

# SEMINARIS D'ESTUDIS UNIVERSITARIS

9

## INICIACIÓ A LES TÈCNIQUES HISTOLÒGIQUES VEGETALS I ANIMALS

**Mercè Durfort i Coll**  
catedràtica de Biologia Cel·lular  
de la Universitat de Barcelona  
Membre de l'Institut d'Estudis Catalans

**INSTITUCIÓ CATALANA D'HISTÒRIA NATURAL**  
Fillal de l'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

# **INICIACIÓ A LES TÈCNiques HISTOLÒGIQUES VEGETALS I ANIMALS**

## **COMISSIÓ DE PUBLICACIONS**

Joan Isart (redactor en cap), Laboratori d'Anàlisi Ambiental i Etmologia, CID, CSIC, Barcelona  
Pere Navarro i Ignasi Soriano Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona  
Josep Maria Ninot, Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona  
Conxita Taverner, Institut de Ciències de la Terra, CSIC, Barcelona

La il·lustració en color d'aquesta publicació  
ha estat subvencionada, en part, per la  
Fundació Catalana per a la Recerca.

Dip. Legal: B-38.324-1994  
Impress a Policrom, S.A.  
Tànger, 25 - 08018 BARCELONA

## PRESENTACIÓ

Quan l'any 1975 la Institució Catalana d'Història Natural va pensar organitzar uns seminaris teòrico-pràctics dedicats als seus membres, jo vaig apuntar-me tot seguit a la iniciativa; i em van permetre de fer el primer.

Malauradament, en aquella època, les pràctiques que podia oferir als meus estudiants universitaris eren molt migrades i un sentiment angoixant s'anava apoderant de mi; per això, la iniciativa de la Institució Catalana d'Història Natural em va permetre poder compensar els llicenciats i estudiants de biologia interessats en el món microscòpic, ja que ells podien acollir-se a aquella iniciativa i jo podia oferir-los unes sessions pràctiques bàsiques, però molt demostratives i il·lustratives.

Conscient, alhora, que el professorat dels instituts i les escoles, igualment com els professors universitaris, havien de desenvolupar la seva tasca amb molt pocs mitjans i amb poc temps, vaig pensar que seria interessant i útil muntar uns seminaris en què allò que apreguessin ho poguessin repetir en el seu centre de treball.

Calia fer, inicialment, un seminari pilot per veure l'acollida que tenia entre els membres de la ICHN, i aquest va versar sobre les tècniques de transparentat. Cal recordar que és condició imprescindible que el material o la mostra que hom ha d'estudiar amb un microscopi sigui transparent, i per aconseguir-ho se segueixen diferents estratègies segons els casos.

Vaig seleccionar material fàcil d'obtenir i vàrem aplicar tècniques senzilles, tant pel que fa al cost material com a la seva aplicació; vaig escollir peces d'interès estructural i també peces amb interès sistemàtic (genitèlia d'insectes).

Em va semblar oportú afegir-hi el transparentat de vertebrats, per poder estudiar macroscòpicament l'esquelet i poder-ne destacar possibles deficiències o malformacions, emprant tècniques molt utilitzades en laboratoris farmacològics.

Després de l'èxit del primer seminari, en seguiren molts altres, que es van haver de repetir a causa de la demanda existent. Amb la perspectiva dels anys, puc dir que la tècnica de transparentat ha estat aplicada pels nostres seminaristes sobre peixos, amfibis, rèptils i mamífers de diverses grandàries (gats i gossos acabats de néixer, algun primat i, fins i tot, en algun fetus humà, actualment exposat en centres de recerca o museístics). Per tant, aquell primer seminari va assolir totalment l'objectiu pretès.

El segon seminari que vàrem oferir va versar sobre tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals, i el tercer sobre l'obtenció de preparacions animals. Un de microfotografia i obtenció d'imatges al microscopi i un de multidisciplinari varen ser, crec jo, una bona contribució a l'ampliació de la formació dels membres de la Institució Catalana d'Història Natural en l'àmbit de la tècnica microscòpica.

Els textos dels seminaris, repartits entre els membres de la ICHN i, òbviament, entre els inscrits als seminaris, han tingut molt d'èxit, i la prova és que s'han reeditat en diverses ocasions, i ja fa uns quants anys que estan exhaurits. En demanar-me que es tornessin a editar, se m'ha ofert la possibilitat de fer-hi aplicacions, de modificar-los i d'editar-los tots junts.

He seguit aquestes possibilitats de diferent manera. Hi ha breus addicions concretes que em semblen molt oportunes; però, *no he volgut* ampliar el text, perquè l'interès d'aquests seminaris ha estat sempre proporcionar les bases per a la confecció de les preparacions, seleccionant aquells mètodes que, tot i ésser representatius, fossin prou econòmics i ràpids per poder ser reproduïts en les condicions que predominen en els centres d'ensenyament encara avui, al final del segle XX. Sobre aquest punt vull fer una matisació: és la de subratllar el fet que la majoria dels la-

boratoris universitaris, sortosament, gaudeixen avui d'una infraestructura adequada per als ensenyaments que s'hi donen. Això no vol dir, que no continuïn havent-hi problemes econòmics per a la compra de reactius, cada vegada més cars, i que la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, la meua, no pateixi encara avui, una excessiva massificació.

És per això que no he volgut desvirtuar el propòsit inicial dels seminaris; a unes addicions en el text original i a una actualització bibliogràfica, solament hi he afegit un apartat gràfic, simbòlic, que enriqueix el text.

La Institució Catalana d'Història Natural, filial de l'Institut d'Estudis Catalans, i jo mateixa, volem posar a les mans dels biòlegs una eina útil per al desenvolupament d'una part de llur tasca docent i de recerca, i als estudiants una eina que els centri i solucioni, d'una manera molt directa, alguns dels problemes que els sorgiran al llarg de llurs estudis.

Barcelona, 1994

**Mercè Durfort i Coll**  
catedràtica de Biologia Cel·lular  
de la Universitat de Barcelona  
Membre de l'Institut d'Estudis Catalans

# 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 incusions; 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 arrancades 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 glicerina<sup>1</sup>, de Höyer, d'albúmina glicerina, etc.
2. Primer el posem en una gota de goma aràbiga, el deixem assecat 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.<sup>2</sup>

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 assecar 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 soros d'una falguera tendra o seca sobre una gota de goma aràbiga.

Escampem el material amb una agulla.

Deixem assecar 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 aràbiga 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.

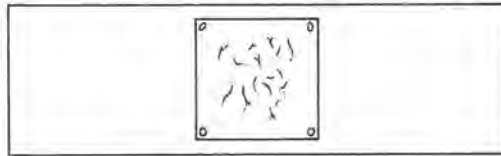
**Recomanem:** Fer observacions de pol·len de pi (per les vesícules aeríferes o flotadors que té), i també el de la carabassa, per la morfologia de l'exina i perquè és fàcil l'observació dels porus germinatius operculats.

### • 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.

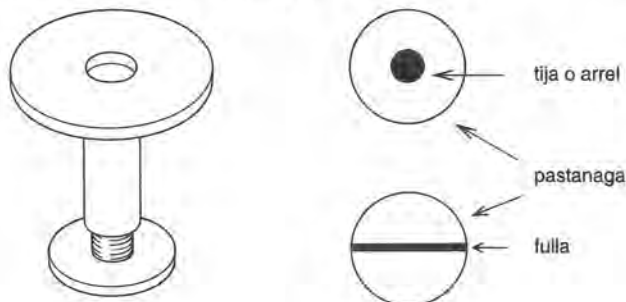
Recomanem l'epidermis de fulla de lliri i l'epidermis de les fulles carnosos de la ceba. Són molt curiosos els estomes de les fulles de gramínies i de fulles d'*Agave americana* o de plantes similars.

## 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 (lleixiu) 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 creobjectes, 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 creobjectes 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.)<sup>3</sup>
- 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 alcohol·lica 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

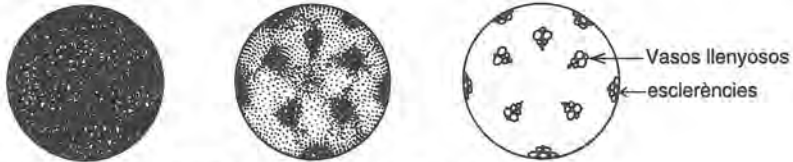
**Resultats:** quitina . . . . . negre intens

- **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.<sup>4</sup>



- ho rentem amb aigua abundant bo i agitant, de 5 a 10'
- 5' en hematoxilina
- ho rentem 5' en aigua destil·lada<sup>5</sup>

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 (clorofom, 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 hematoxilina 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
iodo .....	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:	
iodo .....	0,3 gr
iodur potàssic .....	0,6 gr
lactofenol .....	100 cc
Barregem: sol. A .....	
sol. B .....	80cc
sol. C .....	20 cc
sol. C .....	
(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)
  - iodo ..... 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 píric 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 «madrurar». 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	No hidrosolubles	Muntatge doble amb: goma aràbiga-bàlsam
Aquatex	Bàlsam del canadà (és el medi de muntatge més clàssic)	
Gelatina glicerínada	Clearium	
Glicerina	DPX (asseca molt ràpidament i solament és idoni per muntar els talls de meristems)	
Goma aràbiga	Hyrax	
Lactofenol	Mycromount	

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 llur 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:

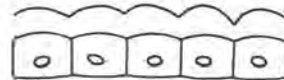
Lactofenol . . . . .	1,44	Bàlsam . . . . .	1,53
Glicerina . . . . .	1,49	DPX . . . . .	1,55
Oli de cedre . . . . .	1,51	Hyrax . . . . .	1,60
Clorofenol . . . . .	1,52		

ON RECÓRRER PER TROBAR:

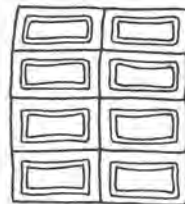
- **Epidermis cutinitzada**  
fulles: *Nerium*, *Eucalyptus*  
tiges: *Ruscus*, *Olea*, etc.



- **Epidermis cerficada**  
fulles: *Ficus* i semblants, clavell,....  
tiges: clavell, roser



- **Epidermis mineralitzada**  
fulles: Equisets, gramínies  
tiges: Equisets, gramínies



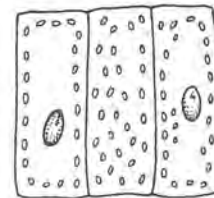
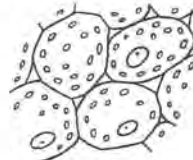
- **Epidermis suberificada**  
tiges: qualsevol que presenti creixement secundari  
arrels: pràcticament totes  
fulles: no s'empen mai



- **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).

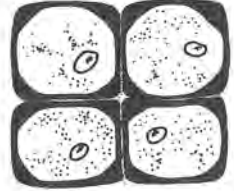
- tiges: Normalment sota l'epidermis hi ha una o dues capes de colènquima i tot seguit ve el parènquima clorofil·lic de cèl·lules rodones.



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 plasmodesmes.



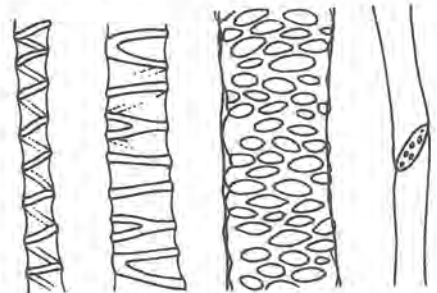
• **Vasos conductors**

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, escaleriformes, etc.), i també per poder estudiar els vasos crivellats.

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



• **Conductes reinífers**

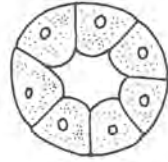
Fulles i tiges de pi i d'avet.





- **Conductes d'essència**

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



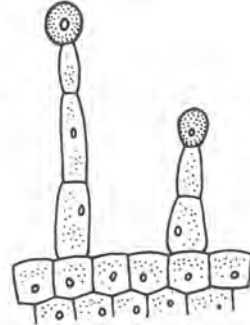
- **Bosses d'essència**

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



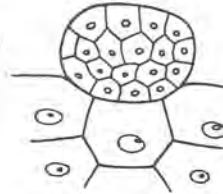
- **Glàndules peltades**

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**

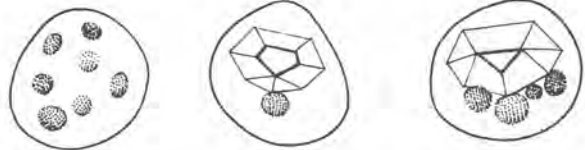
Fulles: epidermis del revers. El cas més típic és el del baladre (*Nerium oleander*).

- **Lenticel·les**

Epidermis suberificades de tiges: rosers, patata, etc.

- **Midó**

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



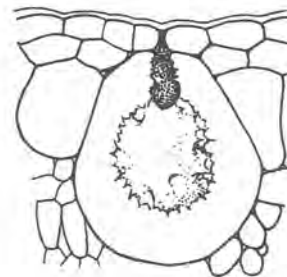
- **Aleurona**

Llavor de ricí.

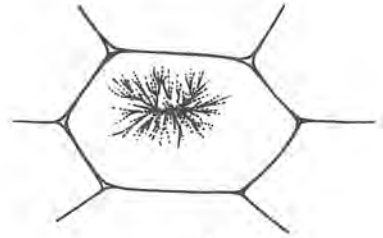


- **Cristalls**

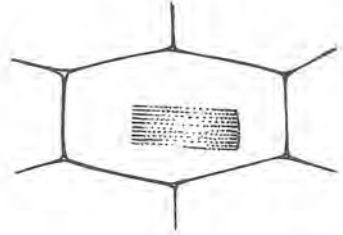
Cistòlits: un nivell de l'epidermis de fulles de *Ficus*, *Parietaria officinalis*, ortiga.



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.).

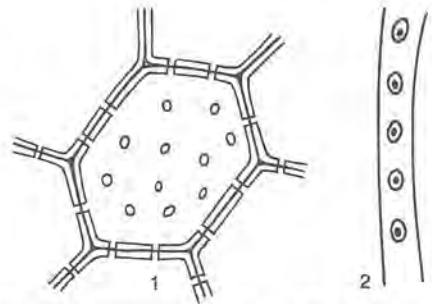


Rafidis: Fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben en parènquima no clorofil·lic. Vinya (*Vitis vinifera*).



• **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.  
PUJULÀ, J. (1957). «Citología. Parte práctica». Tip. Cat. Casals, Barcelona (part tècnica) (exhaustiu).  
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.

# TÈCNiques D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS D'ESTRUCTURES I DE TEIXITS ANIMALS

## INTRODUCCIÓ

La tècnica histològica té nombroses possibilitats que permeten de dur a terme estudis exhaustius dels òrgans i dels teixits animals més diversos i heterogenis. Aquestes tècniques tenen una gran importància per a la interpretació morfològica dels òrgans i, a la vegada, coneguda la seva estructura, s'hi poden situar els indrets on es duen a terme les diverses funcions. Tot això fa que la histologia hagi estat, sigui i continuarà essent una de les branques de la ciència que no s'anquilosarà mai, ni perdrà mai la importància, ja que qualsevol mena de treball, fins i tot algun de caire sistemàtic, ha de recórrer alguna vegada a l'aplicació de tècniques histològiques, per simples que siguin.

Abans d'observar res al microscopi, hem de prendre una colla de precaucions, a fi que, la imatge observada sigui al més informativa possible, i la precaució més simple consisteix a posar l'objecte d'estudi entre un portaobjectes i un cobreobjectes, a sobre d'una gota d'aigua o no. A vegades, el material a estudiar és massa gruixut, i, com que no és transparent, fa que, en observar-lo al microscopi, no s'hi vegi res, per la qual cosa caldrà obtenir-ne trossets o talls prou fins per poder esbrinar l'estructura del material en qüestió.

Per sintetitzar les diverses possibilitats adoptades per dur a terme un estudi de qualsevol mena d'estructura, considerarem diversos casos que es plantegen quan es fa la dissecció de qualsevol animal, tant si és invertebrat com vertebrat.

En primer lloc, farem una distinció entre **preparacions temporals**, és a dir, aquelles que, una vegada observades, dibuixades o fotografiades, es desfan, i les **preparacions permanents**, que es poden conservar anys, sense que perdin l'interès.

