



Monografies de les Seccions de Ciències, 18

INICIACIÓ A LES TÈCNiques HISTOLÒGIQUES VEGETALS I ANIMALS

i nota sobre les tècniques de transparentat

per Mercè Durfort i Coll

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

Monografies de les Seccions de Ciències, 18

SECCIÓ DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

INICIACIÓ
A LES TÈCNIQUES
HISTOLÒGIQUES
VEGETALS I ANIMALS

i nota sobre les tècniques de transparentat

MERCÈ DURFORT I COLL

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

BARCELONA, 2006

INICIACIÓ A LES TÈCNIQUES
HISTOLÒGIQUES VEGETALS I ANIMALS
I NOTA SOBRE LES TÈCNIQUES
DE TRANSPARENTAT

FOTOGRAFIES DE LA SOBRECORTA

D'esquerra a dreta i de dalt a baix: tall de pell (berruga, tinció amb Mallory), papil·les linguals (observació amb microscopi confocal), tall de llengua (tinció amb Mallory), tall transversal de fulla de monocotiledònia (tinció amb blau de metilè), tall transversal de fulla de dicotiledònia (tinció amb picrofucsina), tall transversal d'arrel de dicotiledònia (tinció amb blau de metilè). El fons és teixit ossi.

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

Monografies de les Seccions de Ciències, 18

SECCIÓ DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

INICIACIÓ
A LES TÈCNIQUES
HISTOLÒGIQUES
VEGETALS I ANIMALS

i nota sobre les tècniques de transparentat

MERCÈ DURFORT I COLL
Membre de l'Institut d'Estudis Catalans

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS
BARCELONA, 2006

Durfort i Coll, Mercè

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals i nota sobre les tècniques de transparentat. — (Monografies de les seccions de ciències ; 18)

Bibliografia

ISBN 84-7283-883-8

I. Institut d'Estudis Catalans II. Títol

III. Col·lecció: Monografies de les seccions de ciències ; 18

1. Histologia — Tècnica 2. Tínció (Microscòpia)

611.018

Disseny gràfic: Maria Casassas

© Mercè Durfort i Coll

© 2006, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: desembre de 2006

Tiratge: 1.000 exemplars

Text revisat lingüísticament per l'Oficina de Correcció i Assessorament Lingüístics de l'IEC

Compost per fotocomposició gama, s. l.

Imprès a Limpergraf, SL

ISBN: 84-7283-883-8

Dipòsit Legal: B. 51746-2006

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

PRESENTACIÓ

Quan l'any 1975 la Institució Catalana d'Història Natural (ICHN) va pensar organitzar uns seminaris teoricopràctics 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 aprenguessin 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 (*genitalia* 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, ocells 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 d'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 ampliacions, de modificar-los i d'editar-los tots junts.

He seguit aquestes possibilitats de manera diferent. 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, a l'inici del segle XXI. Sobre aquest punt vull fer una matisació: la majoria dels laboratoris 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.

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 Secció de Ciències Biològiques, 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 oferir 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.

1. TÈCNIQUES SENZILLES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS

1.1. INTRODUCCIÓ

L'estudi de les estructures histològiques i citològiques dels vegetals és tècnicament més senzill que l'observació de material animal, ja que, amb habilitat, podem obtenir talls relativament fins sense necessitat de fer-ne inclusions; això és per la particularitat de 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.

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

Material com ara algues unicel·lulars o filamentoses, esporangis de falguera, fongs i bolets, grans de pol·len, tricomes, epidermis arrencades de fulles, etc., poden observar-se directament al microscopi posant-los amb una gota d'aigua entre portaobjectes i cobreobjectes. Algunes de les estructures esmentades tenen una coloració pròpia (espores, pol·len, tricomes) que permet de veure-les

fàcilment. A les altres (diatomees i diverses algues unicel·lulars, etc.), en fer-ne l'observació, caldrà donar-los el màxim de contrast possible mitjançant el tancament del diafragma i fent, en alguns casos, il·luminació obliqua, etc.

També és interessant l'observació *in vivo* 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,¹ de Hoyer, d'albúmina glicerinada, etc.

2. Primer el posem en una gota de goma aràbiga, el deixem assecar i seguidament hi posem una gota de bàlsam del Canadà i el cobreobjectes (aquesta tècnica fou proposada per mossèn J. Pujiula).

3. Deshidratem el material, és a dir, ho deixem:

- de 5 a 10 minuts en alcohol de 70°
- de 5 a 10 minuts en alcohol de 90°
- de 5 a 10 minuts en alcohol absolut
- de 10 a 15 minuts en essència (eucaliptus, creosota, etc.)
- 5 minuts en xilè (o toluè quan el muntatge és amb rhenohistol)
- muntatge en una gota de bàlsam del Canadà, reïna Dammar, DPX o en qualsevol altre medi adient.²

1. Si el medi de muntatge és la glicerina, cal recordar que aquesta no s'asseca mai, per la qual cosa caldrà vorejar o segellar la preparació mitjançant esmalt d'ungles, parafina fosa, etc. Si són uns altres medis de muntatge, hidrosolubles o no hidrosolubles, no cal fer aquest segellament, ja que s'assequen.

2. El muntatge amb bàlsam o amb reïna Dammar és el recomanat, sempre que es pugui, car té un índex de refracció molt adequat per a les observacions microscòpiques habituals. (Vegeu els índexs de refracció de l'apartat 1.3.3.) El DPX

1.2.1. *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 porta-objectes i, quan s'hagi evaporat l'aigua, hi posarem una gota de bàlsam.

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

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

— Esporangis de falguera

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

Escampem el material amb una agulla.

Deixem assecar la goma i hi posem la gota de bàlsam del Canadà o de reina Dammar.

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'1 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 pelussa i la fixem en alcohol de 70°.

únicament es fa servir per muntar talls vegetals obtinguts a partir d'inclusions en parafina, és a dir, si són talls fins (set, deu o vint micres de gruix).

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

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

ADVERTIMENT: Després de la fixació, hi podem fer una tinció de 5 a 10 minuts en blau de metilè o en blau cotó al 0,5 % o bé en fucsina àcida a l'1 % durant 5 minuts. 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 porta-objectes, 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.

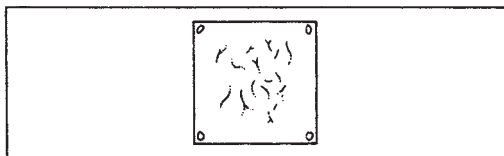
Recomanem fer observacions de pol·len de pi, per les vesícules aeríferes o flotadors que té, i també de carabassa, per la morfologia de l'exina i perquè és fàcil l'observació dels porus germinatius operculats, així com per llur grandària.

— 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 la gran variabilitat de cèl·lules 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 a l'aire o bé en un dels medis citats.

ADVERTIMENT: El muntatge a l'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 epidermis arrencada en alcohol de 70°; com que és tan prima, amb 10 minuts 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 minuts.

Ho rentem durant 5 minuts amb aigua destil·lada.

Ho deixem 5 minuts en eosina

Deshidratació amb alcohol absolut (10 minuts) i muntatge.

ADVERTIMENT: L'epidermis arrencada i muntada directament sobre una gota d'aigua es veu, observada amb poca llum, força bé.

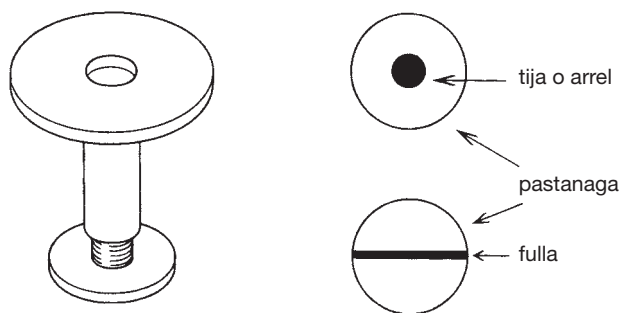
Recomanem l'epidermis de fulla de lliri i l'epidermis de les fulles carnosos de la ceba. Són molt curiosos els estomes de les fulles de gramínies i de fulles d'*Agave americana* o de plantes similars.

1.3. ESTUDI DE TALLS VEGETALS

Per a l'estudi histològic de fulles, pecíols, 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 o de Ranvier.

Tant en 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 que tallem 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 per 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 minuts 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 minuts amb 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 meristemes radicals o caulinars, brots, com també fulles, és a dir, òrgans «tendres», podem fer una inclusió en parafina, amb la qual s'obtenen talls d'uns 2 a 7 micròmetres de gruix.

Els òrgans vegetals formats per teixits heterogenis, amb quantitats importants de colènquima i d'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.

1.3.1. 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.

Cloroiòdur de zinc: 10 minuts en una solució de cloroiòdur 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 groc
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'hili, 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 el cobreobjectes i tot seguit procedim a l'escalfament (*squash*).

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

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

— Tincions i preparacions permanents

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

— Fàcil

- de 10 a 20 minuts en líquid de Fàbil
- ho rentem amb aigua destil·lada

Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals

- ho muntem en una gota de glicerina
- segellem el cobreobjectes amb laca.

RESULTATS: cel·lulosa..... blau
lignina vermell
nucli i cloroplasts vermell
midó blau

ADVERTIMENT: A la llarga, la preparació perd color.

- Mètode de Van Gieson o tinció amb picrofucsina
 - 15 minuts en picrofucsina (sobretinció)
 - 3 o 4 rentatges de 5 minuts amb alcohol de 90° fins que l'alcohol deixi de ser tenyit
 - de 5 a 10 minuts en alcohol absolut
 - de 10 a 15 minuts en xilè
 - ho muntem amb una gota de bàlsam del Canadà o amb qualsevol altre medi de muntatge d'aquest tipus, com la reïna Dammar.

RESULTATS: cel·lulosa vermell
lignina groc
nucli i cloroplasts vermell

- Hematoxilina - picrofucsina
 - de 5 a 6 minuts en hematoxilina (de Delafield o de Friedlander, etc.)
 - 10 minuts 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 minuts en picrofucsina
 - 3 o 4 rentatges amb alcohol de 90° fins que l'alcohol deixi de tenir color
 - ho acabem de deshidratar i ho muntem amb bàlsam del Canadà, segons la tècnica ja esmentada.

RESULTATS: cel·lulosa blau
lignina groc
nuclis blau
cloroplasts vermell

- Blau de metilè - picrofucsina (tècnica molt semblant a l'anterior)
 - 5 minuts en blau de metilè a l'1 %

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- diversos rentatges amb aigua destil·lada, fins que deixi de tenir color
- 10 minuts en picrofucsina
- 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 vermell

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

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

RESULTATS: cel·lulosa blau fort
 lignina rosa
 nucli i cloroplasts blavós

— Negre de clorazol (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 minuts en negre de clorazol (solució alcohòlica saturada)
- ho rentem amb alcohol de 90°
- de 5 a 10 minuts en alcohol absolut
- de 5 a 10 minuts en essència
- 10 minuts en xilè, bàlsam del Canadà o similar.

