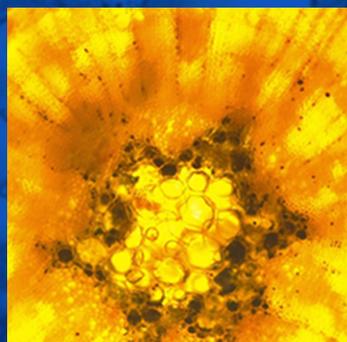
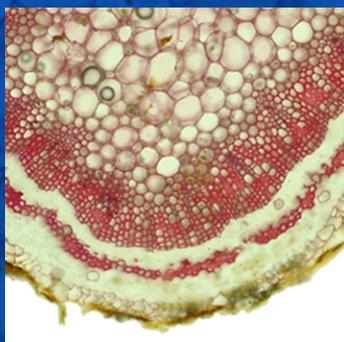


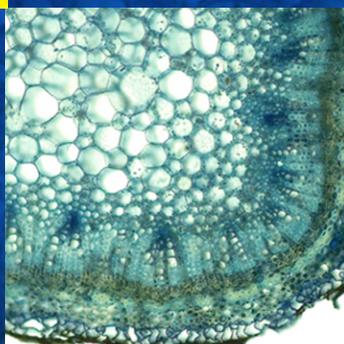


Universidad
de Concepción

DIRECCIÓN
DE DOCENCIA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



MANUAL DE TÉCNICAS ANATÓMICAS E HISTOQUÍMICAS PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS VEGETALES



Narciso Aguilera
Lubia M. Guedes

2021

**2022 MANUAL DE TÉCNICAS ANATÓMICAS E HISTOQUÍMICAS PARA EL ANÁLISIS DE
MUESTRAS VEGETALES**

Registro de Propiedad Intelectual N° 2021-A-11137 año 2021

I.S.B.N. 978-956-227-520-0

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra

©UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

“Pienso en la citología y la anatomía vegetal como un idioma, como las plantas no pueden hablar, tenemos que aprender a leer este idioma a partir de las preparaciones citológicas e histológicas”

Rosy M. Dos Santos Isaias

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. METODOLOGÍA	3
2.1 Obtención y manejo de muestras	3
2.2 Técnicas de fijación	3
2.3 Tipos de cortes	5
2.3.1 Cortes a mano alzada	6
2.3.2 Cortes con micrótomo	7
2.4 Material embebido en polietilenglicol	8
2.4.1 Cortes en micrótomo	9
2.5 Material embebido en parafina	9
2.5.1 Deshidratación	9
2.5.2 Inclusión en Paraplast®	10
2.5.3 Seccionamiento en microtomo rotatorio	11
2.6 Desparafinación e hidratación	12
2.7 Tinción	13
2.7.1 Tinción con Astra blue-safranina 0,5%	13
2.7.2 Tinción con safranina-verde rápido	13
2.7.3 Tinción con safranina-azul de alción	14
2.8 Montaje	14
2.9 Análisis de las muestras y toma de imágenes	15
2.10 Técnicas histoquímicas	15
2.10.1 Detección de almidón con reactivo de Lugol	16
2.10.2 Detección de lípidos con sudan	17
2.10.3 Detección de proteínas con azul de bromofenol	18
2.10.4 Detección de polifenoles	19
2.10.4.1 Detección de polifenoles con formalina-sulfato de hierro III	19
2.10.4.2 Detección de polifenoles con cloruro de hierro III	19
2.10.5 Detección de ligninas	20
2.10.5.1 Por reacción con floroglucinol acidificado (reactivo de Wiesner)	20
2.10.5.2 Por reacción con reactivo de Maule	20
2.10.6 Detección de terpenoides por reacción con reactivo de NADI	21
2.10.7 Detección de alcaloides	21
2.10.7.1 Por reacción con reactivo de Drangerdorff	21
2.10.7.2 Por reacción con reactivo de Dittmar	22

