

SEMINARIS D'ESTUDIS UNIVERSITARIS

3

TÈCNIQUES SENZILLES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS

Mercè Durfort i Coll,
professora del Departament de
Morfologia i Microscopia de la
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona

Circular per als membres de la

INSTITUCIÓ CATALANA D'HISTÒRIA NATURAL

Producció: KETRES
Dipòsit Legal: B.44149/78
Imprimeix: MULTITEXT Copisteria
Diputació 113-115. Barcelona-15

TÈCNiques SENZILLES D'OBTENCIÓ DE PREPARACIONS VEGETALS

Mercè Durfort i Coll, professora del departament de Morfologia i Microscopia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

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

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

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

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

També és interessant l'observació en viu d'alguns òrgànuls 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*, de Höyer, d'albúmina glicerinada, etc.

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

2. 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 Pujiula).
3. Deshidratem el material, és a dir, ho deixem:
 - . de 5 a 10' en alcohol de 70°
 - . de 5 a 10' en alcohol de 90°
 - . de 5 a 10' en alcohol absolut
 - . de 10 a 15' en essència (eucaliptus, creosota, etc.)
 - . 5' en xilol (o toluol quan el muntatge és amb rhenohistol)
 - . muntatge en una gota de bàlsam del Canadà, o en rhenohistol, euparal, D.P.X. o en qualsevol altre medi adient*.

OBTENCIÓ I PREPARACIÓ PERMANENT DE DIVERSOS TIPUS DE MATERIAL

- Diatomees

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

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

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

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

- Esporangis de falguera

Raspem delicadament els 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.

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

- Hifes i esporangis de fong

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

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

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

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

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

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

- Espores de bolet

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

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

- Pollen

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 rentat 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 pollen 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.

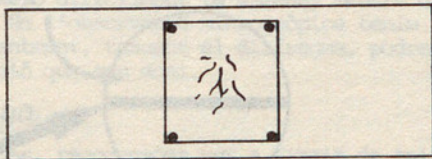
Recomanem: Fer observacions de pollen de pi (per les vesícules aeríferes o flotadors que té), així com el de la carabassa, per la morfologia de l'exina i perquè és fàcil l'observació dels porus germinatius operculats.

- Tricomes

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

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

Advertiment: El muntatge amb aire consisteix a posar directament el portaobjectes sobre el material. Perquè s'aguanti, cal posar quatre 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.

Es particularment interessant l'estudi dels estomes d'epidermis foliars.

Arranquem amb compte l'epidermis de fulles; les monocotiledònies, pel d'ésser paral·lelinèrvies, ho permeten bé.

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

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

Ho rentem durant 5' en aigua destil·lada.

5' en eosina.

Deshidratació i muntatge.

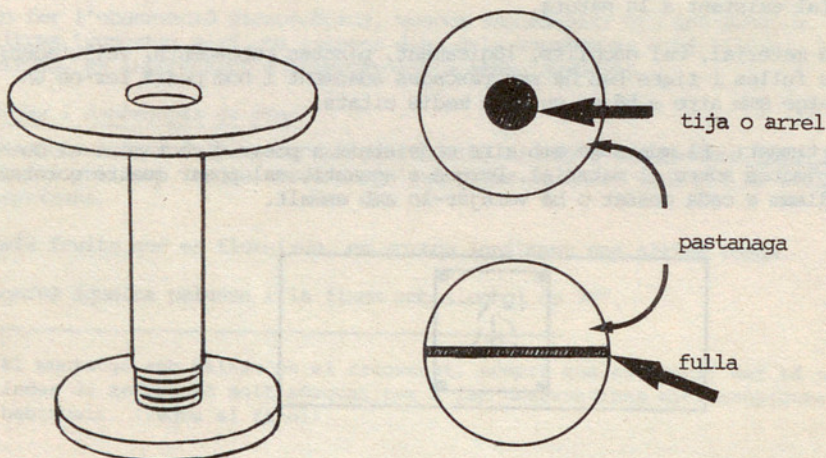
Advertiment: La pell arrencada i muntada directament sobre una gota d'aigua es veu, observada amb poca llum, força bé.

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

II. ESTUDI DE TALLS VEGETALS

Per a l'estudi histològic de fulles, tiges i arrels, cal obtenir talls que siguin com més fins millor. L'obtenció d'aquests talls es fa per la tècnica de la mà alçada o bé mitjançant un micròtom de mà.