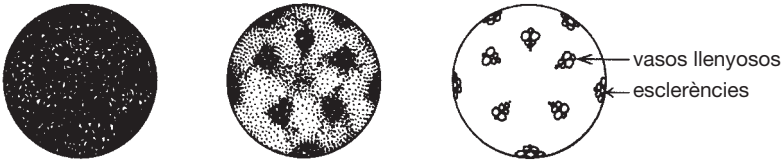
RESULTATS: quitina negre intens

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

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

Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals

- Tionina - hematoxilina (segons la tècnica de Fernández-Galiano)
 - 5 minuts en tionina a l'1 % (si augmentem el temps, no passa res, ja que és una tinció regressiva)
 - diferenciem en HCl al 50 %: no hi ha temps prefixat; cal vigilar fins que només es vegin les àrees lignificades³



- ho rentem amb aigua abundant bo i agitant, de 5 a 10 minuts
- 5 minuts en hematoxilina
- ho rentem 5 minuts amb aigua destil·lada⁴
- deshidratació: amb la sèrie d'alcohols, ho passem per l'essència, el xilè i, finalment, ho muntem amb bàlsam.

RESULTATS: cel·lulosa vermell
lignina blau verd

- Safranina - blau de metilè
 - de 15 a 30 minuts en safranina al 2 %
 - ho diferenciem amb alcohol clorhídric (100 cc d'alcohol de 70° més 25 cc de HCl)
 - no hi ha temps prefixat; cal esperar que només hi quedin uns punts vermells que corresponen a les regions lignificades
 - ho rentem amb aigua de 5 a 10 minuts

3. A vegades hom fa una sobretinció; després es «diferencia», és a dir, és des-tenyit de mica en mica tot —en aquest cas amb HCl—, menys les regions lignificades, a les quals, pel fet de tenir molta afinitat per la tionina, els 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 Heidenhain.

4. Normalment, després de tenyir amb hematoxilina, hom fa un rentatge amb aigua corrent, de l'aixeta, per provocar el viratge esmentat anteriorment. 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.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- ho tenyim amb blau de metilè al 2 % i ho escalfem fins que se'n desprenguin vapors
- ho rentem 5 minuts 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 meristemes, 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 en Carnoy (cloroform, alcohol absolut i àcid acètic, en la proporció de 3:6:1). El temps de fixació és de 13 a 24 hores.

Calen talls molt fins, d'uns 10 micròmetres, 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 minuts en xilè
- 10 minuts en alcohol absolut
- 10 minuts en alcohol de 90°
- 10 minuts en alcohol de 70°
- 10 minuts en aigua destil·lada

(fins ací és la tècnica habitual)

- de 12 a 24 hores en sulfat fèrric amònic (alum de ferro) al 5 % (fa de mordent)
- rentatge ràpid amb aigua destil·lada
- de 12 a 24 hores en hematoxilina de Heidenhain (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 minuts rentat amb aigua corrent
- 5 minuts rentat amb aigua destil·lada
- deshidratació habitual, amb essència, xilè i, finalment, bàlsam del Canadà.

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

Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals

— 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 minuts en hematoxilina de Groat
- 10 minuts rentat amb aigua corrent
- 3 minuts en picrofucsina, que actua com a agent diferenciacador.

— Hematoxilina de Weigert

- de 20 a 30 minuts en hematoxilina de Weigert
- rentat durant 10 minuts amb aigua corrent
- deshidratació
- muntatge.

Aquest mètode és en la línia del precedent. És recomanat per a la visió de figures de mitosi i té el gran avantatge que és ràpid.

— Sudan III (per a la tinció específica del súber o suro)

- de 10 a 15 minuts en Sudan III
- rentatge ràpid en alcohol de 70°
- rentatge amb aigua destil·lada
- ho muntem amb glicerina i segellem el cobreobjectes amb laca d'ungles.

1.3.2. Preparació de reactius

— Lactofenol d'Amann (100 cc)

àcid fènic	10 g
àcid làctic	10 g
glicerina	20 g
aigua destil·lada	10 cc

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

blau de metilè	1 g
aigua destil·lada	100 cc

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

— Cloroiòdur de zinc (líquid de Schultze)

clorur de zinc	30 g
iodur potàssic	5 g
iodè	1 g
aigua destil·lada	15 cc

— Eosina o eritrosina

eosina	1 g
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 g
lactofenol	100 cc

Solució B:

fucsina bàsica	0,5 g
lactofenol	100 cc

Solució C:

iodè	0,3 g
iodur potàssic	0,6 g
lactofenol	100 cc

Barregem: sol. A	80 cc
sol. B	20 cc
sol. C	100 cc

La conservació és indefinida.

— Hematoxilina

Hematoxilina de Delafield

Solució A:

hematoxilina	4 g
alcohol absolut	25 cc

Solució B:

sulfat alumínic amònic (alum amoniacal)	40 g
aigua destil·lada	400 cc

Barregem la solució A amb la B. Al cap de 4 o 5 dies, la filtrem i hi afegim:

glicerina	100 cc
alcohol metílic	100 cc

Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals

Passats 4 o 5 dies, la filtrarem 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 g

alcohol absolut 100 cc

Solució B:

sulfat alumínic potàssic (alum potàssic) 2 g

aigua destil·lada 100 cc

glicerina 100 cc

Barregem la solució A amb la B.

La deixarem 14 dies en una botella, sense tapar, 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 g

aigua destil·lada 50 cc

Solució B:

hematoxilina 0,5 g

alcohol de 96° 50 cc

Barregem la solució A amb la B. Passades 1 o 2 hores, ho filtrem i ja es podrà fer servir.

Es conserva uns 3 mesos, per la qual cosa és millor preparar-ne poc i sovint.

Hematoxilina de Heidenhain (hematoxilina fèrrica)

Solució mare:

hematoxilina 1 g

alcohol absolut 10 cc

aigua destil·lada 90 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant 1 mes. Abans de fer-la servir, la diluïrem a la meitat.

Hematoxilina de Weigert

Solució A:

hematoxilina	1 g
alcohol de 96°	100 cc

Solució B:

perclorur de ferro	4 g
àcid clorhídric	1 g
aigua destil·lada	95 cc

La solució A ha de madurar durant 1 mes dins d'una botella oberta.

Les solucions A i B es guarden per separat, i 10 o 15 minuts abans de fer servir el colorant es barregen a parts iguals. Aquesta solució no es conserva més de 24 hores.

— Lugol (solució iodoiodurada) (específic per al midó)

negre de clorazol	1 g
iodur potàssic	2 g
aigua destil·lada	100 cc

— Negre de clorazol (específic de la quitina)

negre de clorazol	1 g
alcohol de 70°	100 cc

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

— Orceïna

a) Preparació en fred

Solució mare:

orceïna	1 g
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 g
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 una altra s'hi afegeix HCl en la proporció de 9:1, tenim la solució A de la tècnica descrita anteriorment.

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

— Picrofucsina

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

àcid pícric en solució aquosa saturada 100 cc

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

— Roig Congo

roig Congo 0,5 g

aigua destil·lada 100 cc

— Roig de ruteni (específic de la pectina)

roig de ruteni 0,5 g

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 g

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 g o 2 g

aigua destil·lada 100 cc

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

Si no diem el contrari, un cop 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 «madurar». 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.

1.3.3. *Medis de muntatge més emprats per fer preparacions permanents*

<i>Hidrosolubles</i>	<i>No hidrosolubles</i>	<i>Muntatge doble amb</i>
Aquatex Gelatina glicerínada Glicerina Goma aràbiga Lactofenol	Bàlsam del Canadà (és el medi de muntatge més clàssic) Clearium DPX (asseca molt ràpidament i solament és idoni per muntar els talls de material inclòs en parafina) Hyrax Mycromount Reina Dammar	goma aràbiga - bàlsam

Recordem que, en casos especials, és interessant muntar a l'aire (trícomes, 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, el que és fonamental tenir en compte és llur índex de refracció, la qual cosa va íntimament relacionada amb el tipus d'estructura que es prepara.

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

Lactofenol	1,44	Bàlsam	1,53
Glicerina	1,49	Dammar	1,50-1,53
Oli de cedre	1,51	DPX	1,55
Clorofenol	1,52	Hyrax	1,60

1.3.4. On recórrer per trobar estructures i teixits vegetals

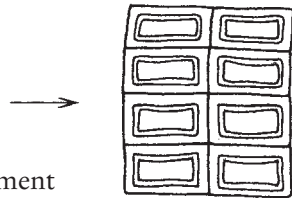
- Epidermis cutinitzada
Fulles: *Nerium*, *Eucalyptus*.
Tiges: *Ruscus*, *Olea*, etc.



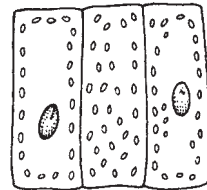
- Epidermis cerificada
Fulles: *Ficus* i semblants, clavell...
Tiges: clavell, roser.



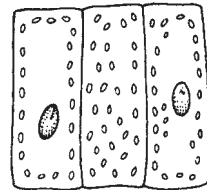
- Epidermis mineralitzada
Fulles: equisets, gramínies.
Tiges: equisets, gramínies.



- Epidermis suberificada
Tiges: qualsevol que presenti creixement secundari.
Arrels: pràcticament totes.
Fulles: no s'empren mai.



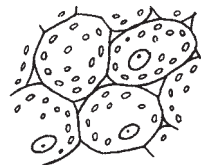
- Parènquima clorofil·lic
Fulles: a l'anvers parènquima en palissada
al revers parènquima de cèl·lules rodones



Si la fulla no té simetria bilateral, no hi haurà diferències histològiques entre les dues cares de les fulles, *Viscum album* (vesc), com és el cas de les fulles de monocotiledònies.

El primer cas és el més freqüent.

Tiges: normalment sota l'epidermis hi ha una o dues capes de col·lenquima i tot seguit ve el parènquima clorofil·lic de cèl·lules rodones.



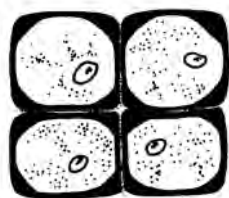
La biodiversitat d'espècies és tan gran que l'experiència indica que hi ha nombroses variacions del model tradicional que indiquen els llibres. Per exemple, en el cas de la tija del fonoll, *Foeniculum vulgare*, sota l'epidermis biseriada hi ha nòduls de col·lenquima o d'esclerènquima que separen franges 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 de magnòlia trobem una magnífica anella d'esclerènquima envoltant els feixos vasculars.