## A. PREPARACIONS TEMPORALS

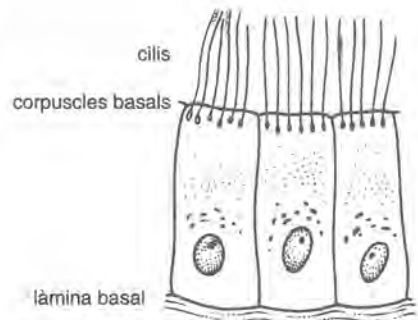
En fer la dissecció de qualsevol animal, podem obtenir-ne una colla de preparacions temporals, és a dir, preparacions muntades, generalment, en una gota d'aigua, que ens permetran estudiar determinades estructures i, tot seguit, desfer-les.

Així, en fer la dissecció del musclo (*Mytilus edulis*), com a exemple d'invertebrat, podem obtenir-ne les preparacions temporals següents:

### I. Preparació de làmines branquials

1. Tallarem un trosset de làmina branquial i el muntarem en una gota d'aigua salada o en una gota de líquid retintut en la cavitat paleal.
2. Una vegada posat el cobreobjectes, el pressionarem lleugerament.
3. L'observarem al microscopi, primer en un augment petit, i després, en un de més gran: cal tancar força el diafargma per aconseguir més contrast.

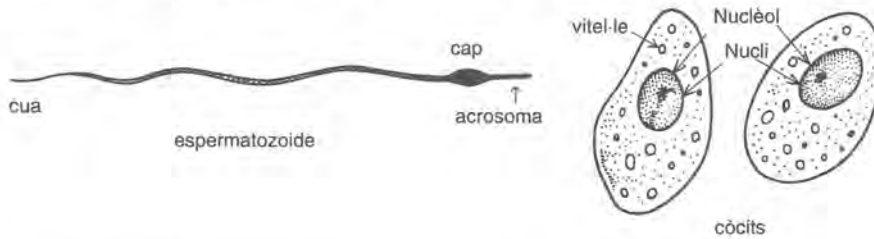
**Advertiment:** Observeu-hi el moviment dels cills de l'epiteli branquial. S'hi veuen molt bé, atès el volum, que en aquesta mena de material és considerablement gros, els corpuscles basals i les arrels ciliars, encara que no es diferencien. S'hi poden observar, a vegades, diverses espècies de ciliats.



## II. Preparació de gònades

1. Tallarem un trosset de glàndula de Polichinela (situada sota el peu del músclo) o bé una mica de les seves expansions entre les dues fulles del mantell i la posarem sobre una gota d'aigua salada o en una gota de líquid de la cavitat paleal.
2. Una vegada posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió.
3. Ho observarem al microscopi, amb el diafragma força tancat, ja que no hem tenyit les estructures, i així obtindrem més contrast.

**Advertiment:** Observeu-hi les cèl·lules germinals, masculines o femenines, segons el sexe del músclo. Els músclos mascles acostumen a tenir les gònades de color blanquinós, mentre que les femelles solen tenir-les vermelloses, encara que, la comprovació final, cal fer-la al microscopi.



## III. Preparació de fibres musculars

1. Tallarem un trosset dels extrems del mantell, o bé una mica del múscul adductor de les valves i el posarem sobre una gota d'aigua.
2. En dissociarem les fibres dins una gota d'aigua de mar o de sèrum fisiològic, amb l'ajut d'agulles, i hi posarem el cobreobjectes, tot fent-hi una lleugera pressió.

**Advertiment:** Observeu-hi, amb el diafragma força tancat, les fibres musculars llises, fusiformes. Aquest material pot muntar-se en una gota de glicerina, i la preparació, en aquest cas, és permanent.

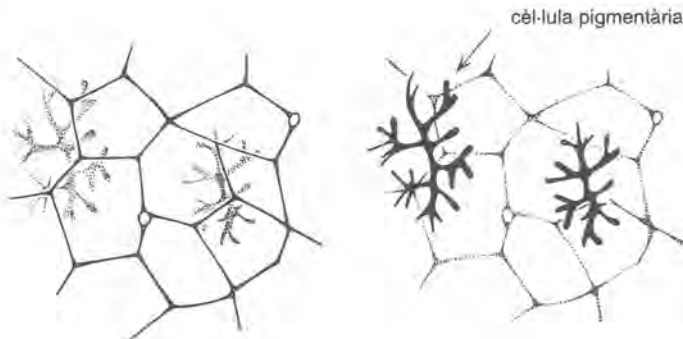
• • •

En fer la dissecció de la granota (*Rana ridibunda*), com a exemple de vertebrat, es poden obtenir les preparacions temporals següents:

### I. Preparació de pell

1. Tallarem un trosset de pell i el muntarem dins d'una gota d'aigua i tot seguit hi posarem el cobreobjectes.

**Advertiment:** Observeu-hi, primer a petits augments, i després a més grans augments, les cèl·lules epitelials, poligonals i aplanades, entre les quals hom pot veure orificis que corresponen als orificis excretors de les glàndules (molt abundants en aquesta classe de pell); per transparència, hi podrem observar també cèl·lules pigmentàries, més profundes, amb l'aspecte estrellat típic, molt irregular. Cal fer-hi la dissecció òptica, és a dir, que primer s'enfoquen les cèl·lules epitelials, i després, amb el cargol micromètric, s'enfoca un pla inferior, en què trobarem les cèl·lules pigmentàries.



## II. Preparació del contingut de l'estómac

1. Obrirem longitudinalment l'estómac de la granota i en treurem el contingut, una part del qual posarem sobre una gota d'aigua.
2. Hi posarem el cobreobjectes i el pressionarem lleugerament.

**Advertiment:** Hom hi podrà observar artells d'insectes i d'aràcnids, i també tricomes i restes vegetals. El nombre d'estructures a observar depèn del temps que faci que la granota no ha menjat i del grau de digestió dels aliments. Com sempre, caldrà accionar el diafragma fins a trobar la llum més adient.

## III. Preparació del contingut del recte

1. Negligirem la part final del recte, generalment molt negrosa, i buidarem la part següent, és a dir, el tros que hi ha a un centímetre del final, sobre una gota d'aigua destil·lada, o bé sobre una gota de líquid fisiològic, posada ja sobre el portaobjectes.
2. Un cop posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió i, abans d'observar la preparació al microscopi, la mirarem a ull nu: a vegades s'hi veuen cucs blancs com es mouen.

**Advertiment:** Observèu-hi les diverses espècies de protozous, els uns paràsits, els altres comensals, que es troben habitualment al recte de la granota i dels gripaus. Els més freqüents són:

Ciliats:

*Nycotherus codiformis*

*Balandidium entozoon*

*Trichodina pediculus*

Flagel·lats:

*Opalina ranarum*<sup>6</sup>

També poden observar-s'hi diverses espècies de nemàtodes, cèstodes i tremàtodes que, per transparència de llur tegument, deixen veure el tracte digestiu. És molt interessant l'estudi de la regió anterior, on fàcilment es veu la ventosa i la musculosa faringe (en el cas dels tremàtodes i cèstodes). Així mateix, pot observar-s'hi la musculatura de la paret del cos i la distribució de l'aparell reproductor. Entre d'altres, són típics els tremàtodes següents:

*Cephalogonimus sp.*

*Opisthoglyphus ranae*

## IV. Preparació d'espermatozoides

Tallarem amb una fulla de bisturí o d'afaitar un testicle de la granota sobre una gota d'aigua o sobre líquid fisiològic; el buidarem una mica sobre una gota d'aigua posada prèviament damunt el portaobjectes i, tot seguit, hi posarem el cobreobjectes.

**Advertiment:** Observèu-hi la morfologia dels espermatozoides, que és molt típica i que es pot veure molt bé, sempre que accionem convenientment el diafragma. Aquest procediment pot fer-se servir sempre en fer la dissecció de qualsevol vertebrat.

## V. Preparació de fibra muscular estriada

1. Tallarem un tros de múscul de l'anca de la granota, per exemple, i el posarem sobre una gota d'aigua o de líquid fisiològic.
2. Dissociarem el múscul amb l'ajut d'agulles, dins una gota d'aigua o de glicerina.
3. Després d'haver-hi posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió.

**Advertiment:** Les bandes A i I de la fibra muscular estriada es veuen molt bé, diafragmant adequadament. Aquesta preparació pot ésser permanent, per a la qual cosa caldrà, una vegada feta la dissociació, fixar el material amb una mica de formol al 6%, per exemple, durant uns 15 minuts, i tot seguit, caldrà muntar el material amb una gota de glicerina. Cal recordar que aquesta classe de muntatge no s'asseca mai i que cal vorejar o cimentar la preparació mitjançant esmalt d'ungles.

Un bon material per poder veure la fibra muscular estriada és el pernil dolç, el qual, malgrat ser cuit, deixa observar a la perfecció, sense que calgui prèviament fer-ne cap tinció, l'estriació, tot tancant el diafragma. Aquest material, el pernil dolç, acostuma a ser adulterat amb fècula de

6. Kuo, R.R.: Protozoologia. C.E.C.S.A., Mèxic, 2.a reimpressió, 1972.

patata, pastanaga, etc. Per fer aquesta comprovació cal comprar pernil dolç del més econòmic que hi hagi i després de dissociar-lo lleugerament es deixa durant un minut en solució de Lugol o en tintura de iode, es renta amb aigua destil·lada, es munta en una gota de glicerina i ja es pot procedir a fer-ne l'observació. Si hi ha midó, aquest destacarà per haver quedat tenyit totalment de color blau-negre. Atès que la tinció és temporal, no caldrà segellar el cobreobjectes.

**Advertiment general:** Aquestes preparacions les considerem temporals. És possible, però, d'obtenir-les permanents; cal recordar que la tècnica és, en aquest cas, més llarga, ja que cal fixar les estructures perquè no s'alterin amb el temps.

A excepció de la preparació de la pell, totes les altres poden obtenir-se en fer la dissecció d'altres classes de vertebrats, com per exemple del ratolí, de la rata o del conill, animals de dissecció molt sovint utilitzats per a aquesta mena de classes pràctiques.

Amb la pell del ratolí o de qualsevol altra classe de vertebrat no podem fer l'observació directament, ja que és massa gruixuda i no és transparent, per la qual cosa caldrà seguir la tècnica d'obtenció de talls que indicarem a continuació.

El contingut de l'estómac i del recte dels animals és una font d'organismes comensals els uns i paràsits, els altres, bé siguin protozous o metazous, molt interessant i a tenir en compte.

## B. PREPARACIONS PERMANENTS

Caldrà considerar dos casos possibles: d'una banda, l'obtenció de preparacions permanents d'estructures animals de les quals, per a llur estudi, no cal obtenir talls; i, de l'altra, les estructures, com són els òrgans, per a l'observació del microscopi, amb les quals caldrà seguir un procés més o menys llarg fins a obtenir-ne les preparacions desitjades.

### B.1. PREPARACIÓ D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, NO CAL OBTENIR TALLS

#### 1. Preparació de foraminífers

La sorra d'algunes platges és molt rica en foraminífers fòssils i és una font inesgotable per estudiar les formes més representatives d'aquest grup de protozous.

Hi ha tres possibilitats de muntatge:

- Muntar directament amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.
- Muntar primerament amb una gota de goma aràbiga, deixar-la assecar unes quantes hores i, tot seguit, posar-hi una gota de bàlsam i el cobreobjectes.
- Muntar a l'aire, és a dir, posar el material en sec sobre un portaobjectes i, tot seguit, disposar un cobreobjectes que tingui una goteta de bàlsam a banda i banda, o bé un cobreobjectes net, que una vegada col·locat es vorejarà o cimentarà amb laca d'ungles.

**Advertiment:** Els procediments a) i c) són, possiblement, els més idonis. És interessant de triar la sorra de foraminífers amb una lupa binocular i, amb una agulla anar-los posant sobre el portaobjectes.

Per a llur classificació, podem adreçar-nos a l'obra de Colom.<sup>7</sup>

#### 2. Preparació de protozous actuals

Agafarem una mostra de zooplàncton, no gaire concentrada, i la posarem sobre un portaobjectes amb una gota de goma aràbiga, la deixarem assecar i hi posarem tot seguit una gota de bàlsam i el cobreobjectes. També es pot muntar directament amb una gota de glicerina i, en aquest cas, caldrà vorejar el cobreobjectes amb una mica de laca.

Habitualment, les mostres de zooplàncton i de plàncton, en general, són fixades amb formol al 6%, o bé amb alcohol de 90°. Posteriorment, per fer-ne recomptes, es nyeixen i es conserven amb lugol, encara que aquest pot fer-se servir directament com a fixador.<sup>8</sup>

7. COLOM, G.: Foraminíferos ibéricos. Invest. Pesquera. T. 38 (1), Barcelona, 1974.

8. SCHWOERBEL, J.: Métodos de hidrobiología, Ed. Blume, Madrid, 1975.

### 3. Preparació de ràdules de cargols o de cefalòpodes

- N'extraurem la ràdula amb pinces o agulles.
- La deixarem uns minuts amb KOH a l'1% en calent, o bé durant unes 12 hores, si es treballa a la temperatura ambient.
- La rentarem amb molta aigua de l'aixeta, durant uns 30 minuts.
- La passarem per aigua destil·lada.
- Muntatge, seguint diverses tècniques:
  - a) Muntatge directe amb una gota de glicerina, vorejant després el cobreobjectes.
  - b) Muntatge amb una gota de goma aràbiga, es deixa assecat i, posteriorment, es munta amb bàlsam del Canadà.
  - c) Muntatge amb bàlsam del Canadà o equivalent.

Aquesta última classe de muntatge requereix una deshidratació prèvia del material, per la qual cosa caldrà seguir els passos següents:

    - 15 min. amb alcohol de 70°.
    - 15 min. amb alcohol de 90°.
    - 15 min. amb alcohol absolut.
    - de 15 a 30 min. amb essència d'eucaliptus.
    - 5 min. amb xilè.

Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà.

**Advertiment:** És possible, i a vegades recomanable, una tinció de la ràdula, per a la qual cosa, abans de començar la deshidratació, es tenyirà durant un temps variable amb colorants del tipus fucsina àcida a l'1%, hematoxilina o amb blau de metilè al 0,1%. Els temps poden ésser més o menys els següents:

- a) 1 hora amb fucsina àcida a l'1%.

Ho rentarem amb aigua destil·lada que tingui unes gotes d'àcid acètic.
- b) 10 min. amb hematoxilina de Delafield.

Ho rentarem durant 30 min. amb aigua de l'aixeta.
- c) 10 min. amb blau de metilè al 0,1%, o bé 2 min. amb blau de metilè al 0,5%.

Ho rentarem amb aigua destil·lada i farem diverses esbandides.

Segui quina sigui la tinció efectuada, a continuació, després de rentar-lo prosseguirem amb la deshidratació del material. Si no volem tenyir la ràdula, caldrà jugar com sempre amb el diafragma per aconseguir la màxima informació de l'estructura.

### 4. Preparació d'escates de papallones

Rascarem suaument les ales d'una papallona sobre un portaobjectes i cobrirem la «pols» que hi quedi amb un cobreobjectes, en el qual haurem posat quatre gotes de bàlsam molt menudes, a banda i banda; és un muntatge amb aire.

Es pot fer el muntatge amb bàlsam del Canadà, però l'índex de refracció és molt semblant al de la quitina que constitueix l'escata i, en observar-ne l'estructura al microscopi, no hi ressalten els detalls.

És interessant de fer aquesta preparació amb escates de dues o tres espècies de papallones i veure'n les diferències estructurals.

**Advertiment:** De la mateixa manera que són test de resolució les preparacions de determinades espècies de diatomees, també es poden fer servir preparacions d'escates de papallones per fer aquest calibratge.

### 5. Preparació de peces quitinoses d'artròpodes (antenes, artells, genitatives, etc.)

Un cop arrencades les antenes i les potes amb molt de compte, es poden muntar directament amb Hoyer, Berlesse, glicerina-gelatinada, etc., és a dir, amb qualsevol medi de muntatge aquós, encara que, els esmentats són els que donen més bons resultats.

Si volem fer un muntatge amb bàlsam del Canadà, per l'índex de refracció, que ens permetrà d'esbrinar més bé els minúsculs detalls de la quitina d'aquestes estructures, caldrà deixar assecat molt bé el material, fins que quedi ben deshidratat. Això es pot fer de dues maneres: o bé el deixarem assecat a l'aire o dins una estufa, o bé passarem les peces per una sèrie alcohòlica, per essència, xilè i, finalment, les muntarem amb bàlsam. (Vegeu la tècnica del muntatge de talls, pag. 24.)