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



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

Els talls es deixen en aigua, i, posteriorment se seleccionaran els més fins per a tenyir-los.

El material a tallar pot haver estat prèviament fixat en alcohol de 90° o en formol al 6%.

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

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

Seguidament hom escull la tècnica de tinció.

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

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

Amb meristems radicals o caulinars, brots, així com fulles, és a dir, òrgans "tendres" podem fer una inclusió en parafina, amb la qual s'obtenen talls de l'ordre de 2 microns.

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

TINCIONS RECOMANADES

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

Els temps que indiquem per a cada tècnica són els temps mínims en l'operació de la deshidratació i el temps convenient en la tinció; ara, aquest temps òptim, cal tenir-lo en compte en aquelles tincions de tipus progressiu, és a dir, en aquelles en què no es pot tornar enrera, 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, podem millorar considerablement la informació que ens doni.

- Tincions temporals

- a) Panoràmiques, recomanades per a tinció de talls de fulles, tiges i arrels.

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

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

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

b) Específiques

Midó: tinció sobre talls de patata o bé de raspats

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

Rentat 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 veu molt bé l'"hilio", així com 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'arrels de ceba o d'unes altres plantes es posen en un vidre de rellotge amb orceïna acètica.

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

Enretirem el vidre i ho deixem refredar una mica.

Repetim dues vegades més la mateixa operació.

Muntem els meristemes tenyits així amb una gota d'orceïna "nova" (no escalfada). Hi posem els cobreobjectes i tot seguit procedim a l'esclafament ("squasch").

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" (és a dir, l'orceïna acètica sense àcid clorhídric).

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

- Tincions i preparacions permanents

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

- *Fabil* . 10 a 20' en líquid de Fabil
- . Rentat amb aigua destil·lada
- . Muntatge en una gota de glicerina
- . Cimentem el cobreobjectes amb laca

Resultats: cel·lulosa blau
 lignina vermell
 nuclis i cloroplasts . vermell
 midó blau

Advertiment: A la llarga, la preparació perd color.

- Mètode de VAN GIESON o tinció amb picrofucsina

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

Resultats: cel·lulosa vermell
 lignina groc
 nucli i cloroplasts. vermells

- Hematoxilina - Picrofucsina

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

Resultats: cel·lulosa blau
 lignina groc
 nuclis blau
 cloroplasts vermells

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

- . 5' en blau de metilè a l'1%
- . diversos rentats amb aigua destil·lada, fins que no deixi color
- . 10' en picrofucsina
- . rentat amb alcohol de 90 o 96° fins que 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 verd
 nucli i cloroplasts vermells

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

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

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

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

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

Resultats: quitina negra intens

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

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

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

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



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

Resultats: cel·lulosa vermell
lignina blau verd

* A vegades hom fa una sobretinció; després es "diferencia", és a dir, es destenyit de mica en mica -en aquest cas amb Cl H- fins que tot queda destenyit, menys les regions lignificades, a les quals, pel fet de tenir molta afinitat per la tionina, costa més de perdre el color. Quan només es veuen unes àrees verdoses, uns punts foscos, cal frenar la diferenciació i rentarho amb aigua abundant. En alguns casos, la diferenciació se segueix al microscopi, com és el cas de la tinció de cromosomes per la tècnica de l'hematoxilina fèrrica de HEIDENHEIN.

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

- *Safranina - Blau de metilè*

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

Resultats: cel·lulosa blau
 lignina vermell fort

b) Molt específiques

- *Hematoxilina fèrrica de HEIDENHAIN*

Malgrat que no és un mètode ràpid, el descriurem pels seus òptims resultats.

Els meristems, siguin d'arrel o de brots caulinaris o foliars, són fixats en alcohol de 90° o absolut (l'alcohol és un bon fixador dels nuclis i dels cromosomes), o bé amb CARNOY (cloroform, alcohol absolut i àcid acètic, en la proporció de 3:6:1). El temps de fixació és de 12 a 24 hores.

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

- . 30' en xilol
- . 10' en alcohol absolut
- . 10' en alcohol de 90°
- . 10' en alcohol de 70°
- . 10' en aigua destil·lada

(fins ací és la tècnica habitual)

- . de 12 a 24 hores en sulfat fèrric amònic al 5% (alum de ferro) (fa de mordent)
- . rentat 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' rentat amb aigua corrent
- . 5' rentat amb aigua destil·lada
- . deshidratació habitual, essència, xilol 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.