Tiges: molt freqüent sota l'epidermis (fonoll), o bé entre els vasos lignosos, on constitueixen una franja contínua (vinya).

Acompanyant els feixos de vasos conductors, sempre acostuma a haver-hi esclerènquima.

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

— Cèl·lules pètries

Fulles: no gaire freqüent (*Camellia japonica*).

Fruits carnosos: la pera i la poma i, sobretot, el codony són un bon lloc per trobar-ne.

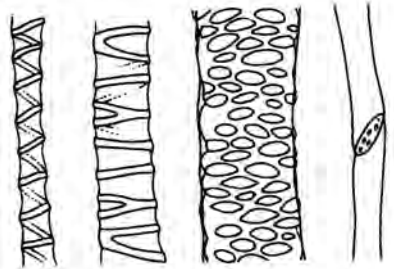
L'observació detinguda de les parets de les cèl·lules pètries permet veure-hi els plasmodemes.



— Vasos conductors

Fulles, tiges i arrels.

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



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

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

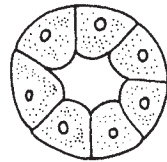
— Conductes resinífers

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

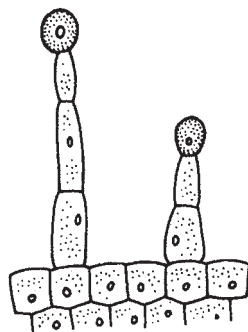
Fulla de taronger, llimoner, d'eucaliptus, etc.



Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

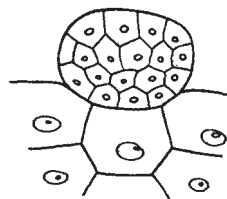
— Glàndules peltades

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



— Glàndules sèssils

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



— Estomes

Fulles, a l'epidermis, i tiges sense creixement secundari.



— Cambres estomàtiques

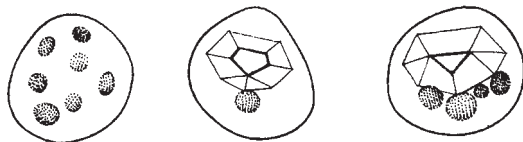
Fulles, a l'epidermis del revers. El cas més típic és el del baladre (*Nerium oleander*).

— Lenticel·les

Epidermis suberificades de tiges: figueres, rosers, patata, etc.

— Midó

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

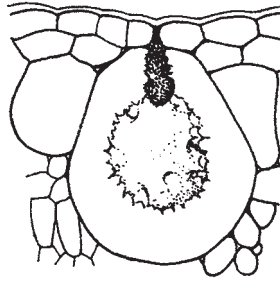


— Aleurona

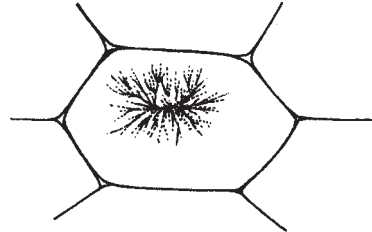
Llavor de ricí.

— Cristalls

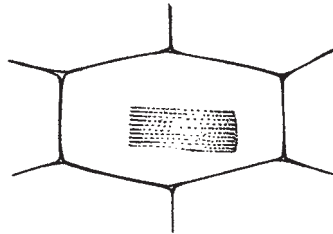
Cistòlits: un nivell de l'epidermis de fulles de *Ficus*, *Parietaria officinalis*, ortiga.



Druses de carbonatat i d'oxalat càlcic: fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben en parènquima no clorofil·lic (*Magnolia*, *Lonicera*, *Vitis*, etc.).

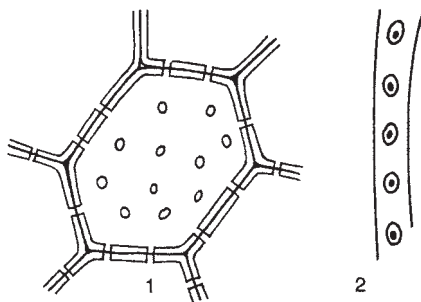


Rafidis: fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben en parènquima no clorofil·lic. Vinya (*Vitis vinifera*). Lliri (*Iris germanica*).



— Puntuacions de la paret cel·lular

- 1) senzilles: medul·la de saüc (*Sambucus nigra*), de *Ruscus aculeatus*.
- 2) areolades: fusta de pi i d'avet.



ADVERTIMENT: En els 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.

1.4. BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ NOGAL, R. (2002). *Atlas de histología y organografía de las plantas*. Ediciones de la Universidad de León.
- BERNIS MATEU, J. (1976). *Atlas de microscopia*. Barcelona: Jover.
- BRACEGIRLE, B.; MILES, P. H. (1975). *Atlas de estructura vegetal*. Madrid: Paraninfo. [Per interpretar]
- ESAU, K. (1985). *Anatomía vegetal*. Barcelona: Omega.
- GARCÍA ESTEBAN, L.; GUINDEO, A. (1988). *Anatomía e identificación de las maderas de coníferas españolas*. Madrid: Aitim.
- (1988). *Anatomía de frondosas españolas*. Madrid: Aitim.
- JOHANSEN, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, Co. Inc. [Part tècnica]
- KROMMENHOEK, W.; SEBUS, J.; VAN ESCH, G. J. (1986). *Atlas de histología vegetal*. Madrid: Marban.
- NACHTIGALL, W. (1997). *Microscopia*. Barcelona: Omega.
- NEZELOF, C.; HINGLAIS, N.; GALLE, P. (1975). *Técnicas microscópicas*. Barcelona: Jims.
- PUJULÀ, J. (1957). *Citología. Parte práctica*. Barcelona: Tip. Cat. Casals. [Part tècnica; exhaurit]
- ROBERT, D.; RONALD, J. C. (1989). *Biologie végétale*. París: Doin.

- SEGUY, R. (1949 i 1951). *Le microscope, emploi et applications*. Volum I i II. París: Lechevalier. [Part tècnica]
- STRASBURGER, E. (2004). *Tratado de botánica*. 35a ed. Barcelona: Omega. [Per interpretar]
- WALLIS, C. J. (1955). *Biología práctica*. Madrid: Aguilar. [Part tècnica]

1.5. VÍDEOS

- DURFORT, M. (1991). *Tècniques d'obtenció de preparacions vegetals*. ICE. Universitat de Barcelona.
- *Introducció a l'estudi dels teixits vegetals*. ICE. Universitat de Barcelona.

1.6. PRINCIPALS MARQUES DE REACTIUS PER A MICROSCÒPIA

Chroma
Fluka
Gürr
Merk

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

1.7. 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.

2. TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS D'ESTRUCTURES I DE TEIXITS ANIMALS

2.1. 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 i sigui tan important, 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 tan informativa com es pugui, 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 d'estudi 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 fo-

tografiades, es desfan, i *preparacions permanents*, que es poden conservar anys, sense que perdin l'interès.

2.2. 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:

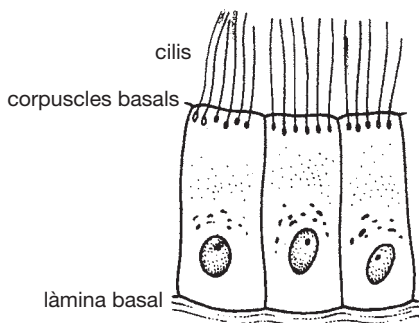
I. Preparació de làmines branquials

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 pal·leal.

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 diafragma per aconseguir més contrast.

ADVERTIMENT: Observeu-hi el moviment dels cilis 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.



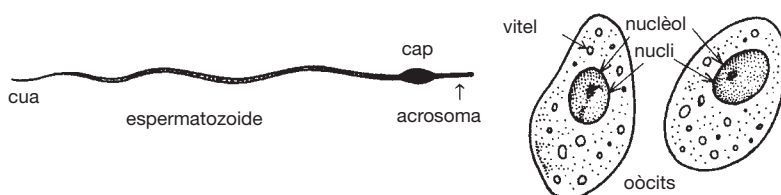
II. Preparació de gònades

1. Tallarem un trosset de bossa de putxinel·li (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 cal fer la comprovació final 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.

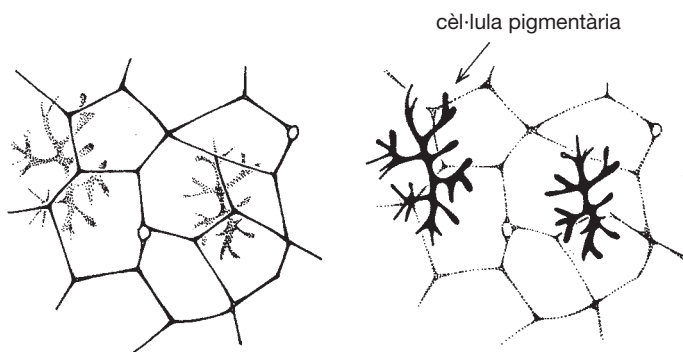
ADVERTIMENT: Observeu-hi, amb el diafragma força tancat, les fibres musculars llises, fusiformes. Aquest material pot muntar-se en una gota de glicerina, i la preparació, en aquest cas, és permanent.

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 augments més grans, les cèl·lules epitelials, poligonals i aplanades, entre les quals hom pot veure els orificis excretors de les glàndules (molt abundants en la pell d'aquesta espècie); 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 traurem 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 que hi haurà per 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: Observeu-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 els ciliats:

Nyctotherus codiformis

Balandidium entozoon

Trichodina pediculus

i el flagel·lat:

Opalina ranarum.⁵

També poden observar-s'hi diverses espècies de nematodes, cestodes i trematodes 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 trematodes i cestodes). 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 trematodes següents:

Cephalogonimus sp.

Opisthoglyphus ranae

IV. Preparació d'espermatozoides

1. Tallarem amb una fulla de bisturí o d'afaitar un testicle de la granota i el posarem 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: Observeu-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 segellar 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. El pernil dolç acostuma a ser adulterat amb fècula de 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 1 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 en l'apartat 2.3.2.

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

2.3. 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

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals 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.

2.3.1. *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:

a) Muntar directament amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (reïna Dammar).

b) 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.

c) Muntar a l'aire, és a dir, posar el material en sec sobre un portaobjectes i, tot seguit, dipositar 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 se segellarà 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.⁶

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.

6. G. COLOM, «Foraminíferos ibéricos». *Invest. Pesquera*, vol. 38, núm. 1, Barcelona, 1974.

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 tenyeixen i es conserven en lugol, encara que aquest pot fer-se servir directament com a fixador.⁷

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 assecar i, posteriorment, es munta amb reïna Dammar.
 - 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 minuts en alcohol de 70°
- 15 minuts en alcohol de 90°
- 15 minuts en alcohol absolut
- de 15 a 30 minuts en essència d'eucaliptus
- 5 minuts en xilè.