Si es tracta d'una genitativa, en extreure'n les peces sota la lupa binocular, queden lògica-



ment envoltades per teixits muscular i conjuntiu, que caldrà eliminar, per a la qual cosa cal fer una digestió amb KOH de l'1% al 5%, en calent o en fred, durant un temps que caldrà calcular en cada cas; quan es treballa en calent, el temps, lògicament, és molt més curt.<sup>9</sup> La potassa, a més d'eliminar la matèria orgànica, transparenta l'estructura i pot ésser interessant, a vegades, de donar-li més contrast, per a la qual cosa podem tenyir-la amb un colorant específic de la quitina, com és el negre de clorazol.<sup>10</sup> El temps de tinció és molt variable, i oscil·la de 15 minuts a unes quantes hores.

#### 6. Preparació d'escates de peixos

- Un cop arrencades les escates de peixos com ara sardina, verat o qualsevol altra espècie les deixarem unes 24 hores amb KOH a l'1% a la temperatura ambient; si s'escalfen dins un vidre de rellotge, el temps és molt més curt.
- Les rentarem amb aigua de l'aixeta de 30 minuts a una hora.
- Les passarem per aigua destil·lada.
- Farem una tinció facultativa, d'una hora amb fucsina àcida a l'1%.
- 15 min. amb aigua destil·lada.
- 10 min. amb alcohol de 70°.
- 10 min. amb alcohol de 90°.
- 10 min. amb alcohol absolut.
- 15 min. amb essència.
- 5 min. amb xilè.
- Les muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà.

#### 7. Preparació de pèls de mamífers

- Tallarem pèls de diferents espècies de mamífers i de diverses parts del cos (regió dorsal, ventral, caudal, cefàlica, etc.).
- Els deixarem 24 hores amb KOH a l'1%.
- Els rentarem amb aigua de l'aixeta de 30 minuts a una hora.
- Els passarem per aigua destil·lada.
- Els deixarem eixugar a l'aire, o bé dins una estufa.
- Els passarem per xilè durant uns 5 minuts.
- Els muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o de DPX.

**Advertiment:** Aquesta mena de muntatge és el més informatiu. Si el pèl és negre o marró, per veure'n millor l'estructura, cal deixar-lo de 15 minuts a una hora amb aigua oxigenada de 30 volums, perquè es oescolori. Els sistemàtics de mamífers indiquen que hi ha més diferències, quant a l'estructura dels pèls, entre els de diverses regions del cos d'una mateixa espècie, que no entre els d'espècies diferents.

En fer l'observació de pèls, o bé de plomes d'ocells, cal esbrinar si sobre l'estructura quitinosa hi ha postes d'ous d'insectes, epiparàsits dels animals en qüestió.

#### 8. Preparació de plomes d'ocells

El millor és muntar-les directament a l'aire.

#### 9. Preparació d'ossos

Agafem un tros d'os de bou o de vedella, el farem bullir i amb una serra petita en farem seccions tan primes com sigui possible. Seran interessants, sobretot, els talls transversals. Els fragments obtinguts així han de quedar reduïts a làmines transparents, per a la qual cosa els passarem les vegades que calgui sobre una pedra d'esmeril, primerament gruixuda i després més fina; cal posar aigua entre l'os i la pedra perquè llisqui més bé.

Una vegada el fragment és ben transparent, cal rentar-lo amb força aigua de l'aixeta, primerament, i destil·lada, després. Ho deixarem assecar i ho muntarem a l'aire, o bé amb goma aràbiga i bàlsam, o, senzillament, amb bàlsam; cal buscar el medi de muntatge que doni més contrast a l'estructura a observar.

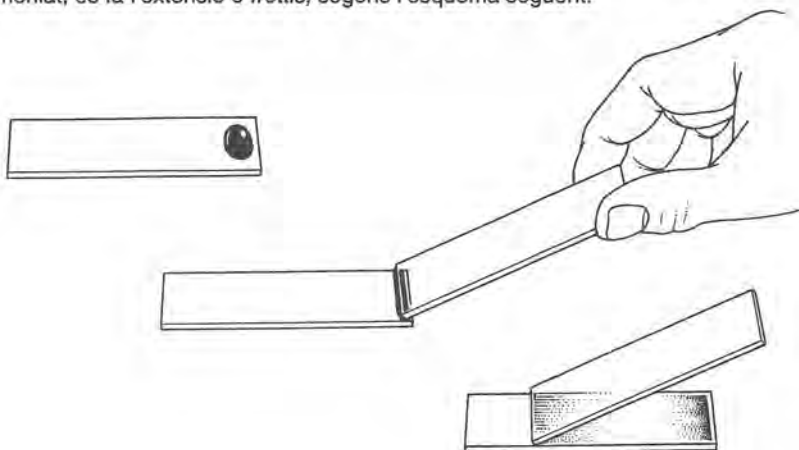
9. DURFORT, M.: «Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats: aplicacions». Seminari d'Estudis Universitaris, núm. 1, Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona, 1975.

10. El negre de clorazol es prepara amb alcohol de 70° amb solució saturada, és a dir, uns 0,7 g de colorant per 100 cc d'alcohol de 70°, segons Carayon (1969).

**Advertiment:** Cal assenyalar que algunes cases comercials disposen de micròtoms adients per tallar cossos durs, com és l'os, ja que la ganiveta té una aleació especial. El preu d'aquesta mena d'instruments és, generalment, força elevat. També podem obtenir talls fins processant l'os com si fos un mineral o una roca.

## EXTENSIONS DE SANG

La preparació de sang es fa mitjançant extensions, és a dir, es posa una gota de sang a l'extrem d'un portaobjectes molt net i desgreixat i amb l'ajut d'un segon portaobjectes, a ser possible esmeriat, es fa l'extensió o *frottis*, segons l'esquema següent:



Una vegada assecada l'extensió a l'aire, seguirem els passos següents:

- 5 minuts de fixació amb metanol, o bé amb sublimat corrosiu (solució aquosa saturada de biclorur de mercuri).
- Decantarem el fixador i ho assecarem amb paper de filtre.
- Ho tenyirem durant 30 minuts amb GIEMSA diluït.<sup>11</sup>
- Ho rentarem amb aigua destil·lada durant 10 minuts, fent-ne dos o tres canvis.
- Ho assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu, encara que recomanat, amb bàlsam del Canadà, o bé amb DPX.
- Observarem els diversos tipus cel·lulars, amb l'objectiu d'immersió, és a dir, de 1.000 a 2.000 augments.

Una altra possibilitat és fer una doble tinció amb HEMATOXILINA-EOSINA. La tècnica a seguir en aquest cas és:

- 5 minuts de fixació amb metanol, o bé amb sublimat corrosiu.
- Decantarem el fixador i ho assecarem amb paper de filtre.
- Ho tenyirem durant 15 minuts amb hematoxilina.<sup>12</sup>
- Ho rentarem durant 30 minuts amb aigua de l'aixeta.<sup>13</sup>
- Ho tenyirem durant 5 minuts amb eosina<sup>14</sup> a l'1%.
- Ho rentarem diverses vegades, dues o tres, amb alcohol de 96°.
- Ho assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu amb bàlsam del Canadà o amb DPX.

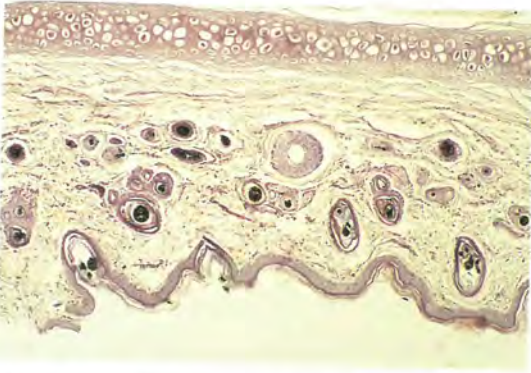
11. El GIEMSA és una solució formada per tres colorants histològics: azur de metilè, blau de metilè i eosina. És preferible de comprar-lo ja preparat, i abans de fer-lo servir es dilueix: 10 gotes de GIEMSA amb 10 cc d'aigua destil·lada.

12. L'hematoxilina és un colorant típicament nuclear. Qualsevol classe d'hematoxilina serveix per tenyir els nuclis de les cèl·lules blanques de la sang.

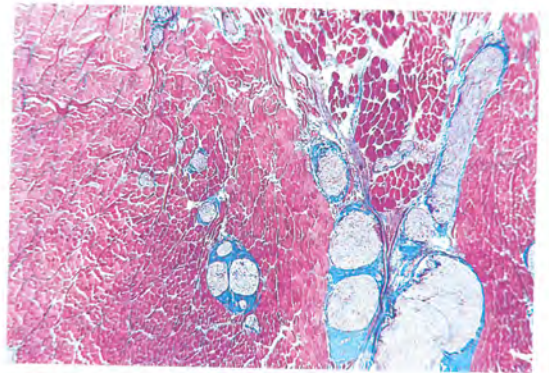
13. Normalment, després de tenyir amb hematoxilina, es renta amb aigua de l'aixeta, perquè les sals de l'aigua provoquen el viratge del colorant, que passa de vermell a tenir un color blavós.

14. L'eosina és un colorant eminentment citoplasmàtic.

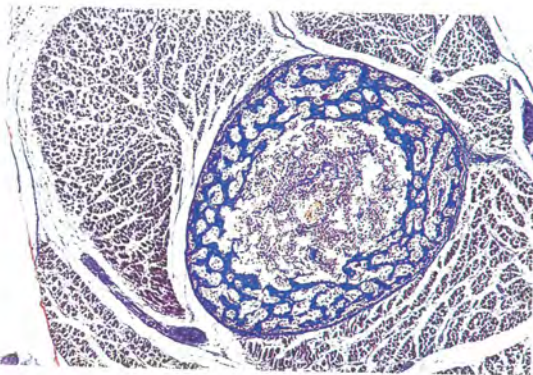
# TEIXITS I ORGANS ANIMALS



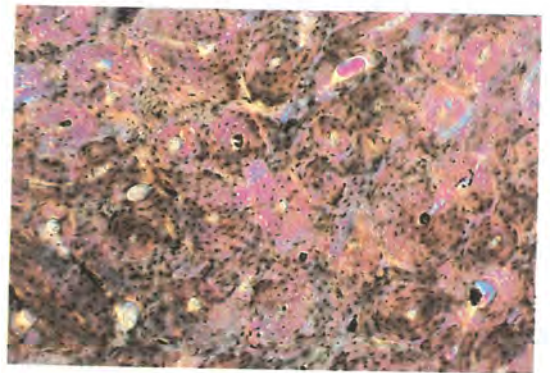
1. Tall d'orella: epidermis, derma amb fol·licles pilosos i cartíleg. (Hematoxilina-eosina)



2. Teixit muscular i nervis. (Mallory)



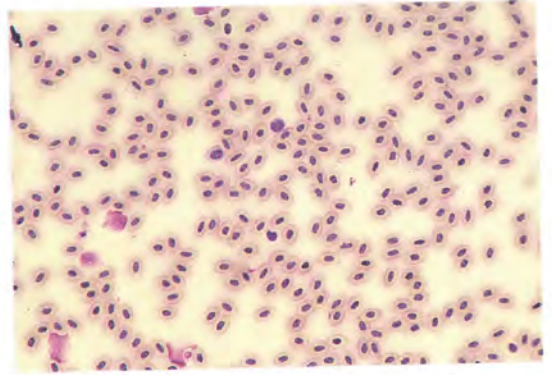
3. Tall transversal d'una vertebra: feixos musculars, os i medul·la òssea. (Blau de metilè)



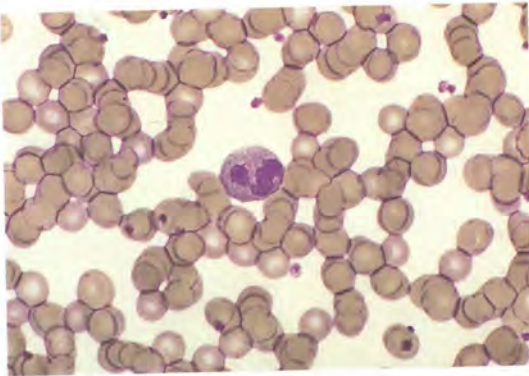
4. Tall d'os compacte observat amb contrast interferencial



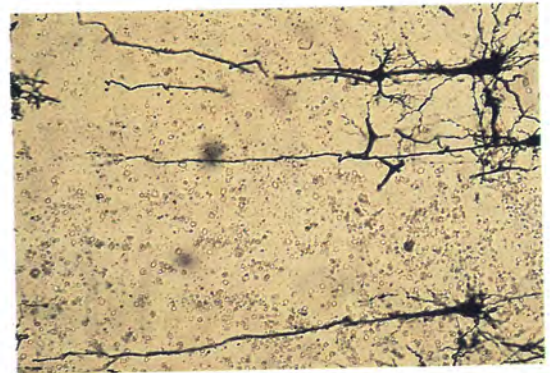
5. Peix teleosti: transparentat i tenyit amb roig d'alitzarina



6. Extensió de sang de peix (Diff-Quick)



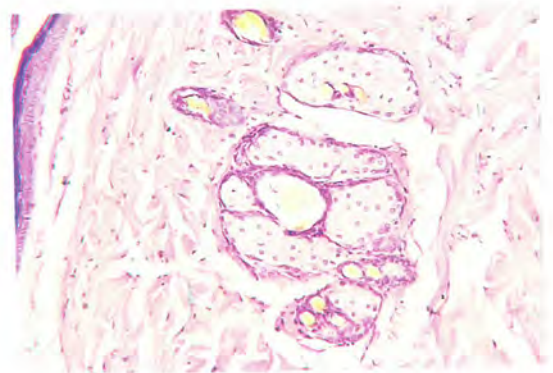
7. Extensió de sang humana: eritròcits i un granulòcit neutròfil (Diff-Quick)



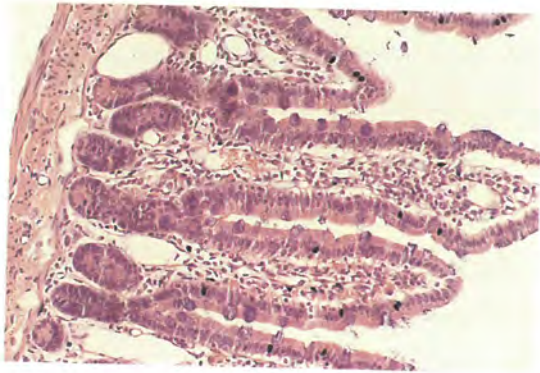
8. Neurones piramidals d'escorça cerebral. (Cox)



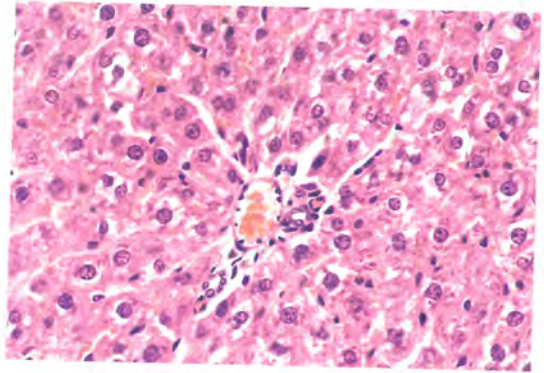
9. Neurones multipolars de medul·la espinal. (Nitrat de plata de Cajal)



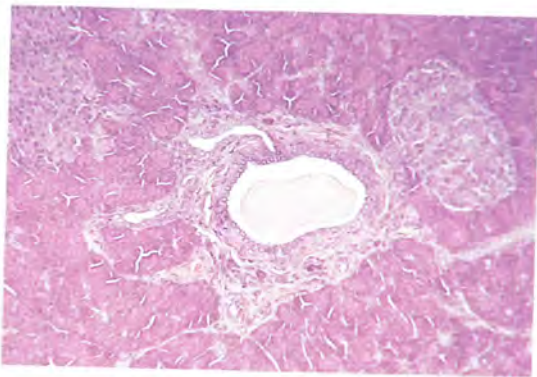
10. Glàndules sebàcies i fol·licles pilosos. (Hematoxilina-eosina)