- *Hematoxilina de Groat - Picrofucsina*

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

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

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

- *Hematoxilina de Weigert*

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

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

PREPARACIÓ DELS COLORANTS ESMENTATS

- Blau cotó (colorant general, recomanat per a tenyir hifes de bolets).

Blau cotó . . . 0,5 gr.
Lactofenol d'Amann. . 100 cc.

- el Lactofenol d'Amann es prepara:

àcid fènic . . . 10 gr.
àcid làctic . . . 10 gr.
glicerina . . . 20 gr.
aigua dest. . . . 10 cc.

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

Blau metilè . . . 1 gr.
Aigua dest. . . . 100 cc.

- Cloro-Iodur de Zinc (líquid de Schultze)

Clorur de Zinc . . . 30 gr.
Iodur potàssic . . . 5 gr.
Iode . . . 1 gr.
Aigua dest. . . . 15 cc.

- Eosina o Eritrosina

Eosina . . . 1 gr.
Aigua dest. . . . 100 cc.

(una vegada disolta l'eosina s'hi tira un parell de gotes d'àcid acètic).

- Fabril

Blau d'anilina . . . 0,5 gr. {
Lactofenol . . . 100 cc. { sol. A

Fucsina bàsica . . . 0,5 gr. {
Lactofenol . . . 100 cc. { sol. B

Iode . . . 0,3 gr. {
Iodur potàssic . . . 0,6 gr. {
Lactofenol . . . 100 cc. { sol. C

Barregem: sol. A . . . 80 cc.
 sol. B . . . 20 cc.
 sol. C . . . 100 cc.
 (la conservació és indefinida)

- Hematoxilina

Hematoxilina de Delafield

Hematoxilina . . .	4 gr.	{	sol. A
Alcohol absolut . . .	25 cc.		
Sulfat alumínic amònic . . .	40 gr.	{	sol. B
Aigua dest. . . .	400 cc.		

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

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

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

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

Hematoxilina de Friedlander

Hematoxilina . . .	2 gr.	{	sol. A
Alcohol absolut . . .	100 cc.		
Sulfat alumínic potàssic . . .	2 gr.	{	sol. B
Aigua dest. . . .	100 cc.		
Glicerina	100 cc.		

Barregem la solució A amb la B. La deixem catorze 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

Àcid sulfúric concentrat . . .	0,8 cc.	{	sol. A
Sulfat fèrric amònic . . .	1 gr. (alum fèrric)		
Aigua dest. . . .	50 cc.		
Hematoxilina . . .	0,5 gr.	{	sol. B
Alcohol de 96° . . .	50 cc.		

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

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

Hematoxilina de Heidenhain (hematoxilina fèrrica)

Hematoxilina . . .	1 gr.	{	solució mare
Alcohol absolut . . .	10 cc.		
Aigua dest. . . .	90 cc.		

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

Hematoxilina de Weigert

Hematoxilina . . . 1 gr. { sol. A
Alcohol de 96° . . . 100 cc.

Perclorur de ferro . . 4 gr. {
Àcid clorhídric . . . 1 gr. { sol. B
Aigua dest. . . . 95 cc.

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

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

- Lugol (Solució Iodo-iodurada) (específic per al midó)

Iode . . . 1 gr.
Iodur potàssic . . . 2 gr.
Aigua dest. . . . 100 cc.

- Negre de chlorazol (específic de la quitina)

Negre de chlorazol . . . 1 gr.
Alcohol de 70° . . . 100 cc.

amb què obtenint una solució saturada del colorant. Caldrà filtrar-la sempre abans de servir-s'en.

- Orceïna

a) Preparació en fred

Orceïna . . . 1 gr. solució mare
Ac. acètic . . 45 cc.

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

b) Preparació en calent

Orceïna . . . 0,4 gr. solució mare
Ac. 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.

Es la solució mare.

Si a la solució mare d'orceïna, preparada d'una manera o altra s'hi afegeix Cl H 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 dest. . . . 10 cc.
Ac. Píric en solució aquosa saturada . . . 100 cc.

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

- Roig Congo

Roig Congo . . . 0,5 gr.
Aigua dest. . . . 100 cc.