Ho muntarem amb una gota de reïna Dammar.

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 en fucsina àcida a l'1 %.

Ho rentarem amb aigua destil·lada que tingui unes gotes d'àcid acètic.

7. J. SCHWOERBEL, *Métodos de hidrobiología*, Madrid, Blume, 1975.

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

b) 10 minuts en hematoxilina de Delafield.

Ho rentarem durant 30 minuts amb aigua de l'aixeta.

c) 10 minuts en blau de metilè al 0,1 %, o bé 2 minuts en 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 a l'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, *genitalia*, 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 mínusculs detalls de la quitina d'aquestes estructures, caldrà deixar assecar molt bé el material, fins que quedi ben deshidratat. Això es pot fer de dues maneres: o bé el deixarem assecar 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 de la pàgina 42.)

Si es tracta d'una *genitalia*, en extreure'n les peces sota la lupa binocular, queden, lògicament, 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 s'haurà de calcular en cada cas; quan es treballa en calent, el temps, lògicament, és molt més curt. (Vegeu el capítol 3.) 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.⁸ 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 1 hora.
- Les passarem per aigua destil·lada.
- Farem una tinció facultativa d'1 hora amb fucsina àcida a l'1 %.
- 15 minuts en aigua destil·lada.
- 10 minuts en alcohol de 70°.
- 10 minuts en alcohol de 90°.
- 10 minuts en alcohol absolut.
- 15 minuts en essència.
- 5 minuts en 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 1 hora.
- Els passarem per aigua destil·lada.
- Els deixarem eixugar a l'aire, o bé dins una estufa.

8. 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).

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

- 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 1 hora amb aigua oxigenada de 30 volums, perquè es descolori. 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 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.

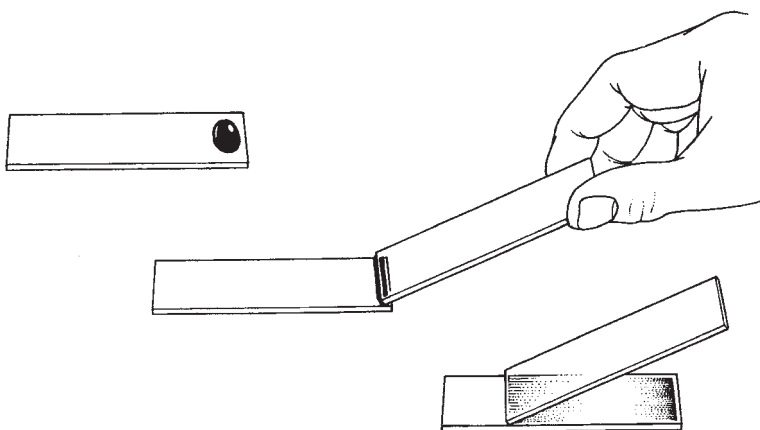
Una vegada el fragment és ben transparent, cal rentar-lo amb força aigua de l'aixeta, primerament, i destil·lada, després. Ho deixarem assecar i ho muntarem a l'aire, o bé amb goma aràbiga i bàlsam, o, senzillament, amb bàlsam; cal buscar el medi de muntatge que doni més contrast a l'estructura que observem.

ADVERTIMENT: Cal assenyalar que algunes cases comercials disposen de micròtoms adients per tallar cossos durs, com és l'os, ja que la ganiveta té un aliatge 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.

10. Preparacions 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 des-

greixat i amb l'ajut d'un segon portaobjectes, si és possible esmerilat, es fa l'extensió o frotis, segons l'esquema següent:



- S'asseca l'extensió a l'aire.
- 5 minuts de fixació en metanol, o bé en 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.⁹
- 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 que seguirem en aquest cas és:

- 5 minuts de fixació en metanol, o bé en sublimat corrosiu.
- Decantarem el fixador i ho assecarem amb paper de filtre.
- Ho tenyirem durant 15 minuts amb hematoxilina.¹⁰

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

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

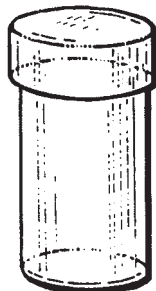
Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

- Ho rentarem durant 30 minuts amb aigua de l'aixeta.¹¹
- Ho tenyirem durant 5 minuts amb eosina¹² a l'1 %.
- Ho rentarem diverses vegades, dues o tres, amb alcohol de 96°.
- Ho assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu amb DPX.

ADVERTIMENT: La casa Harleco té un equip de tinció, Diff-Quick,¹³ 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 la tècnica de Wright-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, 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 el fixador; cada vegada s'hi deixa durant 1 segon.
- El submergirem cinc vegades en el flascó que conté la solució I, durant 5 segons, amb immersions d'1 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 solució II.
- El rentarem durant 2 o 3 minuts amb aigua destil·lada.
- L'assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu, encara que recomanat, amb DPX.



Flascó de 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 que estudiem no és la humana; cal assajar el temps

11. 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.

12. L'eosina és un colorant eminentment citoplasmàtic.

13. Podem trobar-lo a Rubilabor (tel. 935 882 515).

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

per a cada espècie. Els productes són molt tòxics: precaució! Aquestes solucions es conserven a temperatura ambient (de 15 °C a 30 °C).

RESULTATS:

eritròcits rosa



neutròfils:

nucli blau marí

citoplasma rosa clar

granulacions vermellós



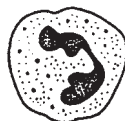
eosinòfils:

nucli blau marí

citoplasma blau cel

granulacions vermell

plaquetes violeta



basòfils:

nucli vermell

granulacions vermell fosc, quasi negre



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.

El 1994 es va introduir a Barcelona la marca americana Surgipath, que comercialitza un Papanicolau EA 50 de bona qualitat i d'un preu raonable.

2.3.2. *Preparació d'estructures animals de les quals, per a llur estudi, cal obtenir talls*

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

2.3.2.1. Tècnica per fer una inclusió en parafina

Després de la fixació de l'òrgan o del teixit que volem estudiar en 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:¹⁴

- a) de 6 a 12 hores en alcohol de 70°
- b) de 6 a 12 hores en alcohol de 90°
- c) de 6 a 12 hores en alcohol absolut
- d) de 4 a 6 hores en cloroform o xilè
- e) de 4 a 6 hores en cloroform i parafina o en xilè i parafina
- f) de 4 a 6 hores en 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 per 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 inclou-

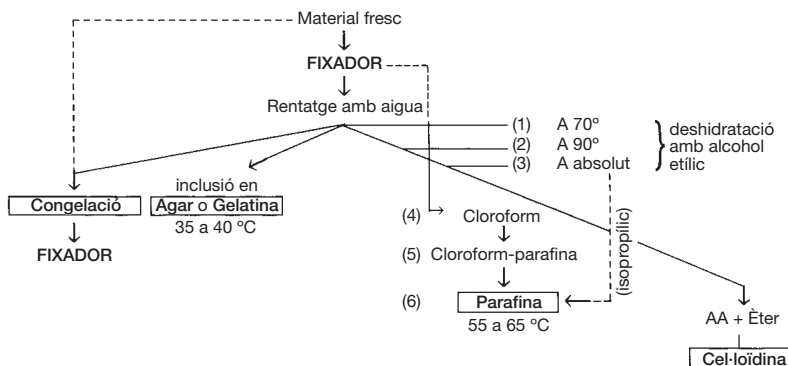
14. Si el material ha estat fixat en alcohol absolut, o bé en Carnoy, es pot anar directament al pas d). El temps de permanència en cada pas depèn de la grandària de la peça i de la textura del material.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

re'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, en lloc de l'etílic, podem saltar-nos els passos d) i e).



2.3.2.2. Passos de les diverses vies que se segueixen després de l'obtenció de talls d'òrgans i de teixits animals

Es fan els blocs de parafina amb l'ajut de les pinces de Leuckart, o bé en caps de cartolina, i al cap de poques hores (encara que és millor 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.

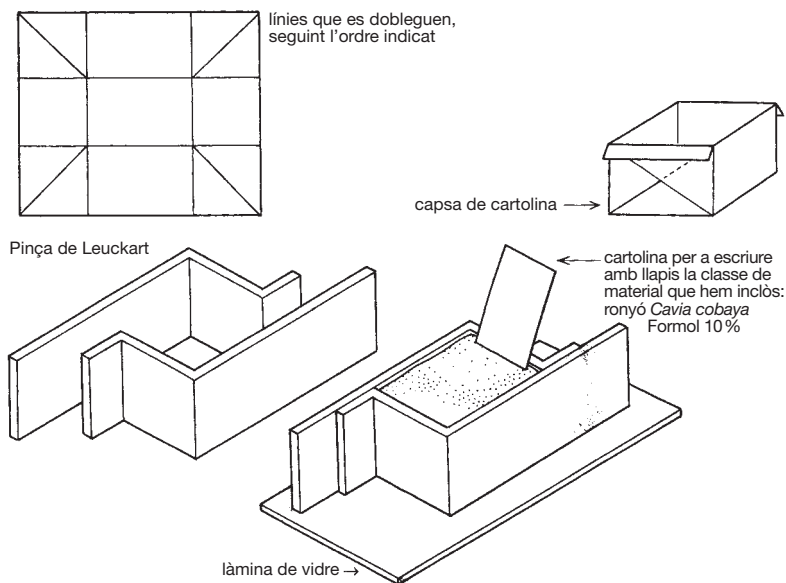
Els talls obtinguts tenen habitualment un gruix de 6 a 8 μ de mitjana.

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'albúmina 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.

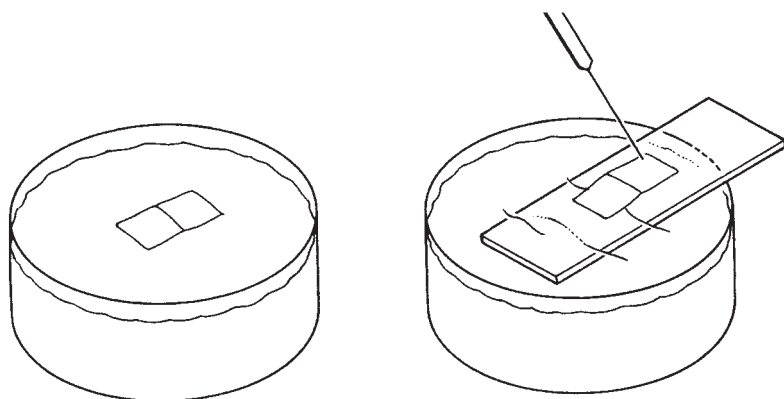
Una vegada damunt el portaobjectes, se centren i s'eixuguen

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals



per les vores i es posen a l'estufa a uns 35 °C, durant 2 o 3 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 no fer-los malbé. L'adhesió dels talls obtinguts per congelació es pot fer emprant portaobjectes gelatinitzats, que s'hauran aconseguit submergint-los 1 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 2 a 4 hores a 45 °C a l'estufa. Els talls recollits sobre portaobjectes preparats així es deixaran de 2 a 4 hores a l'estufa. Abans de tenyir-los, caldrà hidratar-los, per la qual cosa els deixarem 10 minuts en alcohol absolut, 10 minuts en alcohol de 90°, 10 minuts en alcohol de 70° i 10 minuts en aigua destil·lada.