11. Tall transversal d'intestí. Vegeu les vellositats. (Hematoxilina-eosina)



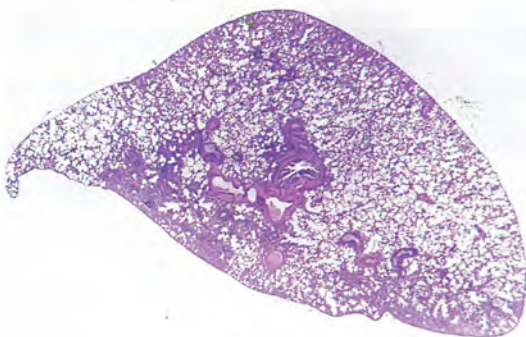
12. Trabècules hepàtiques. (Hematoxilina-eosina)



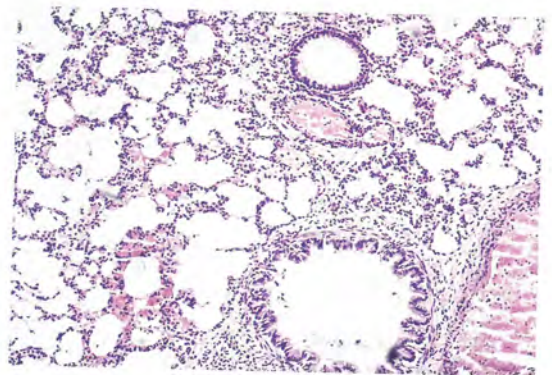
13. Detall d'un lobulet pancreàtic, destaca l'illot de Langerhans i el tall transversal d'una artèria. (Hematoxilina-eosina)



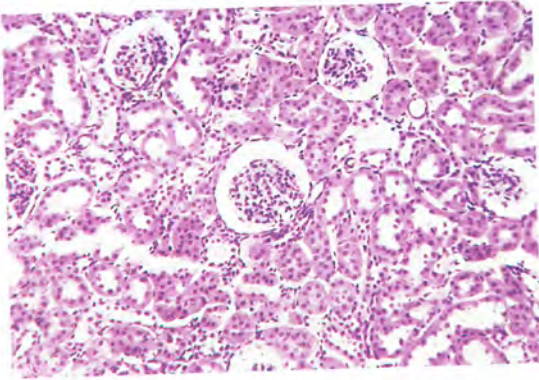
14. Panoràmica d'un tall d'embrió: Intestí, artèries, venes i part de pulmó. (Mallory)



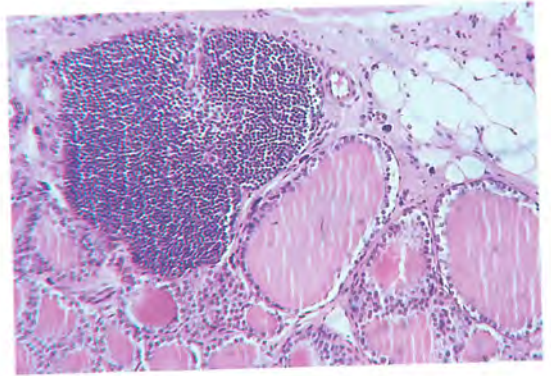
15. Pulmó. (Hematoxilina-eosina)



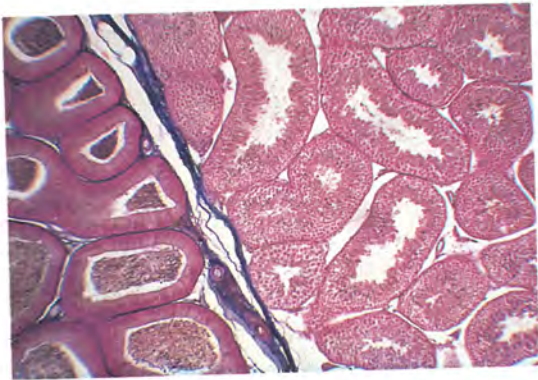
16. Detall d'un bronquioli, una artèria, una vena i dels alveols pulmonars. (Hematoxilina-eosina)



17. Ronyó: zona cortical amb glomèruls de Malpighi. (Hematoxilina-eosina)



18. Glàndula tiroidea amb un fol·lice limfàtic. (Hematoxilina-eosina)

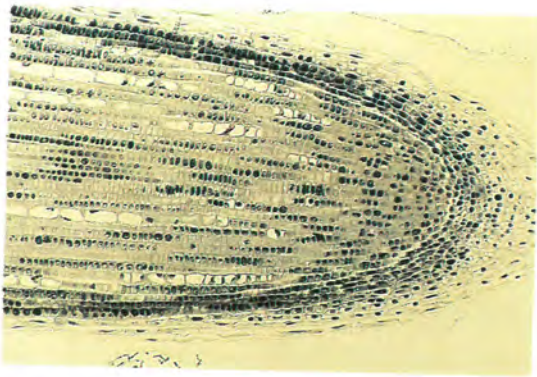


19. Testicle (Túbuls seminífers) i epidídim. (Mallory)

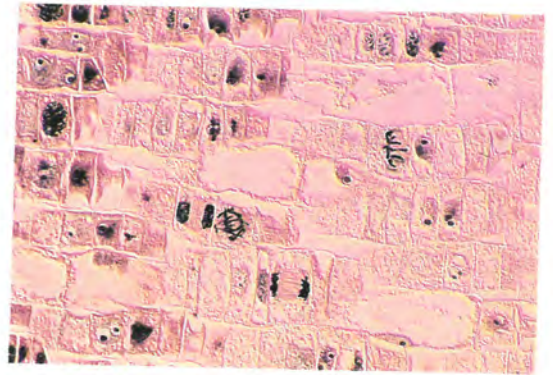


20. Ovari: zona cortical amb fol·licles. (Hematoxilina-eosina)

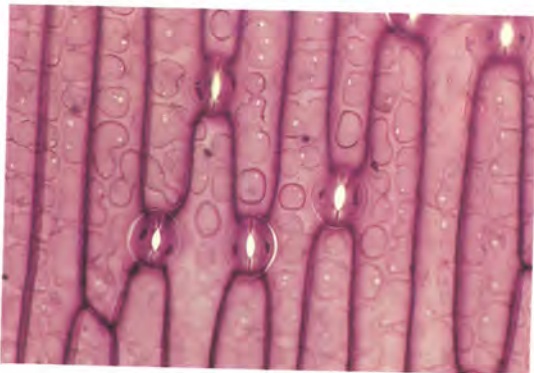
# TEIXITS I ORGANS VEGETALS



1. Meristema radical. (Hematoxilina fèrrica)



2. Figures de mitosis. Contrast interferencial



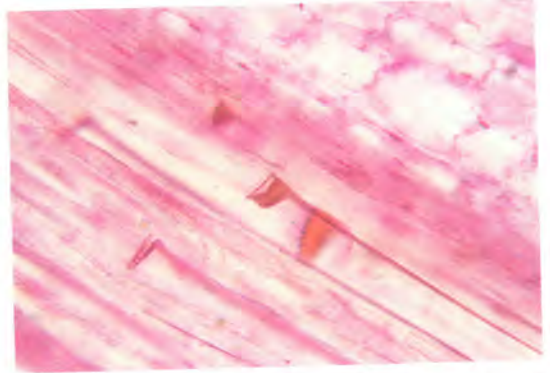
3. Epidermis de lliri amb estomes.  
(Hematoxilina-eosina)



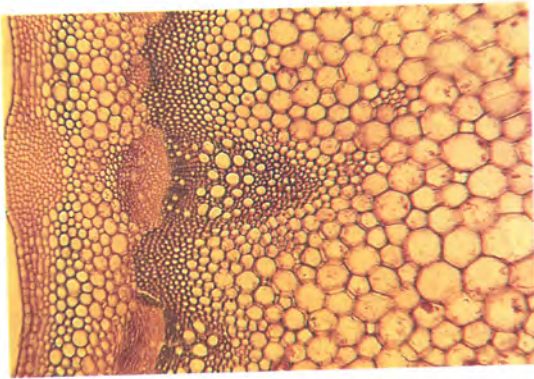
4. Tricomes de magnòlia. Contrast interferencial



5. Tall longitudinal de vasos. (Picrofucsina)



6. Detall de vasos cribrosos. (Picrofucsina)



7. Feixos de vasos colaterals tallats transversalment de tija de dicotiledònia. (Picrofucsina)



8. Tall transversal de fulla de pi. Vegeu els conductors reinífers. (Picrofucsina)



9. Tall transversal de fulla de *Ficus elastica*. Vegeu el idioblast amb el cistòlit. (Picrofucsina)



10. Tall transversal de fulla de *Nerium oleander*. Vegeu les criptes estomàtiques. (Picrofucsina)

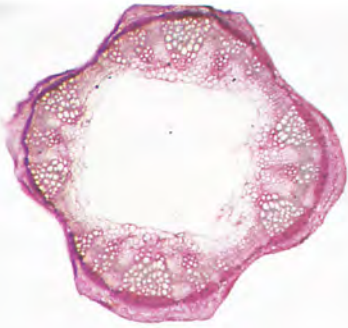




11. Tall transversal de peciol d'heura.  
(Picrofucsina)



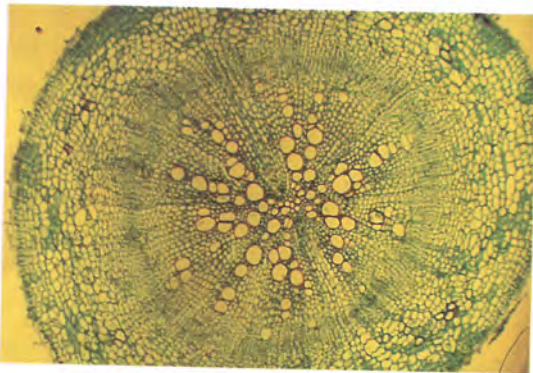
12. Tall transversal de peciol de llimoner. (Blau de metilè-picrofucsina)



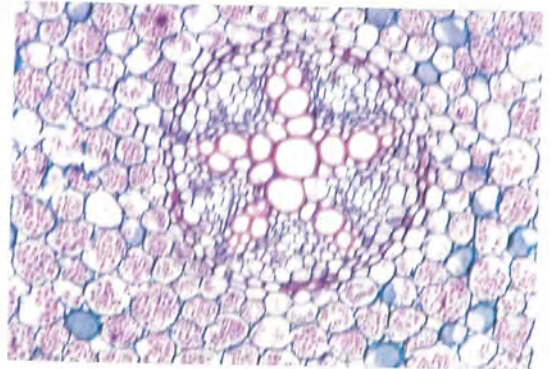
13. Tall transversal de tija d'ortiga. (Picrofucsina)



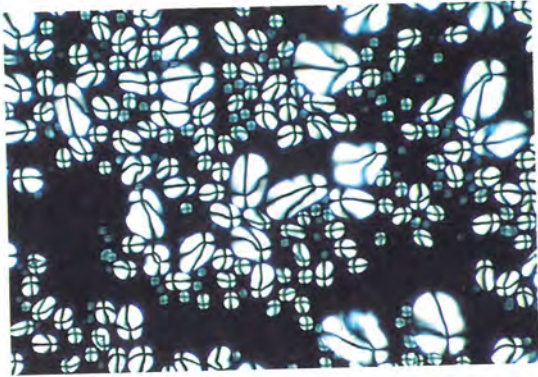
14. Tall transversal de tija de monocotiledònia.  
Vegeu vasos colaterals tancats.  
(Picrofucsina)



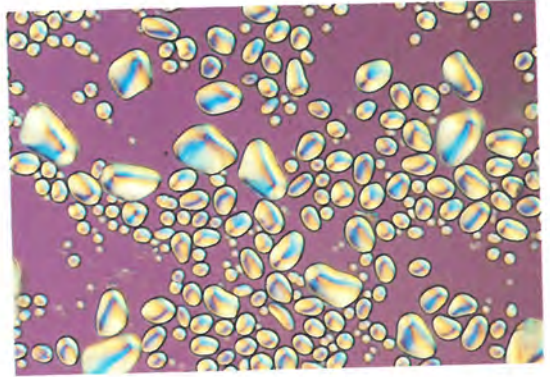
15. Tall transversal de rel de dicotiledònia.  
(Tionina-hematoxilina)



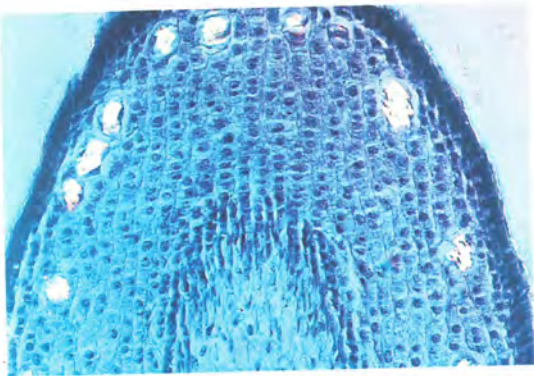
16. Tall transversal de rel pentarca de monocotiledònia. (Floroglucina àcida)



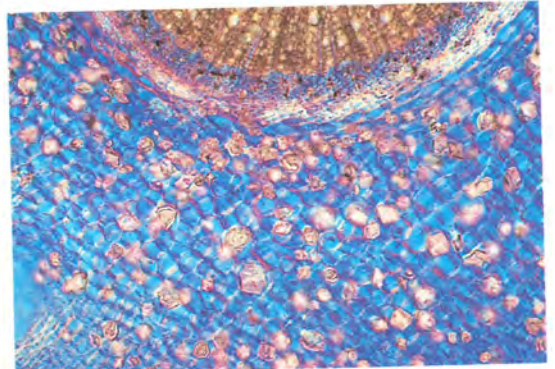
17. Midó de patata observat amb llum polaritzada



18. Midó de patata observat amb contrast de fase interferencial



19. Rafidis d'inulina (Polisacàrid de la fructosa)



20. Cristalls d'àcid cítric de llimoner observats amb contrast de fases interferencial

**Advertiment:** La casa HARLECO té un equip de tinció, «DIFF-QUICK», molt interessant, ja que d'una manera molt ràpida i, sobretot, molt positiva tenyeix les extensions de sang, amb uns resultats semblants als obtinguts amb al tècnica de WRIGT-GIEMSA. Aquesta tècnica fou aconseguida per Witlin, el 1970.

Un cop preparats tres flascons de Borrel amb cada un dels tres productes de la casa HARLECO, és a dir, amb el fixador (solució A), amb el primer colorant (solució I o B) i amb el segon colorant (solució II o C), i assecada l'extensió de sang, se sotmet als passos següents:

- Submergirem cinc vegades el portaobjectes amb l'extensió dins del flascó que conté la solució A; cada vegada s'hi deixa durant un segon.
- El submergirem cinc vegades en el flascó que conté la solució B, durant 5 segons, amb immersions d'un segon.
- Deixarem escórrer l'excés de colorant sobre un full de paper de filtre i el posarem dins el recipient que conté la solució II durant 5 segons, deixant-l'hi 1 segon cada vegada.
- Escorrerem l'excés de colorant I.
- El rentarem durant 2 o 3 minuts amb aigua destil·lada.
- L'assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu, encara que recomanat, amb bàlsam del Canadà o equivalent, DPX, etc.



Flascó Borrel

**Advertiment:** Si hom vol l'extensió més tenyida, es deixa més temps dins les solucions I i II. Els temps seran considerablement més llargs si la sang a estudiar no és la humana; cal assajar el temps per a cada espècie. Els productes són molt tòxics: precaució!

**Resultats:**

eritròcits ..... roses

neutròfils:

nucli ..... blau marí  
 citoplasma ..... rosa clar  
 granulacions ..... vermelloses

eosinòfils:

nucli ..... blau marí  
 citoplasma ..... blau cel  
 granulacions ..... vermelles

plaquetes ..... violetes

basòfils:

nucli ..... vermell  
 granulacions ..... vermell fosc, quasi negres

monòcits:

nucli ..... violeta (lobulat)  
 citoplasma ..... blau cel

limfòcits:

nucli ..... violeta  
 citoplasma ..... blau cel



**Advertiment:** Aquest mètode és també molt adient per tenyir les aposicions dels testicles o per a la visualització dels protozous del contingut rectal de nombroses espècies. Darrerament (1994), s'ha introduït a Barcelona la marca americana SURGIPATH que comercialitza un Papanicolau EA 50 de bona qualitat i d'un preu raonable.