- Roig de ruteni (específic de la pectina)
 - Roig de ruteni 0,5%
 - Aigua destil. . . . 100 cc.

donat que és una reactiu molt car, és possible preparar-lo al 0,01% i duplicar-ne o triplicar-ne el temps d'actuació.
- Safranina (específic de la lignina)
 - Safranina 1 gr.
 - Aigua dest. . . . 100 cc.
- Sudan (específic per a tenyir lípids)
 - Solució saturada amb alcohol de 70°
 - (la quantitat depèn de la marca del colorant)
- Tionina (específic de la lignina)'
 - Tionina 1 o 2 gr.
 - Aigua dest. . . . 100 cc.

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

Si no diem el contrari, acabat de preparar el colorant ja es pot fer servir; tanmateix, és més recomanable la preparació d'un dia per l'altre. A excepció de les hematoxilines, que han de "madurar".

És convenient filtrar els colorants abans de fer-los servir.

MEDIS DE MUNTATGE MÉS EMPRATS PER A FER PREPARACIONS PERMANENTS

<u>Hidrosolubles</u>	<u>No hidrosolubles</u>
Gelatina glicerínada	Bàlsam del Canadà (és el me
Glicerina	di de muntatge més clàssic).
Goma aràbiga	Rhenohistol (sintètic)
Lactofenol	D.P.X. (asseca molt ràpidament)
	Hyrax
<u>muntatge doble amb:</u>	
goma aràbiga-bàlsam	

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

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

Lactofenol	1,44
Glicerina	1,49
Oli de cedre	1,51
Clorofenol	1,52
Bàlsam	1,53
DePex	
Rhenohistol	
Hyrax	

ON RECÓRRER PER TROBAR:

- Epidermis cutinitzada

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



- Epidermis cerificada

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

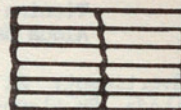


- Epidermis mineralitzada

fulles: Equisets, gramínies
tiges: Equisets, gramínies

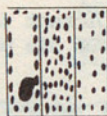
- Epidermis suberificada

tiges: Qualsevol que presenti creixement secundari
arrels: Patata. Pràcticament totes
fulles: No se n'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 (vern).

El primer cas és el més freqüent.

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



- Col·lènquima

fulles: Poc freqüent (*Ficus* pel que fa al nervi central)

tiges: Molt freqüent, acostuma a ser sota l'epidermis, formant una o dues capes.



Les tiges festonejades, en cada sortint, presenten acumulaments de col·lènquima, de tipus perifèric o de tipus angular.

Tiges de julivert, d'api, d'ortiga, etc..

- Esclerènquima

fulles: Quasi mai; ara, a la fulla del 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 llenyosos, on constitueixen una franja contínua (vinya). Acompanyant els feixos de vasos conductors, sempre hi acostuma a haver esclerènquima.

Segons l'edat de l'òrgan vegetal en estudi, així com segons l'hàbitat, podem trobar col·lènquima 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 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 on trobar-ne.

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

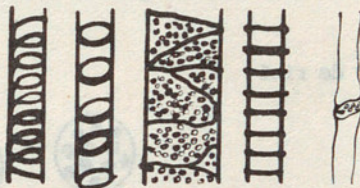


- Vasos conductors

Fulles, tiges i arrels.

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

Els talls longitudinals són particularment interessants per a veure la morfologia dels vasos llenyosos (espiralats, anellats, puntejats, escaleriformes, etc.), així com per a poder estudiar els vasos crivellats.



- Conductes resinífers

Fulla i tiges de pi i d'abet



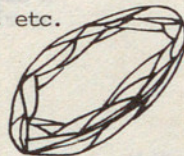
- Conductes d'essència

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



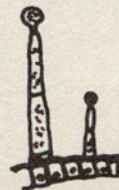
- Bosses d'essència

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



- Glàndules peltades

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



- Glàndules sèssils

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



- Estomes

Fulles (epidermis) i tiges sense creixement secundari

- Cambres estomàtiques

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

- "Lenticelas"

Epidermis suberificades de tiges: rosers, patata, etc.

- Midó

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

- Aleurona

Llavor de ricí



- Cristalls

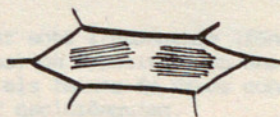
Cistòlits: 1 nivell de l'epidermis de fulles de *Ficus*, *Parietaria officinalis*, ortiga.