Una vegada obtinguts els talls i enganxats mitjançant l'albúmina de Mayer o la gelatina, els tenyirem 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 minuts en xilè (desparafinat)
 - 15 minuts en alcohol absolut
 - 15 minuts en alcohol de 90°
 - 15 minuts en alcohol de 70°
 - 15 minuts en aigua destil·lada
- } (hidratació)

Treta la parafina i hidratat el tall, hom pot escollir la tècnica de 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 Heindenhain.

ADVERTIMENT: Si el material ha estat inclòs en cel·loïdina, cal tenir en compte que aquesta no es dissol en res, i per tant no caldrà deshidratar el material, després de la tinció, ja que els talls són normalment recollits amb aigua destil·lada, i també els talls obtinguts per congelació.

2.3.2.3. 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 en guanyen, com és el cas de la majoria de les hematoxilines.

— Doble tinció amb hematoxilina - eosina

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls seguint la seqüència esmentada en la pàgina anterior.
3. 5 minuts en hematoxilina (de Delafield, de Friedlander, etc.; colorant nuclear).
4. De 15 a 30 minuts en aigua de l'aixeta.
5. 2 minuts en aigua destil·lada.
6. 5 minuts en eosina aquosa a l'1 % (colorant citoplasmàtic).
7. 5 minuts en alcohol de 96°.
8. 5 minuts en alcohol absolut.
9. 10 minuts en xilè.
10. Ho muntarem amb una gota de DPX o equivalent.

RESULTATS: nuclis blau marí
 citoplasma rosat
 fibres musculars rosa
 fibres conjuntives blau

— Hematoxilina - picrofucsina (triple tinció de Van Gieson)

1. Desparafinarem amb xilè de 15 a 30 minuts.
2. Hidratarem els talls.
3. 2 minuts en hematoxilina de Groat.
4. Els rentarem 15 minuts amb aigua de l'aixeta, en farem dos o tres canvis.
5. 5 minuts en picrofucsina, que, a més de tenyir, diferencia.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

6. 5 minuts en alcohol absolut (dos canvis).
7. 10 minuts en xilè.
8. Ho muntarem amb una gota de DPX o equivalent.

RESULTATS: nuclis negre
citoplasma rosat
fibres elàstiques vermell
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 en 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 en fucsina àcida a l'1 %.
6. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
7. 60 segons en àcid fosfomolibdic a l'1 % (actua de mordent).
8. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
9. 75 segons en líquid de Mallory.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
11. Ho diferenciarem amb blau d'anilina alcohòlica SA (uns 10 segons).
12. 10 segons en alcohol absolut.
13. 10 minuts en xilè.
14. Ho muntarem amb una gota de DPX o equivalent.

RESULTATS: nuclis i cromosomes vermell
granulacions
citoplasmàtiques taronja vermellós
fibres col·làgenes blau
fibres musculars vermellós
eritròcits taronja
fibres nervioses lila
vitel groc
quitina vermell

— Mètode de l'Azan, segons Heindenchain

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

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

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 en alcohol acètic, per tal de frenar el procés de la diferenciació.
7. D'1 a 3 hores en 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 i àcid acètic.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada.
11. Ho diferenciarem amb alcohol de 96° uns 2 o 3 segons.
12. 5-10 minuts en alcohol absolut.
13. 10 minuts en xilè.
14. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

RESULTATS: nuclis i cromosomes vermell
granulacions
citoplasmàtiques vermell, groc i blau
fibres musculars de vermell a taronja
fibres col·làgenes blau
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 Heindenhain

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. De 12 a 24 hores en 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 en hematoxilina de Heindenhain (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.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

7. Ho rentarem durant 30 minuts amb aigua de l'aixeta.
8. Ho rentarem 5 minuts amb aigua destil·lada.
9. 5 minuts en alcohol de 70°.
10. 5 minuts en alcohol de 90°.
11. 5 minuts en alcohol absolut.
12. 15 minuts en essència (aquest pas pot suprimir-se).
13. 2 minuts en xilè.
14. Ho muntarem amb una gota de DPX.

ADVERTIMENT: Aquesta tinció és molt interessant, car dóna 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 gònades 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 d'hematoxilina de Groat i de picrofucsina, dóna 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 periòdic de Schiff)

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. 10 minuts en àcid periòdic (que provoca una oxidació dels components hidrocarbonats del talls).
4. Ho rentarem durant 10 minuts amb aigua de l'aixeta.
5. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
6. 10 minuts en 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 toluïdina al 0,5 % durant 2 minuts, 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.

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

11. 2 minuts en xilè.
12. Ho muntarem amb bàlsam o amb DPX.

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 una tècnica de tinció facultativa de contrast o l'altra.

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'1 minut cadascun.
7. Ho rentarem llargament (uns 15 minuts) amb aigua corrent.
8. Ho deshidratarem.
9. 15 minuts en essència.
10. 2 minuts en 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 minuts 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 minuts en essència.

6. 2 minuts en 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:

a) 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 1'1,5 %, al qual afegirem un 20 % d'alcohol.
2. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
3. El deixarem 24 hores en un reductor de la plata, que pot ésser el format per:
2 g d'àcid pirogàl·lic o d'hidroquinona
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.

b) 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 1'1,5 %, de 5 a 7 dies.
3. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
4. El deixarem 24 hores en el reductor anteriorment esmentat.
5. Ho rentarem amb aigua destil·lada.

Els passos següents són iguals que els de la primera variant.

c) Tercera variant

1. Fixarem el material nerviós amb una barreja formada per:
50 cc d'alcohol absolut
de 5 a 10 gotes d'amoníac concentrat durant unes 24 hores

Els passos següents, és a dir, del 2 al 10, són idèntics als esmentats en la primera variant.

2.3.2.4. Preparació dels reactius

a) 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

• Per a invertebrats

Clorur sòdic	0,600 g
--------------------	---------

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- Aigua destil·lada 100.000 cc
- Per a amfibis
 - Clorur sòdic 0,750 g
 - Aigua destil·lada 100.000 cc
- 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.

b) 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, i una inclusió prèvia.

- Carnoy (recomanat per a estudis de nuclis i cromosomes)
 - Alcohol absolut 60 cc
 - 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 la parafina, per fer la inclusió.

És 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.

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

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 en formol, el material s'endureix massa, per la qual cosa cal iniciar ràpidament el procés de la deshidratació, o bé posar el material en un formol més diluït, al 4 %, o bé en 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 mitocondris, 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 que estudiem al microscopi electrònic.

— Zenker (recomanat per quan cal aplicar tincions de tipus Mallory o Azan, atès el seu caràcter de mordent)

Bicromat potàssic 2,5 g

Biclorur de mercuri 5 g

Sulfat sòdic 1 g

Aigua destil·lada 100 cc

Hi ha diversos fixadors que, a la vegada, són potents descalcificadors perquè es preparen combinats amb segrestadors de sals, tipus Edta. Entre d'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.

c) Colorants

— Azocarmí (utilitzat en la tècnica de l'Azan)

Azocarmí G 0,1 g

Aigua destil·lada 100 cc

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

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 SA 0,59

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 encebades 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.

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

— Hematoxilina (colorant típicament nuclear)

Hi ha moltes modalitats i maneres 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 (alum amoniacal) 40 g

aigua destil·lada 400 cc

Barrejarem la solució A amb la B. Al cap de 4 o 5 dies la filtrarem i hi afegirem:

glicerina 100 cc

alcohol metílic 100 cc

Passats 4 o 5 dies la filtrarem i ja es podrà fer servir.

Conservació il·limitada.

Abans de fer-la servir, la diluïrem 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 tapar 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 Heidenhain (hematoxilina fèrrica)

Solució mare:

hematoxilina 1 g

alcohol absolut 10 cc

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

aigua destil·lada 90 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant 1 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 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 1 o 2 hores, ho filtrarem i ja es podrà fer servir.

Conservació limitada a uns 3 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 amb:

hematoxilina 1 g

alcohol de 96° 10 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant uns 3 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 SA 0,5 g

Orange G 2 g

Àcid oxàlic 2 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

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

— Picrofucsina, segons Van Gieson

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

Àcid pícric 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 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. Es pot anar comprovant com es conserva 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 decigramms 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

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

Fenol	0,50 g
Alcohol de 96°	2,50 cc
Glicerina	20 cc
Aigua destil·lada	85 cc

Es conserva uns 3 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).

2.3.2.5. Medis de muntatge més emprats per fer preparacions permanents

<i>Hidrosolubles</i>	<i>No hidrosolubles</i>	<i>Muntatge amb</i>
Aquatex	Bàlsam del Canadà	Goma aràbiga - bàlsam
Berlesse	Reina Dammar ¹⁶	
Glicerina	DPX	
Goma aràbiga	Euparal	
Hoyer	Micromount	
etc. ¹⁵		

Recordem que, en casos especials, és interessant muntar el material d'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 que volem observar, per obtenir-ne el contrast més gran possible en fer-ne l'observació microscòpica.

— Berlesse

Hidrat de cloral	16 g
Goma aràbiga ¹⁷	15 g

15. Per a la preparació de diversos medis de muntatge hidrosolubles, consulteu el capítol 3 de «Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats: aplicacions».

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

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

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; 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°.

A vegades els portaobjectes nous surten de la caixa molt bruts; en aquests casos, cal rentar-los amb detergent i, posteriorment, esbandir-los bé amb aigua i passar-los 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

2.4. BIBLIOGRAFIA

2.4.1. *Bibliografia general*

BRIEN, P. (1958). *Travaux pratiques de zoologie*. París: Masson.

DURFORT, M. (1994). *Consideracions entorn de l'ensenyament de la biologia cel·lular a les portes del segle XXI*. ICE. Universitat de Barcelona. (Ciències Naturals)

JAMES, L. (1904). *Zoologie pratique basée sur la dissection des animaux les plus répandus*. París: Masson. [Exhaurit]

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- 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*. Barcelona: Urania. (Guías Urania)
- TIXIER, A.; GALLARD, J. M. (1969). *Anatomie animale et dissection*. París: Vigot Frères.
- VILLENEUVE, F.; DÉSIRÉ, Ch. (1976). *Zoología*. Barcelona: Montaner y Simón.

