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1991). «Introducció a l'estudi dels teixits vegetals». I.C.E. Universitat de Barcelona.

Principals marques de reactius per a microscòpia

Chroma

Fluka

Gürr

Merk

Panreac (és fabricada aquí i resulta, per tant, més econòmica).

Essències

Les essències no solen ésser gaire fàcils de trobar. Les farmàcies antigues acostumen de tenir-ne, i també les drogueries importants. Cal demanar-les de la màxima puresa, ja que si són lleugerament hidratades el muntatge surt defectuós.