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

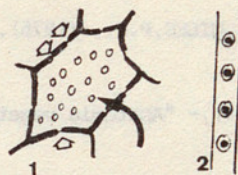


Rafidis: Fulles, tiges i arrels d'algunes plantes, es troben a nivell del parènquima no clorofil·lic. Vinya (*Vitis vinifera*).



- Puntuacions paret celular

- 1 Senzilles: Medulla de sàtic (*Sambucus nigra*), de *Ruscus aculeatus*
- 2 Aerolades: Fusta de pi



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

BIBLIOGRAFIA

- BERNIS MATEU, J., (1976).- "Atlas de Microscopia", Ed. Jover, Barcelona
- BRACEGIRLE, B., MILES, P.H., (1975).- "Atlas de estructura vegetal"
Ed. Paraninfo, Madrid (per a interpretar).
- ESAU, K., (1968).- "Anatomia vegetal"., Ed. Omega., Barcelona
(per a interpretar).
- JOHANSEN, D.A., (1940).- "Plant Microtechnique" Mc Graw-Hill Book., Co. Inc.
(part tècnica).
- NEZELOF, C., HINGLAIS, N., GALLE, P., (1975).- "Técnicas microscópicas"
Ed. Jims., Barcelona
- PUJULÀ, J., (1957).- "Citologia. Parte práctica"., Tip. Cat. Casals.,
Barcelona. (part tècnica).
- ROMAN, B., (1971).- "Tejidos vegetales" Ed. Bruño, Madrid.
(per a interpretar).
- SEGUY, R., (1949 i 1951).- "Le microscope, emploi et applications". T.I. II
Ed. Lechevalier., Paris (part tècnica).
- STRASBURGER, E., (1974).- "Tratado de Botánica"., Ed. Marín, Barcelona
(per a interpretar)
- WALLIS, C.J., (1955).- "Biología práctica"., Ed. Aguilar, Madrid.
(part tècnica).

.....