2.4.2. Tècniques

- CARAYON, J. (1969). «Emploie du noir chlorazol en anatomie microscopique des insectes». *Annales de la Société Entomologique de France*. Vol. 5. París, p. 179-193.
- GURR, E. (1962). *Staining animal tissue*. Londres: L. Hill.
- LOCQUIN, M.; LANGERON, M. (1985). *Manual de microscopia*. Barcelona: Labor.
- MARTOJA, R. (1970). *Técnicas de histología animal*. Barcelona: Toray-Masson.
- NACHTIGALL, W. (1997). *Microscopia*. Barcelona: Omega.
- NEZELOF, C.; GALLE, P.; HINGLAIS, N. (1975). *Técnicas microscópicas*. Barcelona: Jims.
- RAMÓN Y CAJAL, S. *Manual de histología normal y de técnica micrográfica*. Madrid: Libr. Nicolás Moya. [Diverses edicions, exhaurit]
- ROMEIS, B. (1928). *Técnica histológica*. Barcelona: Labor. [Exhaurit]
- SEGUY, E. (1951 i 1949). *Le microscope, emploi et applications*. Vol. I i II. París: Paul Lechevallier.

2.4.3. Interpretació

- BOYA, J. (2004). *Atlas de histología y organografía microscópica*. 2a ed. Madrid: Panamericana.
- DI FIORE, M. S. H.; MANCINI, R. E.; DE ROBERTIS, E. D. R. (1971). *Nuevo atlas de histología, microscopía óptica, histoquímica y microscopía electrónica*. Buenos Aires: El Ateneo.
- FREEMAN, J. A.; BRACEGIRDLE, B. (1971). *An Atlas of Invertebrate Structure*. Londres: Heineman Education Books.
- (1975). *Atlas de histología animal*. Madrid: Paraninfo.

Tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (2005). *Histología básica: Texto y atlas*. Barcelona: Masson.
- KÜHNEL, W. (1986). *Atlas de citología y anatomía microscópica*. Barcelona: Omega.
- MARTIN-LACAVE, I.; SAN MARTÍN, M. V. (2000). *Atlas práctico de histología*. Madrid: Díaz de Santos.
- ROSS, M. H.; KAYE, G. I.; PAWLINA, W. (2004). *Histología*. 4a ed. Madrid: Panamericana.
- YOUNG, B.; HEATH, J. W. (2002). *Histología funcional*. 4a ed. Madrid: Atlas Harcourt Churchill Livingstone.

2.5. VÍDEOS / DVD

- DURFORT, M. (1989). *La fixació*. ICE. Universitat de Barcelona.
- (1989). *La microtomia*. ICE. Universitat de Barcelona.
- (1989). *La tinció*. ICE. Universitat de Barcelona.
- (1990). *Introducció a l'estudi dels teixits animals*. ICE. Universitat de Barcelona.
- (1993). *Mirar, veure i interpretar*. ICE. Universitat de Barcelona.

2.6. PRINCIPALS MARQUES DE REACTIUS PER A MICROSCÒPIA

Chroma

Doesder

Fluka

Gürr¹⁸

Merck

Panreac (és la més econòmica, ja que es fabrica aquí)

Sigma

Surgipath

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

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

3. TÈCNIQUES DE TRANSPARENTAT D'INVERTEBRATS I D'ESQUELETS DE VERTEBRATS: APLICACIONS

3.1. 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 d'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.

3.2. 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,

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

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 *in vivo*, cal vigilar la font d'il·luminació del microscopi, obrint-ne i tancant-ne el diafragma, per aconseguir una bona contrastació, mitjançant la qual podrem 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, els més utilitzats dels quals són el blau de metilè, el blau de cresil (colorants nuclears), el verd Janus (colorant dels mitocondris), o bé el roig neutre (colorant dels vacúols). Tots aquests colorants han d'aplicar-se en concentracions molt baixes, d'aproximadament 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.

3.2.1. Anestèsics recomanats

El temps d'actuació és variable: depèn del tipus d'animal, de la concentració de l'agent anestèsic 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 %, d'1 a 24 hores.
- Sulfat de magnesi del 150 % al 200 %, 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°.

Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats

Aquest mètode és especialment recomanat per a l'anestèsia de cucs marins, tant els que viuen en tubs com els que són lliures.

- Aigua de mar més unes gotes de formol, fins a arribar a una concentració a l'entorn del 4 %.
- Introducció de CO₂ 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 °C a 15 °C).

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 anestèsic interessant que cal tenir en compte, principalment per a animals molt musculars, com cucs, sangoneres, equiuroides, etc. El temps d'estada a la nevera, a 4 °C, depèn de la grandària de l'exemplar.

3.2.2. *Fixadors més freqüents*

- 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.
- Alcool de 70°.
- Bouin (àcid pícric, formol i àcid acètic en una proporció de 75:20:5).

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- 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.

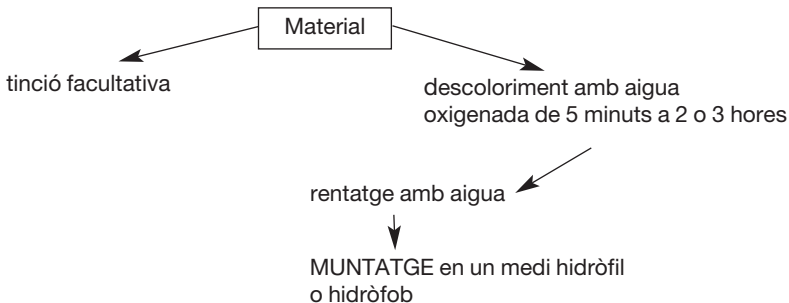
3.2.3. *Aclaridors més emprats per transparentar els teguments*

- Àcid acètic 30-50 %.
- Àcid làctic 50-100 %.
- Hidrat de clorat 10-30 %.
- Hidròxid sòdic 15-20 %.
- Hidròxid potàssic 10-15 %.
- Aigua de Javelle (50 cc d'aigua + 10 g de pólvores de gas, durant 24 hores + 7,5 g 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 els casos 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.

Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats



3.2.4. *Colorants*

- Carmí bòric: procés ràpid (10 minuts); tenyit lent (6-24 hores).
- Eosina a l'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 hores o més.
- 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.

3.2.5. *Muntatge*

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 g
Goma aràbiga	15 g
Glucosa	10 g
Aigua destil·lada	20 cc
Àcid acètic	5 g

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

— Clorolactofenol d'Amman

Hidrat de cloral	20 g
Àcid fènic	10 g
Àcid làctic	10 g
Salicilat sòdic	5 g

— Gelatina glicerina

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

Aquest medi és molt interessant també per a 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 g
Àcid làctic	10 g
Glicerina	20 g
Aigua	10 cc

— Líquid de Farrant

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

— Líquid de Hoyer

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

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

— Xarop d'Apathy

Goma aràbiga	10 g
Sacarosa	10 g
Aigua	10 cc

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

Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats

Especifiquem la composició d'aquests medis de muntatge, ja que és difícil de trobar-la completa en els 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 hematòfags, cal fer-los dejunar durant 4 o 5 setmanes.

3.3. VERTEBRATS

El transparentat de vertebrats pot respondre a finalitats sistèmiques, a necessitats de treballs embriològics, o bé a l'obtenció d'unes determinades proves de toxicitat teratògena, 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 nounats.

3.3.1. *Transparentat i tenyit de cartílag i d'os*

1. Fixació en 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 en glicerina o bé en alcohol de 96°.

3.3.2. *Transparentat i tenyit d'os*

1. Fixació en 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 en alcohol de 95°, durant unes 2 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 %, de 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.

3.3.3. *Preparació dels reactius*

- Alcohol acètic
Alcohol 70° 100 cc
Àcid acètic 1 cc
- Alcohol clorhídric
Alcohol 70° 100 cc
HCl 25 cc

Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats

- Blau de toluidina o blau de metilè (específic per al cartílag)
 - Colorant 0,25 g
 - Alcohol de 70° 100 cc
 - HCl 0,5 % 2 cc
- Roig d'alitzarina (específic de l'os)
 - Colorant 0,1 g
 - KOH 1 % 100 cc
- Solució enzimàtica
 - Tripsina 0,45 g
 - Tampó bòrax 400 ccAjusteu 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 mg
 - 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 g
 - solució aquosa saturada de bòrax 30 cc
 - aigua destil·lada 70 ccCada 2 o 3 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 una sèrie de glicerina KOH al 0,5 %, en

graduació ascendent, és a dir: tres parts de KOH 0,5 % i una part de glicerina; dues parts de KOH al 0,5 % i dues parts de glicerina, i una part de KOH al 0,5 % i tres parts de glicerina.

A la primera de les solucions cal afegir dues o tres gotes de H_2O_2 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.

— Solució de Mall

Aigua destil·lada	80 cc
Glicerina	20 cc
KOH	1 g

— Solució tampó

Solució saturada de bòrax	30 cc
Aigua destil·lada	70 cc

3.3.4. *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 tamponada.¹⁹

19. 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 a 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, d'esquelets en general. Una de les tècniques més efectives és l'adaptació de Searle (1954) a la tècnica de

Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats

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 en 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 % en 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 en:
glicerina 40 g
KOH a l'1 % 60 cc
durant 1 setmana
glicerina 70 g
KOH a l'1 % 30 cc
durant 2 setmanes

Conservació definitiva en glicerina pura, o bé en el líquid de Mall.

3.4. 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, p. 229-232.

Hearle (1949). Un cop treia 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.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

- 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 microscopia*. Barcelona: Labor.
- LUTHER, P. G. (1949). «Enzymatic maceration of skeletons». *Proc. Linn. Soc. London*, vol. 161, p. 146.
- SEARLE, A. G. (1954). «Genetical studies on the skeleton of the mouse. IX. Causes of skeletal variation within pure lines». *J. Genet.*, vol. 52, p. 68-102.
- 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.*, vol. 122, núm. 3596.
- WALLIS, T. E. (1968). *Microscopía analítica*. Saragossa.