2.11	Programas para mediciones citohistológicas	22
2.12	Preparación de soluciones	23
III.	REFERENCIAS	27
	GLOSARIO	29

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Campana desecadora acoplada a bomba de vacío.	5
Figura 2. Técnica de corte a mano alzada utilizando como soporte plumavit.	6
Figura 3. Micrótopo rotatorio y soportes para los bloques anatómicos.	7
Figura 4. Recipiente de polietileno-glicol 6000 utilizado en anatomía vegetal.	8
Figura 5. Recipiente de Paraplast Plus® utilizado en anatomía vegetal.	10
Figura 6. Distintos tipos de moldes para confección de bloques de Paraplast.	11
Figura 7. Cortes de bloques de Paraplast en microtopo rotatorio.	12
Figura 8. Secciones teñidas con diferente dupla de colorantes.	14
Figura 9. Fotomicroscopio Leica acoplado a un computador.	15
Figura 10. Granos de almidón (flecha) detectados por reacción con Lugol.	17
Figura 11. Gotículas de lípidos detectados con Sudan.	18
Figura 12. Proteínas detectadas en cortes a mano alzada por reacción con azul de bromofenol (flecha).	18
Figura 13. Fenoles totales detectados por reacción con cloruro de hierro III y con formalina-sulfato de hierro III.	19
Figura 14. Detección de ligninas por reacción con reactivo de Wiesner y reactivo de Maule.	20
Figura 15. Detección de terpenoides por reacción con NADI.	21
Figura 16. Detección de alcaloides con reactivo de Dragendorff y con reactivo de Dittmar.	22
Figura 17. Interfaz del Programa Image-J.	23

PRÓLOGO

Este manual incluye una recopilación de las principales técnicas para estudios anatómicos e histoquímicos, que tienen a las muestras vegetales como foco de investigación. Las técnicas aquí presentadas constituyen herramientas de gran valor para investigadores (as), profesores (as) y estudiantes interesados (as) en interpretar las respuestas de las plantas a las interacciones con el medio, ya sea biótico o abiótico; así como evaluar el origen vegetal de especímenes de valor cultural. El conocimiento anatómico e histoquímico también es una herramienta crucial para las investigaciones forenses. Además, muchas preguntas biotecnológicas se pueden responder a través de la preparación e interpretación de cortes histológicos sometidos a las diferentes técnicas aquí presentadas. Estas tinciones indican propiedades químicas de compartimentos citológicos que son fundamentales para estudios anatómicos, o incluso permiten la histolocalización de compuestos químicos, útiles para diagnosticar el origen y condiciones metabólicas de muestras vegetales. La presencia de contaminantes atmosféricos, el control de calidad de los productos alimenticios, así como la botánica forense son algunas de las aplicaciones de las técnicas aquí presentadas. En definitiva, tales técnicas anatómicas e histoquímicas pueden formar parte de etapas iniciales o finales en las investigaciones científicas, al identificar moléculas presentes en el medioambiente que pasan a formar parte de los vegetales, sustancias deseadas o no deseadas en alimentos vegetales, origen vegetal de piezas artesanales de valor histórico y cultural, e incluso sustentar o refutar pruebas criminales. Este manual incluye un conjunto de herramientas que, debidamente aplicadas, nos permiten dialogar con las plantas, sirviendo, por tanto, a los intereses de la investigación en los campos de la ciencia, la cultura y la sociedad.

Dra. Rosy Isaias
Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil

I. INTRODUCCIÓN

Los primeros estudios anatómicos en plantas se le atribuyen a Theophrastus de Eresus (369-262 AC). Este filósofo y botánico griego fue discípulo de Platón y de Aristóteles. El mismo describió -nítidamente para la época- varias estructuras vegetales, fundamentalmente corteza, madera y médula de diversos tipos de plantas; sus estudios realizados de manera visual, le valieron para ser considerado el “Padre de la Botánica”. Progresivamente, los estudios anatómicos se fueron profundizando de civilización en civilización, y comenzaron a tener un mayor alcance desde que Zacharias Janssen en 1590 inventó el microscopio óptico. Dicho instrumento también ha evolucionado de manera significativa y se convirtió en el principal aliado de los estudios anatómicos.

Hasta mediados del siglo XX, la anatomía vegetal también incluía a la morfología. Posteriormente, la anatomía se enfocó a estudiar la organización celular, tejidos internos y estructuras externas de las plantas. Es frecuente encontrar descripciones de estructuras aéreas de las plantas: hojas, tallos, ápices, flores, frutos, vainas semillas; así como subterráneas: raíces y ápices de raíces. Sin embargo, los estudios anatómicos se sustentan en la aplicación de diferentes técnicas, lo que estará en función del tipo de tejido u órgano objeto de estudio. Debido a que los tejidos vegetales y sus componentes son difíciles de observar, se requiere la realización de tinciones y preparaciones permanentes, que faciliten las observaciones e identificación mediante diferentes tipos de microscopios.