**B.2. PREPARACIONS D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, CAL OBTENIR TALLS**

Normalment, en histologia, cal obtenir talls de material que es vol estudiar i per això, és necessari fer una *inclusió*, sigui en parafina, en celoïdina o per congelació. Els talls més fins s'obtenen per la inclusió en parafina. La tècnica de la inclusió en celoïdina és molt llarga, mentre que la congelació permet d'obtenir amb molta rapidesa talls, encara que no gaire fins.

**Tècnica a seguir per fer una inclusió en parafina**

Després de la fixació de l'òrgan o teixit a estudiar amb qualsevol dels líquids fixadors més habituals (formol al 6 o 10%, CARNOY, BOUIN, ZENKER, etc.) de 12 a 24 hores, segons la grandària del material, de la classe de mostra, etc., el material s'ha de deshidratar:<sup>15</sup>

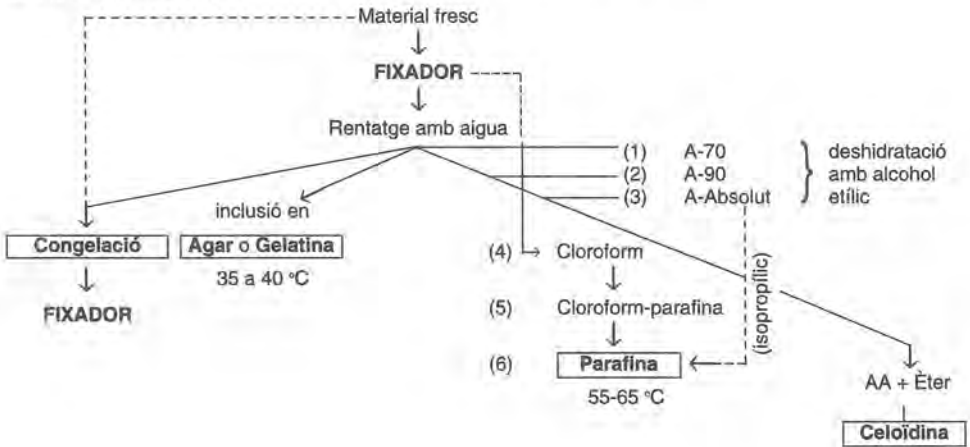
- a) De 6 a 12 hores amb alcohol de 70°.
- b) De 6 a 12 hores amb alcohol de 90°.
- c) De 6 a 12 hores amb alcohol absolut.
- d) De 4 a 6 hores amb cloroform o xilè.
- e) De 4 a 6 hores amb cloroform i parafina o amb xilè i parafina.
- f) De 4 a 6 hores amb parafina, a l'estufa, a uns 55-60 °C.

**Advertiment:** Podem considerar com a temps normal de fixació de 12 a 24 hores, però cal tenir en compte que, aquest temps depèn del fixador emprat i de la classe de material i de la seva grandària; com més petita sigui la mostra del material a fixar, més curt serà el temps de fixació i de les etapes següents.

El fixador quasi mai no és un bon medi de conservació, és a dir, que si després de la fixació de l'òrgan o del teixit no volem incloure'l tot seguit, el traurem del fixador i el posarem en alcohol de 70°, o bé en formol al 6%, on podem deixar-lo durant mesos.

Si el fixador utilitzat té sals fortes (ZENKER), o bé àcids (BOUIN), cal rentar molt bé el material abans de conservar-lo o abans de començar la deshidratació.

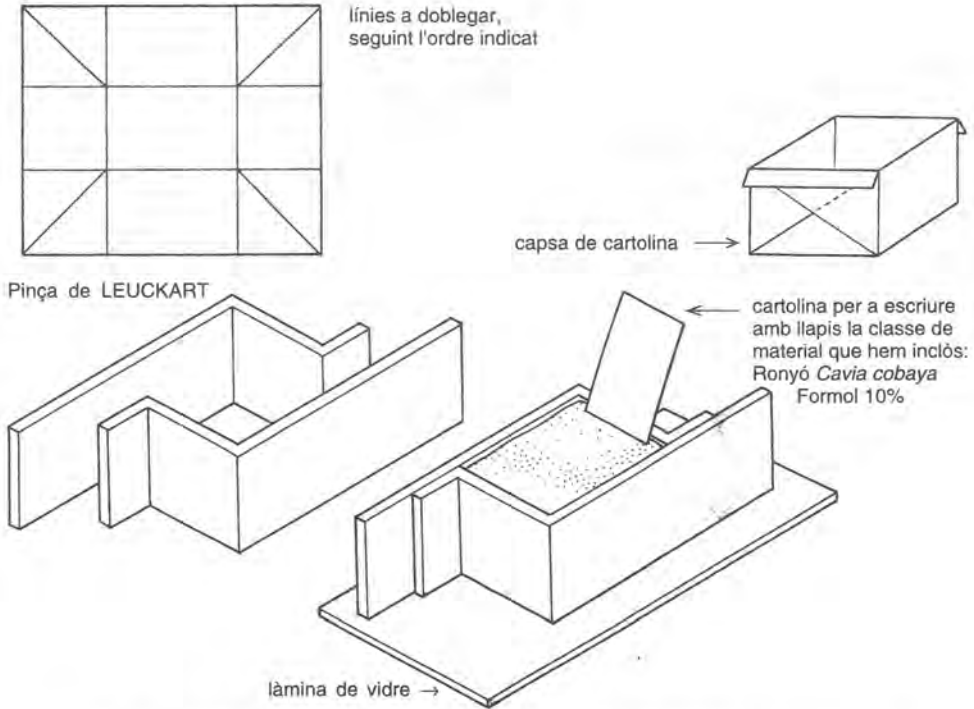
Si l'alcohol utilitzat durant la deshidratació ha estat l'isopropílic, enlloc de l'etílic, podem saltar-nos els passos d i e.



15. Si el material ha estat fixat amb alcohol absolut, o bé amb CARNOY, es pot anar directament al pas d. El temps de permanència en cada pas depèn de la grandària de la peça i de la textura del material.

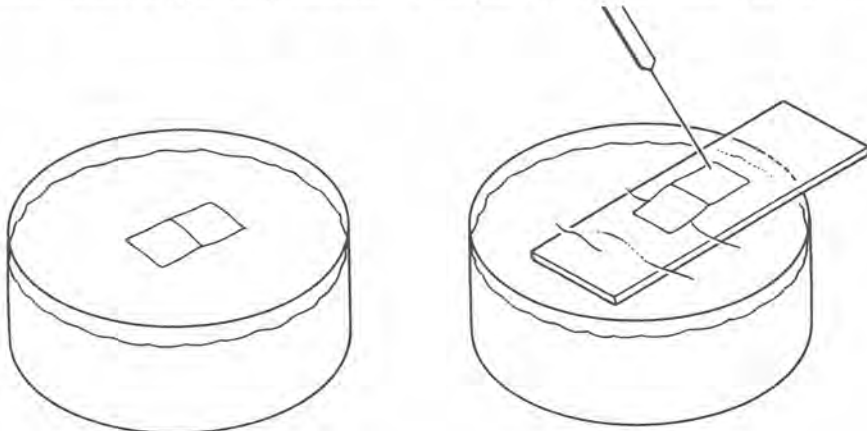
**Passos de les diverses vies a seguir, prèvia obtenció de talls d'òrgans i teixits animals.**

Es fan els blocs de parafina amb l'ajut de les pinces de LEUCKART, o bé en capsas de cartolina, i al cap de poques hores (encara que és millor de deixar-ho d'un dia per l'altre) es pot començar a tallar amb un micròtom adient, sigui de la classe MINOT, o bé de lliscada.



Els talls obtinguts tenen habitualment un gruix de 6 a 8  $\mu$  de mitjana.

Aquests talls es planxen, posant-los dins d'un cristal·litzador ple d'aigua de l'aixeta, escalfada a uns 35-40 °C; quan estan ben estesos es recullen amb un portaobjectes prèviament albuminat, és a dir, que damunt del portaobjectes ben net i desgreixat es posa una gota molt menuda d'albumina de MAYER (glicerina i clara d'ou a parts iguals) i amb el dit s'estén d'un cap a l'altre.



També podem treballar amb un bany maria ple d'aigua en el qual s'ha dissolt un 5% de gelatina en pols.

Una vegada damunt el portaobjectes, se centren i s'eixuguen per les vores i es posen a l'estufa a uns 35 °C, durant un parell o tres d'hores; un cop trets de l'estufa, es deixen refredar i ja es pot passar a la tinció.

**Advertiment:** En alguns casos la inclusió en parafina no és convenient, com per exemple en l'estudi dels greixos, ja que en deshidratar eliminaríem, per dissolució, les gotetes lipídiques que hi poden haver dins les cèl·lules; en aquest cas, cal obtenir talls mitjançant el micròtom de congelació. Els talls obtinguts per la tècnica de la congelació són més gruixuts que els aconseguits amb la inclusió en parafina i, normalment, no s'enganxen al portaobjectes, i s'han de pescar amb una vareta de vidre i passar-los d'un reactiu a l'altre; això requereix molta pràctica per tal de no fer-los malbé. L'adhesió dels talls obtinguts per congelació es pot fer emprant portaobjectes gelatinitzats, els quals s'hauran aconseguit submergint-los un minut en una solució de gelatina al 0,2% en la qual s'ha afegit alum cròmic al 0,1% i unes gotes de timol (per evitar que hi creixin fongs) i deixant-los assecar de dues a quatre hores a 45 °C a l'estufa. Els talls recollits sobre portaobjectes preparats així es deixaran de dues a quatre hores a l'estufa. Abans de tenyir-los, caldrà hidratar-los, per la qual cosa els deixarem deu minuts en alcohol absolut, deu minuts en alcohol de 90°, deu minuts en alcohol de 70° i deu minuts en aigua destil·lada.

## TINCIÓ DE TALLS ANIMALS OBTINGUTS PER INCLUSIÓ EN PARAFINA

Una vegada obtinguts els talls i enganxats mitjançant l'albumina de Mayer o la gelatina, cal tenyir-los però atès que els colorants són, generalment, solucions aquoses, cal treure, prèviament, la parafina dels talls, ja que no hi deixaria entrar el colorant, per la qual cosa els desparafinem i hidratem seguint un procés habitual, que és el següent:

- De 15 a 30 min. amb xilè (desparafinat).
- 15 min. amb alcohol absolut.
- 15 min. amb alcohol de 90°. (hidratació)
- 15 min. amb alcohol de 70°.
- 15 min. amb aigua destil·lada.

Treta la parafina i hidratat el tall, hom pot escollir la tècnica de la tinció que cregui més adient per a cada mena de material o per allò que hom pretén de veure; així cal saber si volem tincions panoràmiques de l'òrgan, i escollirem en aquest cas una doble tinció amb *hematoxilina-eosina*, per exemple, o un mètode tricròmic com pot ésser el *Mallory*. Ara bé, si cal cercar quelcom de molt concret, com poden ésser els cromosomes, triarem una tècnica més específica, com l'*hematoxilina fèrrica* de HEINDENHEIN.

**Advertiment:** Si el material ha estat inclòs en celoïdina, cal tenir en compte que aquesta no es dissol en res, i per tant, no caldrà deshidratar el material, prèvia tinció, ja que els talls són normalment recollits amb aigua destil·lada, i també els talls obtinguts per congelació.

### Algunes tincions recomanades per aplicar sobre els talls

Creiem especialment recomanables per la informació que donen i per llur relativa rapidesa, les tincions que esmentarem a continuació. Considerem que els òrgans i teixits han estat inclosos en parafina.

Els temps indicats per als colorants són els més habituals, però caldrà calcular-los per a cada tipus de colorant, per a cada tipus de material, i segons el gruix dels talls, tenint en compte que els talls gruixuts necessiten menys temps de tinció que els talls més fins. Així mateix, el temps de tinció depèn també del període que fa que estigui preparat el colorant: alguns colorants amb el temps perden llurs propietats tintorials, com és el cas de la picrofucsina, mentre que d'altres guanyen, com és el cas de la majoria de les hematoxilines.

### Doble tinció amb Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratem els talls seguint la seqüència abans esmentada (pàg. 13).
3. 5 min. amb hematoxilina (de DELAFIELD, de FRIEDLANDER, etc.; colorant nuclear).
4. de 15 a 30 min. amb aigua de l'aixeta.

5. 2 min. amb aigua destil·lada.
6. 5 min. amb eosina aquosa a l'1% (colorant citoplasmàtic).
7. 5 min. amb alcohol de 96°.
8. 5 min. amb alcohol absolut.
9. 15 min. amb essència (creatosina, eucaliptus, terpineol).
10. 2 min. amb xilè.
11. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.

**Resultats:** Nuclis ..... blau marí  
 Citoplasma ..... rosat  
 Fibres musculars ..... roses  
 Fibres conjuntives ..... blaves

**Hematoxilina-Picrofucsina** (triple tinció de van GIESON)

1. Desparafinarem amb xilè de 15 a 30 minuts.
2. Hidratarem els talls, fins a l'aigua destil·lada.
3. 2 min. amb hematoxilina de GROAT.
4. Els rentarem 15 min. amb aigua de l'aixeta, fent-ne dos o tres canvis.
5. 5 min. amb picrofucsina que, a la vegada que tenyeix, diferencia.
6. 5 min. amb alcohol absolut (dos canvis).
7. 15 min. amb qualsevol mena d'essència.
8. 2 min. amb xilè.
9. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

**Resultats:** Nuclis ..... negres  
 Citoplasma ..... rosat  
 Fibres elàstiques ..... vermelles  
 Fibres musculars ..... marró clar

**Mètode de MALLORY** (Tècnica simplificada del mètode de l'AZAN).

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. 15 minuts amb sublimat corrosiu (biclorur de mercuri, en solució aquosa saturada). Actua de mordent.
4. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
5. 15 segons amb fucsina àcida a l'1%.
6. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
7. 60 segons amb àcid fosfomolibdic a l'1% (actua de mordent).
8. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
9. 75 segons amb líquid de MALLORY.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
11. Ho diferenciarem amb blau d'anilina S.A. alcohòlica (uns 10 segons).
12. 10 segons amb alcohol absolut.
13. 15 minuts amb essència.
14. 2 minuts amb xilè.
15. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o DPX.

**Resultats:** Nuclis i cromosomes ..... vermells  
 Granulacions citoplasmàtiques ..... taronges vermelloses  
 Fibres col·làgenes ..... blaves  
 Fibres musculars ..... vermelloses  
 Eritròcits ..... taronges  
 Fibres nervioses ..... liles  
 Vitel·lus ..... groc  
 Quitina ..... vermella

**Mètode de l'AZAN, segons HEINDENHEIN**

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. De 40 a 60 minuts amb azocarmí, a l'estufa a 56-60 °C.

4. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
5. Ho diferenciarem amb alcohol-anilina, al microscopi, fins que només es vegin els nuclis de color rosat.
6. 1 minut amb alcohol-acètic, per tal de frenar el procés de la diferenciació.
7. D'1 a 3 hores amb àcid fosfomolibdic al 5% (actua de mordent).
8. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
9. Ho tenyirem d'1 a 3 hores amb blau d'anilina-orange G-àcid acètic.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada.
11. Ho diferenciarem amb alcohol de 96° uns dos o tres segons.
12. 2 min. amb alcohol absolut.
13. 15 min. amb essència.
14. 2 min. amb xilè.
15. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

**Resultats:** Nuclis i cromosomes ..... vermells  
 Granulacions citoplasmàtiques ... vermelles, grogues i blaves  
 Fibres musculars ..... de vermell a taronja  
 Fibres col·làgenes ..... blaves  
 Mucus i cartílag ..... blau marí

**Advertiment:** Les tècniques de tinció de MALLORY, o bé l'AZAN donen resultats molt positius amb talls de tràquea, d'intestí o de llengua.

## TÈCNiques MOLT ESPECÍFIQUES

### **Hematoxilina fèrrica, segons HEINDENHEIN**

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls, fins a l'aigua destil·lada.
3. De 12 a 24 hores amb sulfat fèrric amònic (alum de ferro) al 5% (actua de mordent).
4. Ho rentarem ràpidament amb aigua destil·lada.
5. Farem una tinció de 12 a 24 hores amb hematoxilina de HEINDENHEIN (sobretinció; es forma una laca amb el mordent).
6. Diferenciarem amb l'alum de ferro al 2,5%, sota el microscopi, fins que quedin tenyits només els nuclis, o es vegin els cromosomes, o bé les bandes de la fibra muscular estriada, o el centríol.
7. Ho rentarem durant 30 min. amb aigua de l'aixeta.
8. Ho rentarem 5 min. amb aigua destil·lada.
9. 5 min. amb alcohol de 70°.
10. 5 min. amb alcohol de 90°.
11. 5 min. amb alcohol absolut.
12. 15 min. amb essència.
13. 2 min. amb xilè.
14. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.