ÍNDEX

PRESENTACIÓ	5
1. TÈCNIQUES SENZILLES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS	9
1.1. Introducció	9
1.2. Estructures vegetals de les quals, per a llur estudi, no cal obtenir talls	9
1.2.1. Obtenció i preparació permanent de diversos tipus de material	11
1.3. Estudi de talls vegetals	13
1.3.1. Tincions recomanades	15
1.3.2. Preparació de reactius	21
1.3.3. Medis de muntatge més emprats per fer preparacions permanents	26
1.3.4. On recórrer per trobar estructures i teixits vegetals	27
1.4. Bibliografia	32
1.5. Vídeos	33
1.6. Principals marques de reactius per a microscòpia	33
1.7. Essències	33
2. TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS D'ESTRUCTURES I DE TEIXITS ANIMALS	35
2.1. Introducció	35
2.2. Preparacions temporals	36
2.3. Preparacions permanents	40

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

2.3.1. Preparació d'estructures animals de les quals, per a llur estudi, no cal obtenir talls	41
2.3.2. Preparació d'estructures animals de les quals, per a llur estudi, cal obtenir talls	49
2.4. Bibliografia	67
2.4.1. Bibliografia general	67
2.4.2. Tècniques	68
2.4.3. Interpretació	68
2.5. Vídeos / DVD	69
2.6. Principals marques de reactius per a microscòpia	69
3. TÈCNiques DE TRANSPARENTAT D'INVERTEBRATS	
I D'ESQUELETS DE VERTEBRATS: APLICACIONS	71
3.1. Introducció	71
3.2. Invertebrats	71
3.2.1. Anestèsics recomanats	72
3.2.2. Fixadors més freqüents	73
3.2.3. Aclaridors més emprats per transparentar els teguments	74
3.2.4. Colorants	75
3.2.5. Muntatge	75
3.3. Vertebrats	77
3.3.1. Transparentat i tenyit de cartílag i d'os	77
3.3.2. Transparentat i tenyit d'os	78
3.3.3. Preparació dels reactius	78
3.3.4. Mètodes enzimàtics	80
3.4. Bibliografia	81

TEIXITS I ÒRGANS VEGETALS

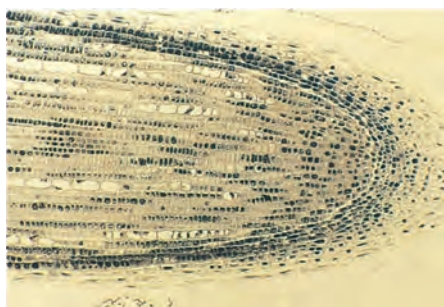


FIGURA 1. Meristema radical. (Hematoxilina fèrrica)

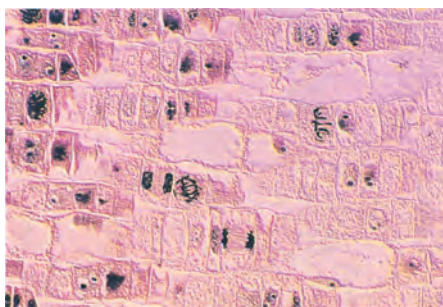


FIGURA 2. Fases de la mitosi. Contrast interferencial.

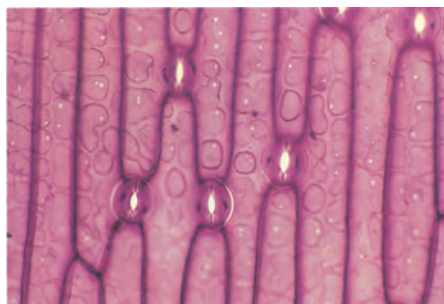


FIGURA 3. Epidermis de lliri amb estomes. (Hematoxilina - eosina)



FIGURA 4. Tricomes de magnòlia. Contrast interferencial.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

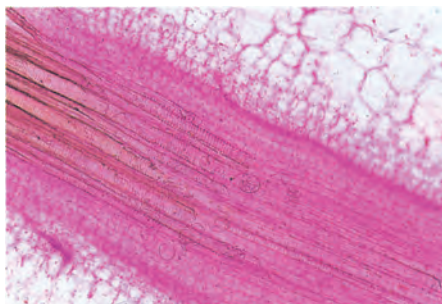


FIGURA 5. Tall longitudinal de vasos.
(Picrofucsina)

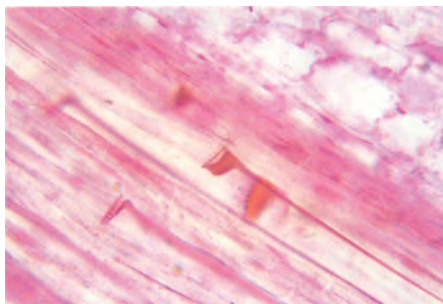


FIGURA 6. Detall de vasos cribrosos.
(Picrofucsina)

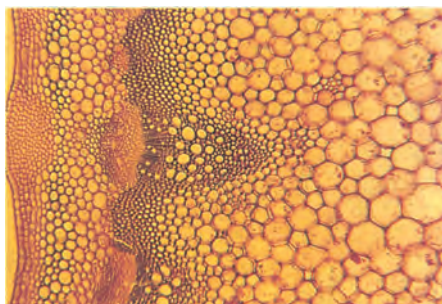


FIGURA 7. Feixos de vasos colaterals tallats transversalment de tija de dicotiledònia.
(Picrofucsina)



FIGURA 8. Tall transversal de fula de pi.
Vegeu els conductes resinífers. (Picrofucsina)

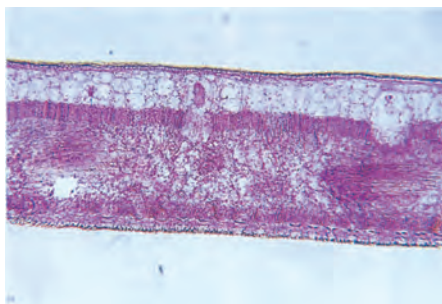


FIGURA 9. Tall transversal de fula de *Ficus elastica*. Vegeu l'idioblast amb el cristòlit.
(Picrofucsina)



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

Teixits i òrgans vegetals

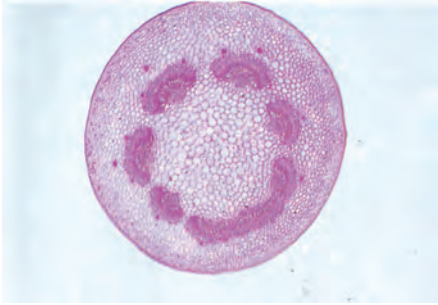


FIGURA 11. Tall transversal de pecíol d'heura. (Picrofucsina)

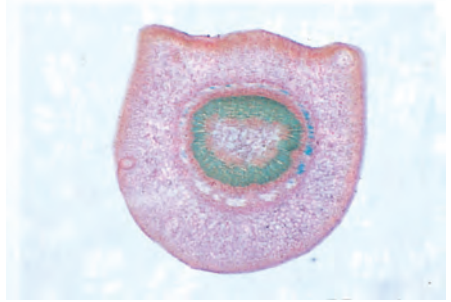


FIGURA 12. Tall transversal de pecíol de llimoner. (Blau de metilè - picrofucsina)

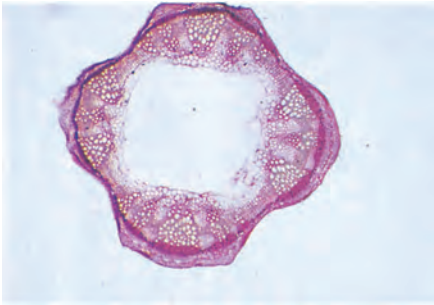


FIGURA 13. Tall transversal de tija d'ortiga. (Picrofucsina)

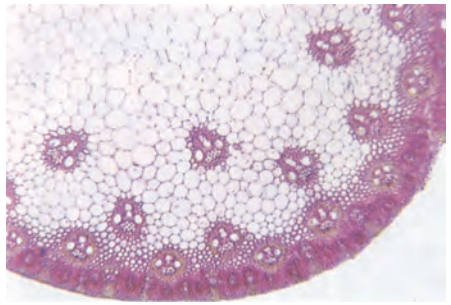


FIGURA 14. Tall transversal de tija de monocotiledònia. Vegeu vasos colaterals tancats. (Picrofucsina)

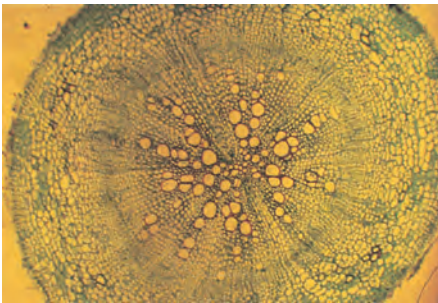


FIGURA 15. Tall transversal d'arrel de dicotiledònia. (Tionina - hematoxilina)

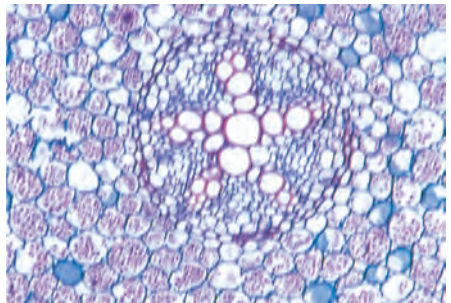


FIGURA 16. Tall transversal d'arrel pentarca de monocotiledònia. (Fluoroglucina àcida)

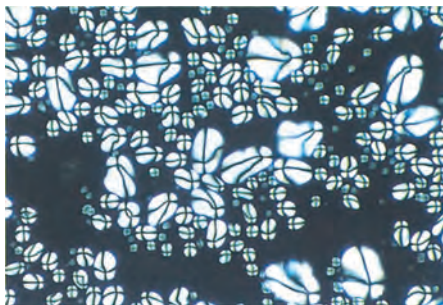


FIGURA 17. Midó de patata observat amb llum polaritzada

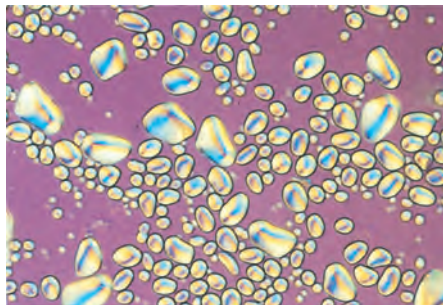


FIGURA 18. Midó de patata observat amb contrast de fase interferencial

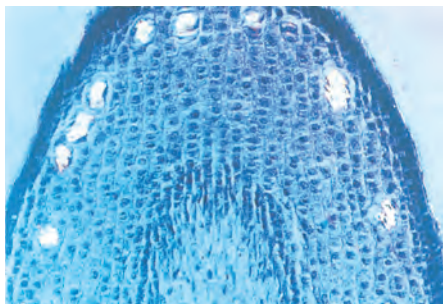


FIGURA 19. Rafidis d'inulina (Polisacàrid de la fructosa)

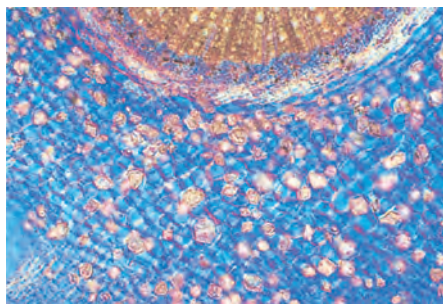


FIGURA 20. Cristalls d'àcid cítric de llimoner observats amb contrast de fase interferencial