La anatomía vegetal junto a la histoquímica, tienen una relación muy estrecha con las diferentes áreas de la botánica; como por ejemplo: morfología, fisiología, taxonomía, entre otras. Se ha demostrado que, independientemente de la aparición de los estudios moleculares y sus grandes aportes, la anatomía continúa siendo una herramienta poderosa para comprender las respuestas de las plantas a diferentes factores bióticos y abióticos. Es por ello, que prácticamente todos los estudios vinculados a las plantas, pueden valerse de la anatomía en articulación con el resto de las herramientas que se puedan aplicar en las distintas investigaciones. De esta manera, es necesario remarcar que la información que se obtiene desde la anatomía es insustituible y extremadamente reveladora.

Muchos fenómenos que se observan en las plantas silvestres o cultivadas, solamente pueden ser explicados con aplicación de la anatomía. Es por ello, que todas las personas que se dedican al estudio de las plantas, deben tener dominio de las principales herramientas anatómicas. Por consiguiente, este manual hace énfasis en el uso de las principales técnicas anatómicas e histoquímicas necesarias para esclarecer problemas asociados al cultivo de plantas en condiciones *ex vitro* e *in vitro*. Prácticamente todos los estudios biotecnológicos, pueden ser apoyados con la aplicación de al menos alguna técnica anatómica y/o histoquímica. Por ejemplo, en sistemas de multiplicación masiva mediante micropropagación, en diversas oportunidades, la aplicación de técnicas anatómicas ha permitido detectar desconexión vascular entre la parte aérea de la planta y las raíces. Hallazgos de este tipo son relevantes para tomar decisiones y solucionar el problema. Dentro de tantas posibles aplicaciones de la anatomía e histoquímica a estudios biotecnológicos, también se puede hacer alusión a la exploración de bioherbicidas. Las técnicas anatómicas e histoquímicas pueden contribuir a explicar el modo de acción de potenciales candidatos bioherbicidas, basándose en daños o alteraciones que los mismos pueden ocasionar a nivel celular y tisular en las plantas receptoras. De esta manera, decidir el momento de aplicación, concentraciones, entre otros detalles relevantes.

Este manual significa una guía práctica, que facilitará la aplicación de técnicas anatómicas e histoquímicas en diferentes tipos de estudios relativos a plantas. El mismo se sustenta en las experiencias desarrolladas en el Laboratorio de Semioquímica Aplicada (LSqA) (<http://lsqa.udec.cl/>) de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. Se espera que el presente manual, sea de mucha utilidad para estudiantes e investigadores (as) y contribuya, especialmente, a la robustez de la formación académica de las y los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Vegetal.

II. METODOLOGÍA

2.1. Obtención y manejo de muestras

Una vez que se ha decidido realizar un estudio anatómico de una especie vegetal, es importante que se cuente con la mayor información posible sobre su identidad taxonómica, sus hábitos de crecimiento, fenología y distribución geográfica. Durante la recolecta del material biológico, es necesario seleccionar órganos sin daños aparentes y completamente desarrollados, a no ser que se vaya a realizar un estudio ontogénico.

Al recolectar el órgano vegetal se debe tener cuidado de no dañar los tejidos de la estructura, por eso se recomienda hacer cortes limpios con ayuda de una tijera de podar u otra herramienta que no provoque ruptura de los tejidos. Debido al gran contenido de agua de los tejidos vegetales, estos son propensos a sufrir rápidamente de deshidratación, por lo que se recomienda guárdalos a bajas temperaturas o llevarlos directamente a una sustancia fijadora. Las bajas temperaturas se pueden garantizar con ayuda de un *cooler* o una caja de plumavit que contenga gel refrigerante o hielo seco. Para evitar que el órgano recolectado entre en contacto con el gel o el hielo, se recomienda envolver las muestras en papel Kraft o papel de diario; ambos tipos de papel son buenos conservantes de la temperatura y la humedad. Una vez en el laboratorio, las muestras deben ser rápidamente procesadas. En caso de ser necesarias para estudios posteriores, estas deben ser fijadas en una solución fijadora.