**Advertiment:** Aquesta tinció és molt interessant, car dona imatges molt clares del nucli i dels nuclèols de les cèl·lules en repòs, i també imatges dels cromosomes de les cèl·lules que estan en divisió; a la vegada, tenyeix el centríol i les bandes de la fibra muscular estriada, per la qual cosa, si volem estudiar quelcom d'aquestes estructures, les tenyirem amb aquesta tècnica.

Hem observat que la tinció de gónades i de meristemes radicals (materials rics en figures de divisió cel·lular) amb la tècnica de van GIESON, és a dir, amb la triple tinció hematoxilina de GROAT i de picrofucsina, dona uns resultats molt positius i té l'avantatge que el procés és molt més curt. En el cas d'aplicar l'hematoxilina de GROAT per a la tinció de cromosomes de meristemes radicals, cal augmentar el temps de tinció considerablement, ja que les parets cel·lulòsiques retarden l'entrada del colorant, i, per tant, un temps d'uns 15 minuts és el recomanat, encara que, com sempre, cal cercar el temps més adient per a cada classe de material.

### **Tècnica del PAS (àcid per-iòdic de SCHIFF)**

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.



3. 10 min. amb àcid per-iòdic (que provoca una oxidació dels components hidrocarbonats del talls).
4. Ho rentarem durant 10 min. amb aigua de l'aixeta.
5. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
6. 10 min. amb el reactiu de SCHIFF; cal fer l'operació en un recipient de vidre ben tancat.
7. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
8. Farem una tinció facultativa amb blau de toluídina al 0,5% durant 2 min., o bé amb verd de metilè a l'1% durant 15 minuts.
9. Ho rentarem amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
10. Ho deshidratarem.
11. 15 min. amb essència.
12. 2 min. amb xilè.
13. Ho muntarem amb bàlsam del Canadà o similar.

**Resultats:** Els materials que tenen mucopolisacàrids o glicoproteïnes queden tenyits de color rosa vermellós i destaquen de la resta que queda sense tenyir, o bé tenyit de color blau verd, segons si hem escollit l'una o l'altra tècnica de tinció facultativa de contrast.

Es recomana d'emprar aquesta tècnica amb talls de tràquea, d'intestí, i de pàncrees, principalment.

#### **Tècnica de FEULGEN i ROSSENBECK**

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. Farem una hidròlisi a 60 °C amb una solució 1N d'àcid clorhídric.
4. Ho rentarem amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
5. Ho tenyirem durant 1 hora amb el reactiu de Schiff.
6. Farem tres rentatges ràpids amb aigua sulfurosa, d'un minut cadascun.
7. Ho rentarem llargament (uns 15 min.) amb aigua corrent.
8. Ho deshidratarem.
9. 15 min. amb essència.
10. 2 min. amb xilè.
11. Ho muntarem amb bàlsam o amb DPX.

**Resultats:** El DNA es tenyeix de vermell intens.

**Advertiment:** El temps de la hidròlisi depèn del fixador emprat; així, si el fixador ha estat el líquid de BOUIN és de 2 minuts, si el fixador ha estat l'alcohol serà de 5 minuts, i si ha estat el formol serà de 15 minuts.

#### **Tècnica de PAPPENHEIM-UNNA**

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. Ho tenyirem durant 5 min. amb el líquid de Pappenheim-Unna.
4. Ho rentarem directament amb alcohol absolut, de 10 a 30 segons, fins que el nucli quedi verd.
5. 5 min. amb essència.
6. 2 min. amb xilè.
7. Ho muntarem amb bàlsam o amb DPX.

**Resultats:** La cromatina queda verda, el nuclèol i l'ergastoplasma queden vermells. És ideal per diferenciar el DNA del RNA.

#### **Impregnació en bloc, pel mètode de CAJAL, conegut amb el nom de «l'estufa».**

Normalment, les tècniques de tinció i d'impregnació s'apliquen sobre el material una vegada aconseguits els talls, com més prims millor. Ara bé, a vegades pot fer-se el que s'anomena una tinció en bloc, que pot tenir finalitats molt diverses; en la majoria dels casos és interessant de fer-la després de la fixació de mostres molt menudes, com poden ésser petits invertebrats, ja que, en agafar color, es poden manipular més bé quan es fa tot el procés de la deshidratació i, finalment, quan es fa la inclusió.

La tècnica de CAJAL a l'estufa presenta tres variants que indicarem a continuació:

#### Primera variant

1. Deixarem fragments de tres a sis mil·límetres de material nerviós (encèfal o medul·la espinal) de 3 a 5 dies a l'estufa a 35 °C en nitrat de plata a l'1,5%, al qual afegirem un 20% d'alcohol.
2. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
3. 24 hores en un reductor de la plata, que pot ésser el format per:  
2 g d'àcid pirogàl·lic o d'hydroquinona  
de 5 a 10 cc de formol  
100 cc d'aigua destil·lada
4. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
5. Deshidratarem per la sèrie alcohòlica.
6. Ho inclourem en parafina.
7. Obtindrem talls de 8 a 12 micròmetres.
8. Adherirem els talls planxats al portaobjectes albuminat.
9. Desparafinarem els talls amb xilè.
10. Ho muntarem directament amb una gota de bàlsam del Canadà o de DPX.

#### Segona variant

1. Fixarem el material nerviós durant unes 24 hores amb alcohol absolut.
2. Ho fragmentarem i ho posarem a l'estufa a 35 °C en una solució de nitrat de plata a l'1,5%, de 5 a 7 dies.
3. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
4. 24 hores en el reductor anteriorment esmentat.
5. Ho rentarem amb aigua destil·lada.
6. Els passos següents són iguals que els de la primera variant.

#### Tercera variant

1. Fixarem el material nerviós amb una barreja formada per:  
50 cc d'alcohol absolut  
de 5 a 10 gotes d'amoniac concentrat durant unes 24 hores
2. Els passos següents, és a dir, del 2 al 10, són idèntics als esmentats en la primera variant.

## PREPARACIÓ DELS REACTIUS ESMENTATS

### Líquids fisiològics més emprats

#### • Solució de Locke (ajustat per a mamífers)

Clorur sòdic .....	0,900 g
Clorur potàssic .....	0,042 g
Clorur càlcic .....	0,048 g
Bicarbonat sòdic .....	0,020 g
Glucosa .....	0,200 g
Aigua destil·lada .....	100.000 cc

#### • Solució de Ringer (ajustat per a amfibis)

Clorur sòdic .....	0,650 g
Clorur potàssic .....	0,014 g
Clorur càlcic .....	0,012 g
Bicarbonat sòdic .....	0,020 g
Fosfat monosòdic .....	0,001 g
Aigua destil·lada .....	100.000 cc

#### • Sèrum salí fisiològic

##### a) Per a invertebrats

Clorur sòdic .....	0,600 g
Aigua destil·lada .....	100.000 cc

- b) Per a amfibis
  - Clorur sòdic ..... 0,750 g
  - Aigua destil·lada ..... 100.000 cc
- c) Per a mamífers
  - Clorur sòdic ..... 0,900 g
  - Aigua destil·lada ..... 100.000 cc

**Advertiment:** L'aigua de mar és sempre un bon líquid fisiològic per als animals marins.

### Fixadors

- **Alcohol etílic** (recomanat per fixar nuclis)

Es fa servir del 70 al 100%.

El temps de fixació depèn de la mida de la mostra, però no ha d'ésser gaire llarg, ja que endureix molt els teixits.

- **Alcohol metílic**

Es fa servir pur, és a dir, del 100%.

- **Bouin** (recomanat per fixar la majoria dels òrgans animals).

- Solució aquosa saturada d'àcid pícric ..... 75 cc
- Formol concentrat ..... 20 cc
- Àcid acètic ..... 5 cc

Després de fixar el material durant unes 24 hores, cal rentar-lo bé amb aigua corrent, abans de començar la deshidratació, prèvia la inclusió.

- **Carnoy** (recomanat per a estudis de nuclis i cromosomes)

- Alcohol absolut ..... 60cc
- Cloroform ..... 30 cc
- Àcid acètic ..... 10 cc

Després de fixar el material amb CARNOY es pot passar directament al cloroform i tot seguit al cloroform-parafina i parafina, per fer la inclusió.

Es millor fixador que l'alcohol etílic tot sol.

- **Formol** (= Formaldehid)

Possiblement, el FORMOL és el fixador que s'apropa més a l'«universal», ja que va bé per a quasi totes les estructures.

Es prepara al 6 o 10% amb aigua destil·lada, a partir del concentrat que es ven al comerç que és del 40%.

Si es deixa més de 24 hores amb formol, el material s'endureix massa, per la qual cosa cal iniciar ràpidament el procés de la deshidratació, o bé el material amb un formol més diluït, al 4%, o bé amb alcohol de 70°. Si bé cal tenir present que a la llarga (3-5 mesos) és descalcificador.

- **Sublimat corrosiu** (recomanat per fixar extensions de sang)

Solució aquosa saturada de biclorur de mercuri.

- **Tetròxid d'osmi** (per a estudis de mitocondries, plasts, greixos)

S'utilitza a l'1 o 2% amb aigua destil·lada, sol o bé combinat amb altres reactius, i formant diverses classes de líquids fixadors, com pot ésser el líquid de CHAMPY, format per:

- Solució aquosa d'àcid cròmic a l'1% ..... 7 cc
- Solució aquosa de bicromat potàssic al 3% ..... 7 cc
- Solució aquosa de tetròxid d'osmi al 2% ..... 4 cc

**Advertiment:** El tetròxid d'osmi és molt volàtil, i els seus vapors irriteren molt les mucoses. Aquest caràcter volàtil és el que fa que els seus vapors es puguin emprar com a fixadors.

Aquest fixador, convenientment taponat, és l'habitualment utilitzat per al material a estudiar al microscopi electrònic.

- **Zenker** (recomanat per quan cal aplicar tincions tipus MALLORY o AZAN, atès el seu caràcter de mordent)

Bicromat potàssic.....	2,5 g
Biclorur de mercuri.....	5,0 g
Sulfat sòdic.....	1,0 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

Hi ha diversos fixadors que, a la vegada, són potents descalcificadors per preparar-se combinats amb segrestadors de sals, tipus EDTA. Entre altres, recordem DESCALCIFIER I que fa les dues funcions simultànies, i DESCALCIFIER II que serveix per descalcificar mostres que ja han estat prèviament fixades. Qui els comercialitza és la casa SURGIPATH que, a Barcelona, és representada per la CASA ÀLVAREZ

## Colorants

- **Azocarmí** (utilitzat en la tècnica de l'ANZAN)

Azocarmí G.....	0,1 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

El farem bullir durant uns minuts.

El deixarem refredar.

El filtrarem.

Hi afegirem 1 cc d'àcid acètic per cada 100 cc de solució colorant.

**Advertiment:** En fred, la solució té un aspecte de suspensió que es perd quan s'escalfa, abans de tenyir. És de conservació il·limitada.

- **Blau d'anilina-Orange G** (utilitzat en la tècnica de l'AZAN)

Blau d'anilina S.A.....	0,5 g
Orange G.....	2 g

Aigua destil·lada..... 100 cc

Àcid acètic..... 8 cc

El farem bullir durant uns minuts.

El deixarem refredar.

El filtrarem.

El diluïrem a la meitat amb aigua destil·lada.

És de conservació il·limitada.

- **Blau de metilè** (colorant nuclear per excel·lència)

Blau de metilè..... 0,5 g

Aigua destil·lada..... 100 cc

**Advertiment:** Preparat al 0,1 per litre és colorant vital.

- **Blau de toluïdina**

Blau de toluïdina..... 0,5 g

Aigua destil·lada..... 100 cc

**Advertiment:** És un colorant metacromàtic, és a dir, tenyeix d'un color diferent del seu determinades estructures. Per demostrar-ho, cal fer-lo servir amb un material que tingui molt de teixit conjuntiu, com poden ésser les submucoses de l'intestí, i hom pot veure com les cèl·lules encobertes presenten nombroses granulacions vermelloses. El blau de metilè també és metacromàtic.

- **Eosina o Eritrosina** (colorant típicament citoplasmàtic)

Eosina..... 1 g

Aigua destil·lada..... 100 cc

Una vegada obtinguda la dissolució, s'hi tira un parell de gotes d'àcid acètic. En el comerç, hi ha l'eosina aquosa i l'alcohòlica, i d'altres variants com poden ésser la groguenca, la blavosa, etc.

- **Hematoxilina** (colorant típicament nuclear)

Hi ha moltes modalitats i formes de preparar aquest colorant; entre les més emprades i esmentades en aquest seminari tenim:

- **Hematoxilina de Delafield**

Solució A:

Hematoxilina .....	4 g
Alcohol absolut .....	25 cc

Solució B:

Sulfat alumínic amònic .....	40 g
(alum amoniacal)	
Aigua destil·lada .....	400 cc

Barrejarem la solució A amb la B. Al cap de quatre o cinc dies la filtrarem i hi afegirem:

Glicerina .....	100 cc
Alcohol metílic .....	100 cc

Passats quatre o cinc dies la filtrarem i ja es podrà fer servir.

Conservació il·limitada.

Abans de fer-la servir, la diluirem a la meitat amb aigua destil·lada i la filtrarem cada vegada.

- **Hematoxilina de Friedlander**

Solució A:

Hematoxilina .....	2 g
Alcohol absolut .....	100 cc

Solució B:

Sulfat alumínic potàssic (alum potàssic) .....	2 g
Aigua destil·lada .....	100 cc
Glicerina .....	100 cc

Barrejarem la solució A amb la B.

La deixarem uns 14 dies en una botella, sense tancar perquè l'hematoxilina s'oxidi, és a dir, «maduri». Si es té pressa per fer-la servir, podem oxidar-la afegint-hi una petita quantitat de iodat potàssic, per exemple, en una proporció d'uns 0,2 g per cada gram d'hematoxilina. Com més madura sigui l'hematoxilina, millor. Abans de fer-la servir, cal diluir-la a la meitat amb aigua destil·lada.

- **Hematoxilina de Heindenhein** (hematoxilina fèrrica)

Solució mare:

Hematoxilina .....	1 g
Alcohol absolut .....	10 cc
Aigua destil·lada .....	90 cc

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

- **Hematoxilina de Groat**

Solució A:

Àcid sulfúric concentrat .....	0,8 cc
Sulfat fèrric amònic (alum fèrric) .....	1,0 g
Aigua destil·lada .....	50 cc

Solució B:

Hematoxilina .....	0,5 g
Alcohol de 96° .....	50 cc

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

Conservació limitada a uns tres mesos, per la qual cosa és millor preparar-ne poc i sovint.

- **Hematoxilina de Regaud**

Solució madura d'hematoxilina .....	10 cc
Glicerina .....	10 cc
Aigua destil·lada .....	80 cc
La solució madura d'hematoxilina es prepara:	
Hematoxilina .....	1 g
Alcohol de 96° .....	10 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant uns tres mesos, o bé cal provocar l'oxidació afegint-hi iodat potàssic, 0,2 g per cada 2 g d'hematoxilina, encara que la maduració espontània és més adient.

• **Líquid de Mallory**

Blau d'anilina S.A. ....	0,5 g
Orange G .....	2,0 g
Àcid oxàlic .....	2,0 g
Aigua destil·lada .....	100 cc
Conservació il·limitada. Cal filtrar-lo de tant en tant.	

• **Lugol**

Iode .....	1 g
Iode potàssic .....	2 g
Aigua destil·lada .....	100 cc

• **Picrofucsina, segons Van Gieson**

Fucsina àcida a l'1% amb aigua destil·lada .....	10 cc
Àcid píric en solució aquosa saturada .....	100 cc
Es conserva de 8 a 10 mesos. És millor preparar-ne poc i sovint.	