TEIXITS I ÒRGANS ANIMALS

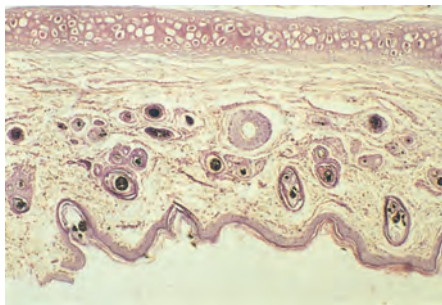


FIGURA 1. Tall d'orella: epidermis, derma amb fol·licles pilosos i cartílag.
(Hematoxilina - eosina)

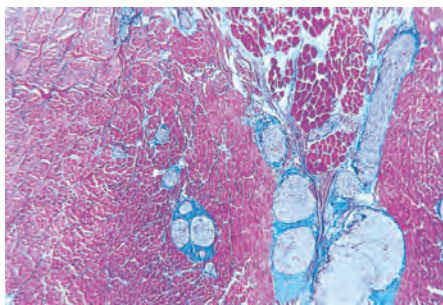


FIGURA 2. Teixit muscular i nervis. (Mallory)

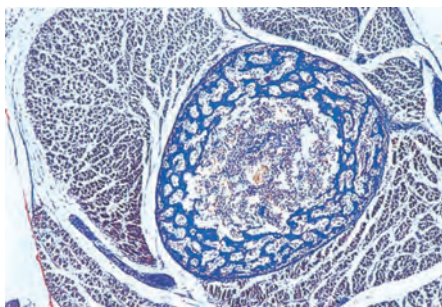


FIGURA 3. Tall transversal d'una vèrtebra: feixos musculars, os i medul·la òssia. (Blau de metilè)

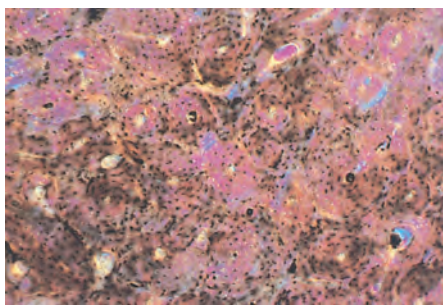


FIGURA 4. Tall d'os compacte observat amb contrast interferencial.

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals



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

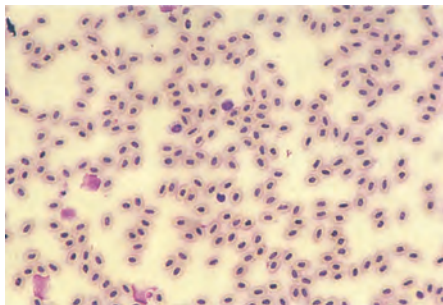


FIGURA 6. Extensió de sang de peix. (Diff-Quick)

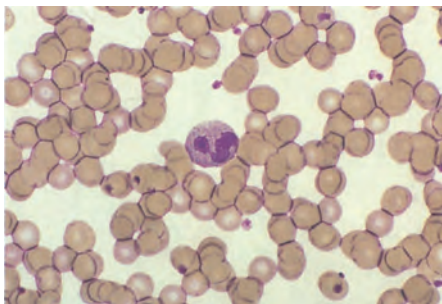


FIGURA 7. Extensió de sang humana: eritròcits i un granulòcit neutròfil. (Diff-Quick)

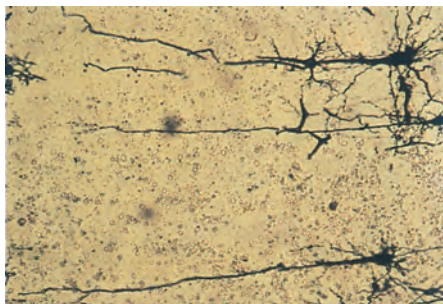


FIGURA 8. Neurones piramidals d'escorça cerebral. (Cox)

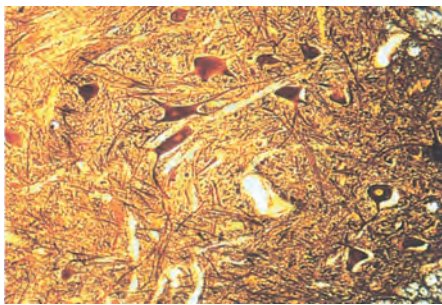


FIGURA 9. Neurones multipolars de medulla espinal. (Nitrat de plata de Cajal)

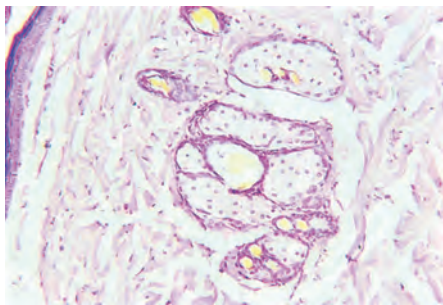


FIGURA 10. Glàndules sebàcies i fol·licles pilosos. (Hematoxilina - eosina)

Teixits i òrgans animals

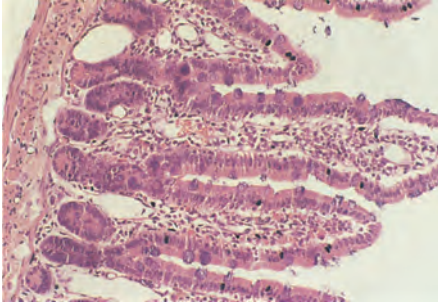


FIGURA 11. Tall transversal d'intestí. Vegeu les vellositats. (Hematoxilina - eosina)

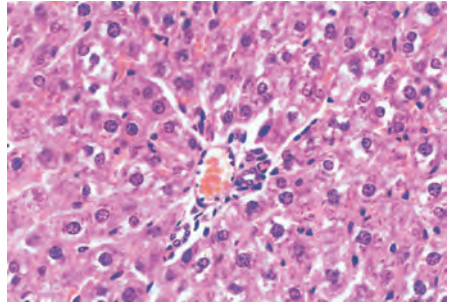


FIGURA 12. Trabècules hepàtiques. (Hematoxilina - eosina)

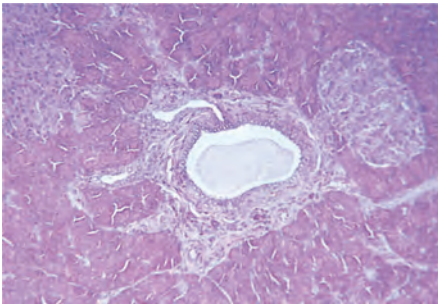


FIGURA 13. Detall d'un lobulel pancreàtic, destaca l'illot de Langerhans i el tall transversal d'una artèria. (Hematoxilina - eosina)

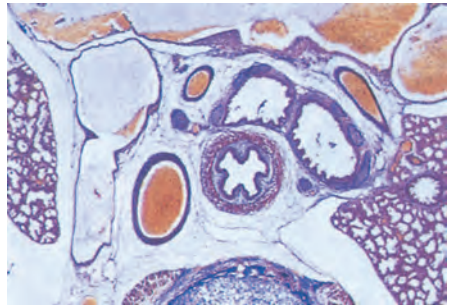


FIGURA 14. Panoràmica d'un tall d'embrió: intestí, artèries, venes i part de pulmó. (Mallory)

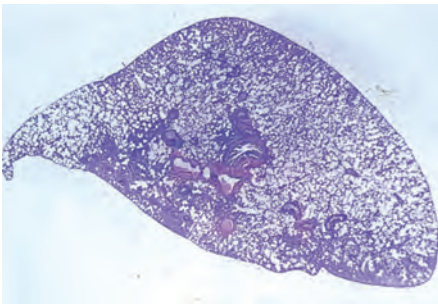


FIGURA 15. Pulmó. (Hematoxilina - eosina)

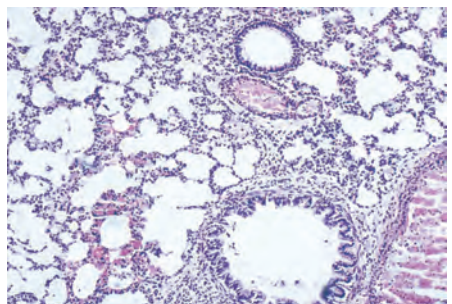


FIGURA 16. Detall d'un bronquíol, una artèria, una vena i dels alvèols pulmonars. (Hematoxilina - eosina)

Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

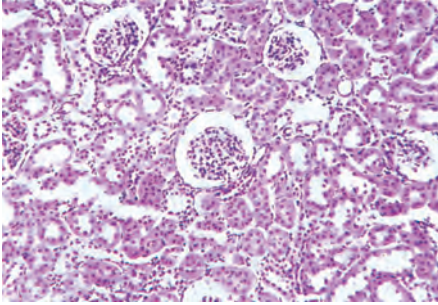


FIGURA 17. Ronyó: zona cortical amb glomèruls de Malpighi. (Hematoxilina - eosina)

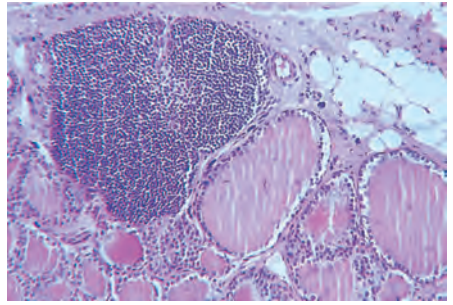


FIGURA 18. Glàndula tiroïdal amb un fol·licle limfàtic. (Hematoxilina - eosina)

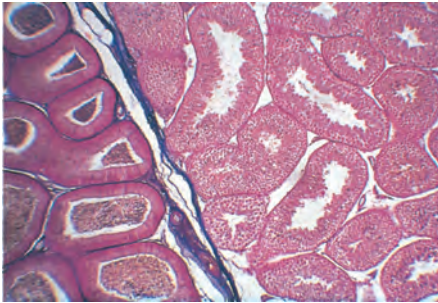


FIGURA 19. Testicle (túbuls seminífers) i epidídim. (Mallory)

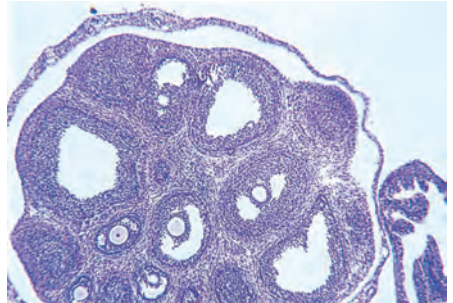


FIGURA 20. Ovari: zona cortical amb fol·licles. (Hematoxilina - eosina)



IECentanyes 19072007

ISBN: 84-7283-883-8



9 788472 838833