Principals marques de reactius per microscopia

Chroma

Fluka

Gürr

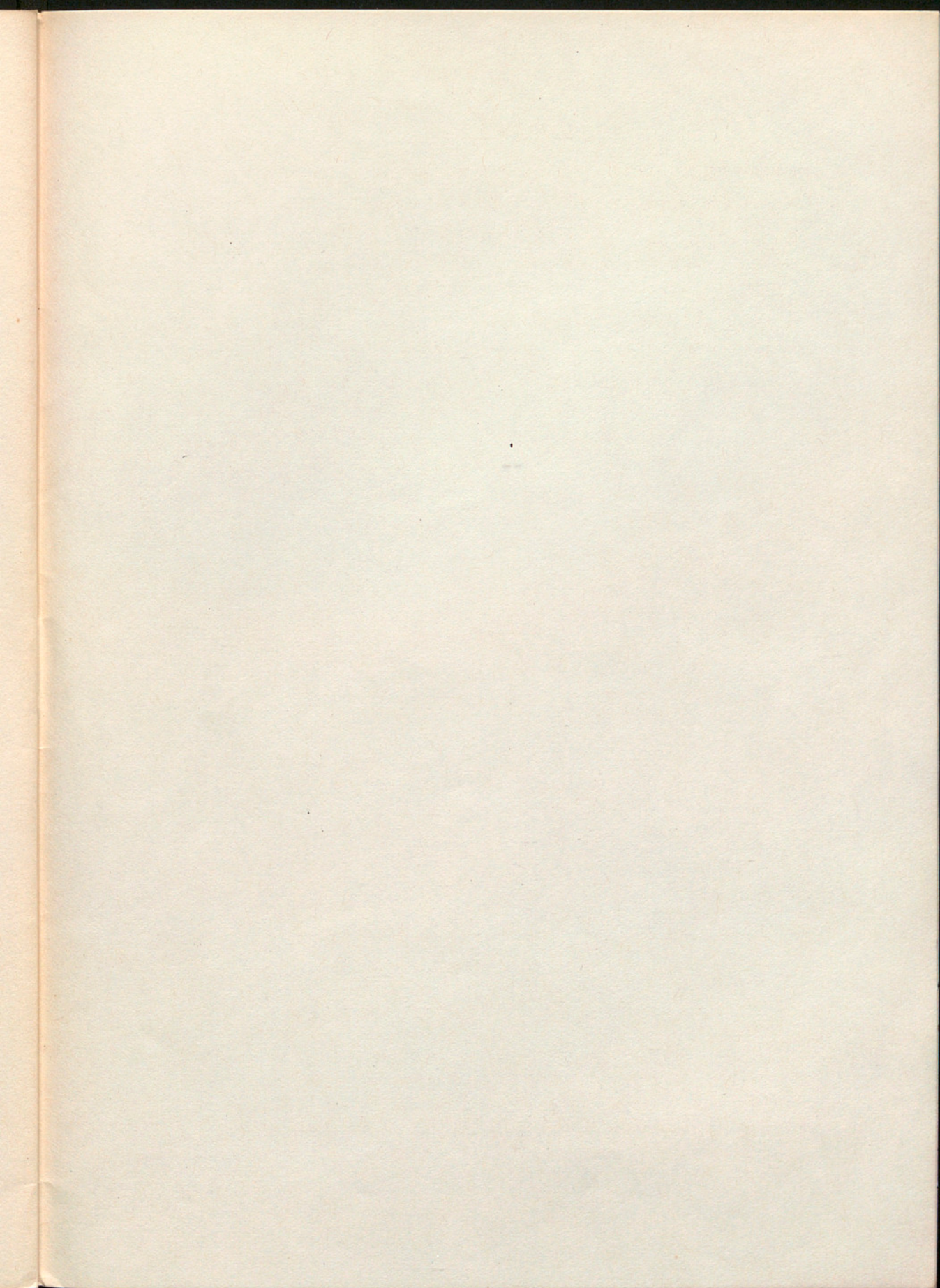
Merk

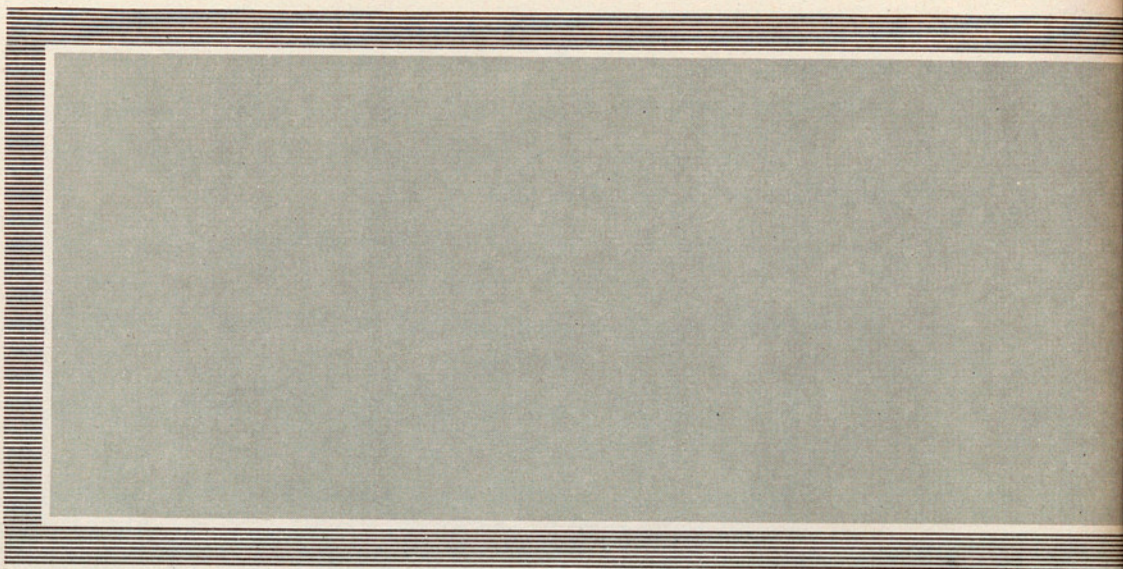
Panreac (és fabricada aquí i resulta, per tant, més econòmica).

.....

Essències

Les essències no solen ésser gaire fàcils de trobar. Les farmàcies antigues acostumen de tenir-ne, així com les drogueries importants. Cal demanar-les de la màxima puresa, ja que si són lleugerament hidratades el muntatge surt defectuós. A Barcelona, un proveïdor important n'és Escuder.





Segona edició, revisada, del text corresponent al Seminari d'Estudis Universitaris nº 3
que tingué lloc a Barcelona els dies 21 a 24 d'octubre de 1975, 16 a 19 de desembre de
1975, i 15 a 24 de novembre de 1976.

Barcelona, 1978