• **Reactiu de Schiff** (preparat segons el mètode de Lillie)

Fucsina bàsica .....	1,0 g
Metabisulfít sòdic .....	1,9 g
Àcid clorhídric 0,15N .....	100 cc

Es deixa dissoldre i s'agita de tant en tant. El líquid, primer vermell, va perdent color i al cap de 24 hores s'hi afegeixen 0,5 g de carbó activat, perquè la descoloració sigui total. S'agita, es deixa reposar i es filtra.

Cal conservar-lo a la nevera, en una botella ben tancada, si és possible amb el tap esmerilat. La seva conservació es pot anar comprovant olorant-lo abans de fer-lo servir: ha de fer una olor forta de sofre, i si no té aquesta olor peculiar cal afegir-hi una gota d'àcid clorhídric concentrat i alguns decigrammes de metabisulfít.

La preparació del reactiu de Schiff és força delicada i, òbviament, la qualitat dels components és fonamental. Diverses cases comercials el venen preparat i amb tota garantia.

• **Sudan** (específic per tenyir greixos)

Solució saturada amb alcohol de 70°.  
La qualitat depèn de la marca del colorant.  
Cal preparar-lo unes 24 hores abans de fer-lo servir.  
Sempre cal filtrar-lo abans de tenyir.  
És millor preparar-ne poc i sovint.

• **Verd de metilè** (recomanat per fer la tinció de contrast en la tècnica del PAS)

Solució aquosa a l'1% de verd de metilè .....	25 cc
Alcohol de 96° .....	20 cc
Glicerina .....	25 cc
Fenol .....	0,5 g
Aigua destil·lada .....	100 cc
Conservació il·limitada.	

• **Verd de metilè-pironina** (mètode de Pappenheim-Unna)

Solució aquosa a l'1% de verd de metilè .....	25 cc
Pironina .....	0,25 g
Fenol .....	0,50 g
Alcohol de 96° .....	2,50 cc
Glicerina .....	20 cc
Aigua destil·lada .....	85 cc
Es conserva uns tres mesos.	

Algunes cases comercials fabriquen i venen ja el verd de metilè-pironina en pols: per preparar-lo, cal diluir-lo amb aigua destil·lada, a una dissolució de l'1%.

Es recomana per poder diferenciar la cromatina (verda) del nuclèol (vermell).

#### ESSÈNCIES

Cedre  
Creosota  
Eucaliptus  
Menta  
Terpineol, etc.

#### MEDIS DE MUNTATGE MÉS EMPRATS PER FER PREPARACIONS PERMANENTS

Hidrosolubles	No hidrosolubles	Muntatge amb
Aquatex	Bàlsam del Canadà	Goma aràbiga-bàlsam
Berlesse	Reïna Dammar <sup>16</sup>	
Glicerina	DPX	
Goma aràbiga	Euparal	
Hoyer	Micromount	
etc. <sup>17</sup>		

Recordem que, en casos especials, és interessant muntar el material a estudiar a l'aire (en el cas de les escates de papallona, de les plomes, etc.). El medi de muntatge ha de tenir un índex de refracció (n) que sigui el més adient a la classe de material a observar, per obtenir-ne el contrast més gran possible en fer-ne l'observació microscòpica.

#### Berlesse

Hidrat de cloral	16 g
Goma aràbiga <sup>18</sup>	15 g
Glucosa	10 g
Aigua destil·lada	20 cc
Àcid acètic	5 g

#### Líquid de Hoyer

Goma aràbiga	50 g
Hidrat de cloral	2 g
Aigua destil·lada	50 cc

**Nòtula:** Cal recordar que tots els medis de muntatge hidrosolubles són fàcilment contaminants per espores de fongs i per evitar que hi creixin, cal afegir-hi unes gotes de formol o uns cristallets de timol; alhora, cal tancar el flascó cada vegada que es treuen unes gotes del medi de muntatge.

**Advertiment sobre el material de vidre:** Els portaobjectes emprats en cadascun dels casos han d'ésser ben nets i desgreixats, per la qual cosa es rentaran amb alcohol de 90°.

En ocasions, els portaobjectes nous surten de la caixa molt bruts; en aquests casos, cal rentar-los amb detergent i, posteriorment, ben esbandits amb aigua i passats per alcohol de 90°.

Els portaobjectes emprats per fer preparacions temporals poden recuperar-se. Se'ls deixa en remull de 12 a 24 hores, en una mescla cròmica. Després d'esbandir-los amb molta aigua corrent, es passen per alcohol de 90°, i s'eixuguen.

La mescla cròmica és adient per netejar tot tipus de material de vidre que sigui força brut. La seva preparació és:

Dicromat potàssic	100 g
Aigua	1.000 cc
Àcid sulfúric	100 c

16. La reïna Dammar es compra en terrossos que cal dissoldre amb xilè, fins que tingui una consistència xaroposa. La dissolució pot fer-se a 40 °C i amb el flascó tapat per evitar l'evaporació del xilè.

17. Per a la preparació de diversos medis de muntatge hidrosolubles, consultiu M. DURFORT: «Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats: aplicacions». Seminari d'Estudis Universitaris, núm. 1. Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona, 1975.

18. És recomanable comprar la goma aràbiga en pols, molt millor que en «llàgrimes» o terrossos.

## BIBLIOGRAFIA

- BRIEN, P. (1958). Travaux pratiques de Zoologie. Masson. París.
- DURFORT, M. (1994). Consideracions entorn de l'ensenyament de la Biologia Cel·lular a les portes del segle XXI. Ciències Naturals. Publ. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- JAMES, L. (1904). Zoologie pratique basée sur la dissection des animaux les plus répandus. Masson. París. (Exhaurit.)
- ROWET, H.G.Q. (1975-1976). Guías de disección. I. Invertebrados; II. La rana; III. La rata, con notas del ratón; IV. El pez lija; V. El conejo. Colec. Guías Urania. Urania. Barcelona.
- TIXIER, A. GALLARD, J.M. (1969). Anatomie animale et dissection. Vigot Frères, París.
- VILLENEUVE, F., DESIRE (1976). Zoología. Muntaner y Simón. Barcelona.

## Tècniques

- CARAYON, J. (1969). «Employ du noir chlorazol en anatomie microscopique des Insectes». *Annales de la Société entomologique de France*, T. 5, 179-193, París.
- COOK, H.C. (1976). Mucinas de los tejidos humanos. El Manual Moderno, México.
- DURFORT, M. (1975). «Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals». *Seminaris d'Estudis Universitaris*, 3. Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona.
- FERRER, D. (1929). Manual de tècnica histològica. Libr. Castells, Barcelona. (Exhaurit.)
- GURR, E. (1962). Staining animal tissue. L. Hill, London.
- LOCQUIN, M., LANGERON, M. (1985). Manual de Microscopia, Labor, Barcelona.
- MARTOJA, R. (1970). Técnicas de histología animal. Toray-Masson, Barcelona.
- NEZELOFF, C., GALLE, P., HINGLAIS, N. (1975). Técnicas microscópicas. Jims, Barcelona.
- PANTIN, C.F.A. (1968). Técnicas microscópicas para zoólogos. Academia, León.
- RAMÓN y CAJAL, S. Manual de histología normal y de técnica micrográfica. Libr. Nicolás Moya, Madrid (Diverses edicions) (Exhaurit.)
- ROMEIS, B. (1928). Técnica histològica. Labor, Barcelona. (Exhaurit.)
- SEGUY, E. (1951 i 1949). Le microscope, emploi et applications. Tomes I et II. Paul Lechevallier, París.

## Interpretació

- BURKITT, H.G., YOUNG, B., HEATH, J.W. (1993). Histología funcional Wheater. Alhambra Longman, Madrid.
- CURRAN, R.C. (1967). Atlas d'Histologie. Masson, París.
- DI FIORE, M.S.H., MANCINI, R.E., DE ROBERTIS, E.D.R. (1971). Nuevo Atlas de Histología, Microscopía óptica, Histoquímica y Microscopía Electrónica. El Ateneo, Buenos Aires.
- FREEMAN, J.A., BRACEGIRDLE, B. (1971). An Atlas of Invertebrate Structure. Heineman Education Books, London.
- FREEMAN, J.A., BRACEGIRDLE, B. (1975). Atlas de Histología Animal. Paraninfo, Madrid.
- KÜHNEL, W. (1986). Atlas de Citología y Anatomía microscópica. Omega, Barcelona.

## Vídeos

- DURFORT, M. (1989). La Fixació. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1989). La Microtomia. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1989). La Tinció. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1990). Introducció a l'estudi dels teixits animals. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1993). Mirar, Veure i Interpretar. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- Nota:* La llibreria de la Universitat de Barcelona, al carrer Balmes, 21, distribueix aquests vídeos.  
Telèfon: 318 42 66, ext. 2237.



### Principals marques de reactius per a microscòpia

Chroma

Doesder

Fluka

Gürr<sup>19</sup>

Merck

Panreac (és la més econòmica, ja que és fabricada aquí)

Surgipath

**Nòtula:** En els darrers anys s'estan buscant alternatives als dissolvents clàssics, com ara el xilè i el toluè, cercant reactius que no siguin tan cancerígens i, alhora, biodegradables. En aquest sentit, recomanem substituir el xilè emprat, previ tractament de les mostres amb la parafina i previ muntatge amb els medis de muntatge no hidrosolubles, per Clearene (Surgipath) o equivalent.

---

19. Actualment, és molt difícil trobar, a Barcelona, productes d'aquesta marca.

# TÈCNiques DE TRANSPARENTAT D'INVERTEBRATS I D'ESQUELETS DE VERTEBRATS: APLICACIONS

## INTRODUCCIÓ

L'observació d'organismes es pot fer a partir de llur morfologia externa, anatomia, histologia, o bé interna, citologia. Per a l'observació histològica i citològica és imprescindible l'observació de raspats o extensions, en determinats casos, o bé l'obtenció de talls fins. En aquest seminari solament es consideraran els tractaments seguits per aconseguir una òptima observació morfològica i anatòmica d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats.

L'estudi de la morfologia externa, de gran interès sistemàtic, pot fer-se macroscòpicament, o bé microscòpicament, i, en aquest cas, mitjançant una il·luminació episcòpica (quan l'organisme és opac), per il·luminació hiposcòpica (quan és transparent), o bé amb el microscopi electrònic de rastreig.

L'observació de l'anatomia interna es pot dur a terme mitjançant la dissecció o visualització dels òrgans interns «in situ», o bé per *transparentat del cos*: aquest és el tema que tractarem.

## INVERTEBRATS

Les preparacions poden ésser: A) temporals (observació vital), i B) permanents

A) Per a l'observació vital, solament cal posar una mostra d'aigua dolça o marina entre portaobjectes i cobreobjectes i passar directament al microscopi. Així podem observar protozous, cucs, ous, larves, copèpodes, cladòcers, etc., que, per transparència de la paret del cos, en deixarà apreciar la morfologia interna.

### Advertiments:

1. Per a l'observació de protozous en viu, cal vigilar la font d'il·luminació del microscopi, obrint-ne i tancant-ne el diafragma, per aconseguir una bona contrastació, mitjançant la qual podem veure millor estructures com ara el nucli, els vacúols digestius, els cilis o flagels, etc. Si es disposa d'un microscopi de contrastament de fases, l'observació donarà molta més informació que el microscopi normal de camp clar; així mateix, és molt interessant l'observació en camp fosc.
2. També pot ésser interessant l'aplicació de *colorants vitals*, dels quals els més utilitzats són el blau de metilè, el blau de cresil (colorants nuclears), el verd Janus (colorant de les mitocondries), o bé el roig neutre (colorant dels vacúols). Tots aquests colorants han d'aplicar-se en concentracions molt baixes, de l'ordre del 0,001%.
  - B) Per a l'observació de preparacions permanents, cal seguir uns passos que sempre són els mateixos, encara que poden introduir-s'hi variants.
    1. Anestèsia (facultatiu)
    2. Fixació
    3. Tractament mitjançant aclaridors (facultatiu)
    4. Tenyit (facultatiu, encara que recomanat)
    5. Muntatge en un medi aquós, o bé en un medi no aquós, tipus bàlsam o DPX.

## ANESTÈSICS RECOMANATS

El temps d'actuació és variable: depèn del tipus d'animal, de la concertació de l'agent anestesiant i de la temperatura a què es treballa. Per a cada tipus d'espècie animal cal fer un tempteig fins a trobar-ne les condicions òptimes. La finalitat és sempre evitar que l'animal quedi contret i amb els apèndixs amagats.

- Clorur de magnesi del 7 al 10%, temps d'1 a 24 hores.
- Sulfat de magnesi del 150 al 200%, temps de 5 a 24 hores.
- Aigua de mar més alcohol de 70° amb una concentració progressiva, de l'1 al 10%, fins a arribar a l'alcohol de 70°.

Aquest mètode és especialment recomanat per a l'anestèsia de cucs marins, tant tubícoles com lliures.

- Aigua de mar més unes gotes de formol, fins a arribar a una concentració de l'ordre del 4%.
- Introducció de CO<sub>2</sub> a l'aigua.
- Vapors de cloroform, èter, o bé de xilè.
- Essències: bergamota, canyella, mentol, orenga, eucaliptus, etc. (unes gotes dins de l'aigua).
- Hidrat de cloral del 5 al 10%.
- Salicilat de metil del 20 al 30%.
- Drogues (en proporcions sempre molt petites, d'un 0,01 a un 10,05%):
  - Clorhidrat de cocaïna o de morfina
  - Eucaina
  - Novocaïna
  - Nembutal sòdic
  - MS 222 (metasulfanat de la casa SANDOZ)
  - Nembutal (0,08) + MS 222 (0,1)
  - Nembutal + Mentol

Les drogues, normalment, són utilitzades per a l'anestèsia de cucs i cargols, tant terrestres com aquàtics. Es treballa escalfant suaument el material (de 10 a 15°).

#### **Casos particulars:**

1. Per a l'anestèsia de protozous, també es recomana el tabac, o bé el fum de cigarretes.
2. El suc de llimona va molt bé per a l'anestèsia de sangoneres.
3. El fred és, així mateix, un agent anestesiant interessant a tenir en compte, principalment per a animals molt musculosos, com cucs, sangoneres, equiúrids, etc. El temps d'estada a la nevera, a 4°, depèn de la grandària de l'exemplar.

#### **FIXADORS MÉS FREQUENTS**

- Formol del 4 al 6% i fins al 10% amb aigua destil·lada, o bé amb aigua de mar, en el cas d'animals marins.
- Alcohol de 70°.
- Bouin (àcid pícric, formol i àcid acètic) (75:20:5).
- Bolles Lee (és, alhora, anestèsic i fixador).
  - glicerina ..... 20 cc
  - alcohol de 70° ..... 40 cc
  - aigua de mar ..... 20 cc
- Líquid de Pampel (recomanat per a fixar animals amb una cutícula més o menys gruixuda: crustacis, insectes, etc.)
  - aigua destil·lada ..... 30 cc
  - àcid acètic concentrat ..... 4 cc
  - formol ..... 6 cc
  - alcohol de 96° ..... 15 cc
- Sublimat corrosiu
  - solució aquosa saturada i, en general, qualsevol dels fixadors emprats en els treballs histològics.

El temps de fixació depèn de les dimensions de l'exemplar. El més freqüent és de 12 a 24 hores. Molts dels fixadors són, alhora, líquids de conservació del material biològic.

#### **ACLARIDORS MÉS EMPRATS PER TRANSPARENTAR ELS TEGUMENTS**

- Àcid acètic 30-50%.
- Àcid làctic 50-100%.
- Hidrat de clorat 10-30%.
- Hidròxid sòdic 15-20%
- Hidròxid potàssic 10-15%.

- Javelle, aigua de (50 cc d'aigua + 10 gr. de pòlvres de gas, a les 24 hores + 7,5 gr. d'oxalat potàssic amb 50 cc d'aigua).

El temps d'actuació depèn del tipus d'organisme i de la temperatura de treball, que sol ésser la temperatura ambient, menys en el cas de l'hidròxid sòdic i potàssic, que cal escalfar a uns 30 °C.

Després de l'aclariment, cal fer un bon rentatge amb aigua acètica al 30% i, posteriorment, amb aigua destil·lada abundant.

tinció facultativa

descoloriment amb aigua  
oxigenada de 5 minuts a 2 o 3 hores

rentatge amb aigua

MUNTATGE en un medi hidròfil  
o hidròfob

## COLORANTS

- **Carmí boràcic:** procés ràpid (10'); tenyit lent (6-24 h.).
- **Eosina** a l'1,1%, amb aigua, o bé amb alcohol de 70°, de 30 minuts a algunes hores.
- **Fucsina** àcida, o bé bàsica a l'1%, de 5 minuts a 3 o més hores.
- **Hematoxilina**, de 5 a 30 minuts.
- **Negre de clorazol** (solució saturada en alcohol de 70°), de 20 a 60 minuts; colorant recomanat per a artròpodes, perquè és específic de la quitina.

Després de la tinció, es fa un muntatge que, a la vegada, transparenta les estructures i dona un índex de refracció molt interessant per a l'observació microscòpica. Alguns dels medis de muntatge següents poden comprar-se al comerç, però els altres s'han de preparar al laboratori.

### • *Berlesse*

Hidrat de cloral .....	16 gr
Goma aràbiga .....	15 gr
Glucosa .....	10 gr
Aigua destil·lada .....	20 cc
Àcid acètic .....	5 gr

### • *Clorolactofenol d'Amman*

Hidrat de cloral .....	20 gr
Àcid fènic .....	10 gr
Àcid làctic .....	10 gr
Salicilat sòdic .....	5 gr

### • *Gelatina-glicerina*

Gelatina .....	10 gr
Glicerina .....	70 gr
Aigua destil·lada .....	60 cc
Fenol .....	0,25 gr

Aquest medi és molt interessant també, per la preparació d'espores i de fongs. A temperatura ambient aquest medi de muntatge és sòlid, i cal agafar-lo amb una espàtula i escalfar-lo suaument abans de posar-hi la mostra.

### • *Lactofenol d'Amman*

Àcid fènic .....	10 gr
------------------	-------

Àcid làctic .....	10 gr
Glicerina .....	20 gr
Aigua .....	10 cc

• **Líquid de Farrant**

Goma d'acàcia .....	40 gr
Glicerina .....	20 gr
Àcid fènic .....	0,1 gr
Aigua destil·lada .....	40 cc

• **Líquid de Hoyer**

Goma aràbiga .....	50 gr
Hidrat de cloral .....	2 gr
Aigua destil·lada .....	50 cc

Aquest medi és molt emprat per a muntar genitalls d'insectes, encara que qualsevol dels altres medis també hi és adequat.

• **Xarop d'Apathy**

Goma aràbiga .....	10 gr
Sacarosa .....	10 gr
Aigua .....	10 cc

(més uns cristalls de timol perquè no hi creixin fongs).

Especifiquem la composició d'aquests medis de muntatge ja que és difícil de trobar-la completa als manuals habituals de tècnica.

Medis de muntatge no hidrosolubles, l'ús dels quals comporta la deshidratació prèvia dels exemplars, són: Bàlsam del Canadà, Reïna Dammar, DPX, Micromount.

**Advertiments:**

Es donen casos especials en què, per obtenir preparacions nítides d'alguns organismes, cal, prèviament, sotmetre'ls a tractament especial: així, per preparar puces, àcars i paparres, animals tots ells hematòfags, cal fer-los dejunar durant quatre o cinc setmanes.

**VERTEBRATS**

El transparentat de vertebrats pot respondre a finalitats sistemàtiques, a necessitats de treballs embriològics, o bé a l'obtenció d'unes determinades proves de toxicitat teratogènica, tan freqüents en els estudis farmacològics.

Les tècniques que esmentarem poden aplicar-se a qualsevol grup de vertebrats, però s'han d'ajustar els temps a cada cas en particular.

Els temps d'actuació que donarem en les tècniques següents, corresponen a embrions de pollastre i a ratolins nous.

**TRANSPARENTAT I TENYIT DE CARTÍLAG I OS**

1. Fixació amb alcohol de 70° o 90°, de 24 a 36 hores.
2. Transparentat amb KOH a l'1%, de 24 a 72 hores.
3. Tenyit amb blau de toluïdina i HCl, de 2 a 3 dies, a 40 °C (el blau de toluïdina tenyeix el cartílag).
4. Descoloració amb alcohol clorhídric, de 2 a 3 dies, a 40 °C.
5. Blau de toluïdina + roig d'alitzarina + alcohol acètic, en les proporcions d'1:4:5, durant 3 o 4 dies, a 40 °C.
6. Diferenciació amb aigua i unes gotes d'àcid acètic.
7. De 12 a 14 hores amb alcohol de 70°.
8. Conservació amb glicerina o bé amb alcohol de 96°.

## TRANSPARENTAT I TENYIT D'OS

1. Fixació amb alcohol de 70 o 90°, de 24 a 36 hores.
  2. Transparentat amb KOH a l'1%, de 24 a 72 hores, fins que es comencin a veure els ossos a través del múscul.
  3. Tenyit amb roig d'alitzarina al 0,1%, de 24 a 36 hores, a temperatura ambient (aquest colorant és específic del teixit ossi).
  4. Rentatge amb aigua destil·lada, de 2 a 3 hores.
  5. Es deixa dins de la solució de MALL, fins que sigui ben transparent.
  6. 10 dies en glicerina al 25%.  
10 dies en glicerina al 50%.
- Finalment, es conserva en glicerina pura.

### *Una altra variant:*

1. Fixació amb alcohol de 95°, durant unes dues setmanes.
2. Rentatge amb aigua.
3. 4 setmanes en carbonat potàssic a l'1%.
4. En KOH a l'1% fins que es vegin els ossos.
5. Rentatge amb aigua corrent durant 24 hores.
6. Tenyit amb roig d'alitzarina al 0,1%+ KOH a l'1%, unes 36 a 46 hores.
7. Rentatge amb aigua corrent, uns 30 minuts.
8. Es deixa dins de la solució de MALL fins que es vegin els ossos.
9. Es conserva en una barreja d'alcohol i glicerina a parts iguals.

El líquid o solució de MALL pot ésser utilitzat com a medi de conservació, encara que de vegades destenyeix una mica.

## PREPARACIÓ DELS REACTIUS ESMENTATS

- **Biau de toluïdina o blau de metilè** (específic per al cartílag)  
Colorant ..... 0,25 gr  
Alcohol de 70° ..... 100 cc  
HCl 0,5% ..... 2 cc
- **Roig d'alitzarina** (específic de l'os)  
Colorant ..... 0,1 gr  
KOH 1% ..... 100 cc
- **Alcohol-clorhídric**  
Alcohol 70° ..... 100 cc  
HCl ..... ,25 cc
- **Alcohol acètic**  
Alcohol 70° ..... 100 cc  
Àcid acètic ..... 1 cc
- **Solució de MALL**  
Aigua destil·lada ..... 80 cc  
Glicerina ..... 20 cc  
KOH ..... 1 gr

## MÈTODES ENZIMÀTICS

Pot aconseguir-se un transparentat mitjançant una digestió enzimàtica, procés en el qual cal tenir present el pH en què es treballa, i el control de la temperatura. Aquest procés és un xic més

car, justament per la utilització d'enzims. Normalment es treballa amb tripsina tamponaa.<sup>20</sup>

A continuació, detallem una tècnica de transparentat enzimàtic aplicada a peixos, encara que, variant convenientment el temps, pot ésser aplicada també a uns altres tipus d'animals.

1. Fixació amb formol al 4 o 10%, durant 8 o 10 dies (al formol diluït s'afegeix mitja cullerada de bòrax per cada 250 cc de fixador).
2. Rentatge amb aigua.
3. Blanqueig amb una solució d'aigua oxigenada i KOH a l'1% a la proporció de (10:90) o de (20:80). Cal controlar el temps, ja que és molt variable.
4. Actuació de l'enzim (tripsina) tamponat (amb bòrax). Temps d'actuació: d'1 setmana a 1 mes; cal renovar diverses vegades el líquid.
5. Rentatge amb aigua.
6. Tenyit de l'os amb roig d'alitzarina a l'1% amb KOH a l'1%.
7. Rentatge amb aigua, o bé amb solució tampó.
8. Conservació amb:

glicerina .....	40 gr
KOH a l'1% .....	60 cc
durant 1 setmana	
glicerina .....	70 gr
KOH a l'1% .....	30 cc
durant 2 setmanes	

Conservació definitiva amb glicerina pura, o bé amb el líquid de MALL.

## PREPARACIÓ DELS REACTIUS

- Preparació de la solució tampó

Solució saturada de bòrax .....	30cc
Aigua destil·lada .....	70 cc
- Preparació de la solució enzimàtica

Tripsina .....	0,45 gr
Tampó «bòrax» .....	400 cc

Ajusteu el pH a 7,5.

Una altra tècnica de transparentat enzimàtic va ser proposada per DINGERKUS i UHLER (1977):

1. Ho fixarem en formol al 10%, durant 2 o 3 dies.
2. Ho rentarem amb aigua destil·lada, durant 2 o 3 dies, renovada unes quantes vegades.
3. Escorxarem i esbudellarem l'animal, tan bé com sabrem. Si es tracta d'un peix, li traurem les escates.
4. Ho deixarem de 24 a 48 hores en la barreja següent:

Blau d'alcian 8GN .....	10 mgr
Alcohol etílic 96° .....	80 cc
Àcid acètic glacial .....	20 cc
5. Ho rentarem amb alcohol de 96° dues vegades; romandrà de 2 a 3 hores en cada alcohol.
6. Posarem l'animal en aigua destil·lada durant 2 o 3 hores.
7. Actuació de la solució enzimàtica següent:

Tripsina .....	1 gr
Solució aquosa saturada de bòrax .....	30 cc
Aigua destil·lada .....	70 cc

20. Si hom té dificultats a obtenir l'enzim, es pot assajar qualsevol dels medicaments receptats per afavorir els processos digestius i que tenen enzims proteolítics; com també l'aplicació de petites quantitats de papaïna en una solució de bòrax a l'1%, de 12 a 24 hores a uns 30 °C.

Com sempre, caldrà ajustar el temps al tipus i la grandària de l'exemplar amb què es treballa.

Cal tenir present que aquestes digestions es poden fer servir per a la neteja integral dels ossos, per a la preparació de cranis, dents, esquelets en general. Una de les tècniques més efectives és l'adaptació de SEARLE (1954) a la tècnica de HEARLE (1949). Un cop treta la pell i les vísceres de l'animal, es fa bullir uns 5 minuts en una solució isotònica salina; a continuació, es fa una incubació del material durant 2 dies a 38 °C en la mateixa solució salina, a la qual es posa un 0,01% de papaïna. S'han de fer les operacions següents: rentar-ho amb aigua abundant, blanquejar-ho amb aigua oxigenada, desgreixar-ho amb acetona durant tota una nit i deixar-ho assecar.

Cada dos o tres dies canviarem la solució, que va agafant color, fins que es destenyeixi. Pot arribar a trigar de 2 a 3 setmanes.

8. Ho passarem a KOH al 0,5%, al qual s'afegeix roig d'alitzarina S, fins que agafa una tonalitat vermellosa. Ho deixarem de 24 a 48 hores, fins que els ossos es tornin de color vermell.
9. Ho passarem a fer una sèrie de glicerina KOH al 0,5%, en graduació ascendent, és a dir: 3 parts de KOH 0,5% i 1 part de glicerina; 2 parts de KOH 0,5% i 2 parts de glicerina, i 1 part de KOH 0,5% i 3 parts de glicerina.  
A la primera de les solucions cal afegir dues o tres gotes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per cada 100 cc de solució, per tal de blanquejar totalment l'exemplar.
10. Conservarem els animals en glicerina pura, a la qual cal posar-hi uns cristallets de timol, perquè no hi creixin bacteris ni fongs.

**Nòtula:** Exemplars fixats o conservats durant molts anys en formol o en alcohol han estat transparentats amb èxit; ha calgut, però, allargar el temps de transparentat.

## BIBLIOGRAFIA

- DINGERKUS, G., UHLER, L.D. (1977). «Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage». *Stain Technology*, Vol. 52 núm. 4, 229-232.
- JOOSE, J., LEVER, J. (1958). «Techniques of narcotization and operation for experiments with *Limnaea stagnalis* (Gastropoda pulmonata)». *Zoology*.
- LOCQUIN, M., LANGERON, M. (1985). Manual de microscopía. Ed. Labor, S.A. Barcelona.
- LUTHER, P.G. (1949). «Enzymatic maceration of skeletons». *Proc. Linn. Soc. London.*, Vol. 161, 146.
- PANTIN, C.F.A. (1968). «Técnicas microscópicas para zoólogos». León.
- ROMEIS, B. (1928). «Guía formulario de técnica histológica». Barcelona.
- SEARLE, A.G. (1954). «Genetical studies on the skeleton of the mouse. IX. Causes of skeletal variation within pure lines». *J. Genet.*, Vol. 52: 68-102.
- SEGUY, E. (1949, 1951). «Le microscope, emploi et applications», Vol. I-II. París.
- SEGUY, E. (1970). «Initiation à la microscopie». París.
- TAYLOR, W.R. (1967). «An enzyme method of clearing and staining small vertebrates». *Proc. United States National Museum, Smithsonian Inst.*, 122, núm. 3596.
- WALLIS, T.E. (1968). «Microscopía Analítica». Zaragoza.



# ÍNDEX

PRESENTACIÓ.....	3
------------------	---

<b>TÈCNiques SENZILLES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS.....</b>	<b>5</b>
---	----------

<b>I ESTRUCTURES VEGETALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, NO CAL OBTENIR TALLS.....</b>	<b>5</b>
OBTENCIÓ I PREPARACIÓ PERMANENT DE DIVERSOS TIPUS DE MATERIAL	6
Diatomees. Esporangis de falguera. Hifes i esporangis de fong. Espores de boiet. Pol·len. Tricomes.....	6
<b>II ESTUDI DE TALLS VEGETALS.....</b>	<b>7</b>
TINCIONS RECOMANADES.....	8
Tincions temporals.....	8
Tincions i preparacions permanents.....	9
PREPARACIÓ DE REACTIUS.....	12
ON RECÓRRER PER TROBAR ESTRUCTURES I TEIXITS VEGETALS.....	15
BIBLIOGRAFIA.....	18

<b>TÈCNiques D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS D'ESTRUCTURES I TEIXITS ANIMALS.....</b>	<b>20</b>
--	-----------

<b>A. PREPARACIONS TEMPORALS.....</b>	<b>20</b>
---------------------------------------	-----------

<b>B. PREPARACIONS PERMANENTS.....</b>	<b>23</b>
--	-----------

B.1. PREPARACIÓ D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, NO CAL OBTENIR TALLS.....	23
Foraminífers. Protozous actuals.....	23
Rádules. Escates de papallona. Peces quitinoses (genitàlies).....	24
Escates de peixos. Pèls de mamífers. Plomes. Ossos.....	25
EXTENSIONES DE SANG.....	26

B.2. PREPARACIONS D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS. PER A LLUR ESTUDI, CAL OBTENIR TALLS.....	28
---	----

TINCIÓ DE TALLS ANIMALS OBTINGUTS PER INCLUSIÓ EN PARAFINA.....	30
---	----

TÈCNiques MOLT ESPECÍFIQUES.....	32
----------------------------------	----

Hematoxilina fèrrica, segons Heindenhein. Tècnica del PAS (àcid per-lòdic de Schiff).....	32
Tècnica de Feulgen i Rossenberk. Tècnica de Pappenheim-Unna. Impregnació en bloc, pel mètode de Cajal.....	33

PREPARACIÓ DELS REACTIUS ESMENTATS.....	34
---	----

Líquids o sérum fisiològics.....	34
----------------------------------	----

Fixadors.....	35
---------------	----

Colorants.....	36
----------------	----

MEDIS DE MUNTATGE MÉS EMPRATS PER FER REPARACIONS PERMANENTS.....	39
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	40

<b>TÈCNiques DE TRANSPARENTAT D'INVERTEBRATS I D'ESQUELETS DE VERTEBRATS; APLICACIONS</b> .....	42
<b>INVERTEBRATS</b> .....	42
ANESTÈSICS RECOMANATS .....	42
FIXADORS MÉS FREQUENTS .....	43
ACLARIDORS MÉS EMPRATS PER TRANSPARENTAR ELS TEGUMENTS COLORANTS .....	43 44
<b>VERTEBRATS</b> .....	45
TRANSPARENTAT I TENYIT DE CARTÍLAG I OS .....	45
TRANSPARENTAT I TENYIT D'OS .....	46
PREPARACIÓ DELS REACTIUS ESMENTATS .....	46
MÈTODES ENZIMÀTICS .....	46
PREPARACIÓ DELS REACTIUS .....	47
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	48