Hay varios aspectos indispensables a la hora de recolectar material para análisis anatómicos, independientemente del fin del estudio:

1. Las plantas de donde se recolectará el material biológico deberán tener las mismas características fisiológicas y fenológicas.
2. Los órganos recolectados deberán proceder del mismo nivel de la altura de la planta, con estado de desarrollo similar, preferentemente órganos maduros y completamente desarrollados.
3. La hora de recolección debe ser similar para todas las muestras en estudio, preferentemente en horarios donde las temperaturas sean lo más frescas posibles para evitar la deshidratación de los tejidos.

2.2. Técnicas de fijación

El estudio anatómico y morfológico del material vegetal requiere de su conservación en buen estado, para el posterior análisis en el laboratorio. Se deben

conservar las estructuras internas y externas de manera que sufran las menores alteraciones posibles. Por ello, es importante detener los procesos bioquímicos y proteolíticos y estabilizar los componentes celulares de la muestra vegetal. Esto se puede lograr a través del proceso de fijación. Dicho proceso puede ser realizado a través de métodos físicos o químicos.

La fijación química es la más utilizada para fijar muestras biológicas para microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica (ME). El tipo de fijador que se seleccionará está en relación directa con el modelo de procesamiento posterior, ya sea MO o ME. Se han descrito varias alternativas de fijadores; sin embargo, los más comunes utilizados para muestras vegetales son etanol, metanol, acetona, formaldehído, glutaraldehído y tetraóxido de osmio (Yeung et al. 2015). Para profundizar más en cada uno de estos fijadores, por favor consultar Yeung et al. (2015).

Las sustancias fijadoras se pueden usar solas o combinadas con otras. Para la microscopía de luz, una de las combinaciones más usadas es el formaldehído y glutaraldehído, conocido como solución de Karnovsky (Karnovsky 1965). Esta combinación ofrece como ventaja la rápida penetración y estabilización del tejido; lo que es facilitado por las moléculas de formaldehído y los enlaces cruzados estables generados por el glutaraldehído (Yeung et al. 2015).

Para muestras que se van a incluir en parafina, la combinación fijadora más recomendada es la formalina (37%) - ácido acético glacial - etanol (FAA) (Johansen 1940). El formaldehído penetra rápidamente en el tejido, mientras que el efecto de contracción del etanol se contrarresta con el efecto de hinchazón que produce el ácido acético. Finalmente, el tejido se estabiliza por la propiedad de reticulación del formaldehído (Yeung et al. 2015).

El tamaño de la muestra es importante durante el proceso de fijación. Se recomienda cortar las muestras en segmentos de 0,5 a 1,0 cm. El tamaño reducido del material permite acelerar la penetración del fijador, a la vez que permite orientar el material para el tipo de corte deseado. El volumen del fijador elegido debe ser de 15 a 20 veces superior al material vegetal.

La temperatura y tiempo de fijación son dos factores también importantes durante el proceso de fijación. Temperaturas de 4°C son recomendables para obtener un buen proceso de penetración del fijador. Esto se logra al almacenar las muestras en su fijador y colocarlas en refrigeración, pero no en congelación. En FAA, el fijador más utilizado en nuestros estudios anatómicos vegetales, se suelen dejar las muestras de tallos y raíces poco lignificadas y hojas por 24 h (Sandoval 2005). En

el caso de materiales vegetales procedentes de cultivo *in vitro* o tejidos meristemáticos, la fijación podría ser por 12 h. Sin embargo, para tejidos muy lignificados, como algunos tallos y raíces, el proceso de fijación con FAA durará hasta 1 semana. En los casos que la fijación se prolongue demasiado, es recomendable realizar un recambio de fijador. En el fijador Karnovsky, por lo general, las muestras permanecerán durante 48 h.

Es muy importante que las muestras vegetales sean sometidas a un tratamiento de vacío. El mismo asegurará retirar el aire de los espacios intercelulares. Para ello, es recomendable aspirar las muestras durante 5 a 15 min. Esto posibilitará una mejor penetración del fijador y una mayor infiltración. Es recomendable ejecutar dicha etapa una vez incluido el material en el fijador, aunque el procedimiento se puede realizar en diferentes tiempos (Yeung et al. 2015). La extracción de aire se puede realizar en una campana desecadora acoplada a una bomba de vacío (Fig. 1).



Figura. 1. Campana desecadora acoplada a bomba de vacío. Las muestras se colocan en su fijador dentro de la cámara y se dejan hasta 15 min o más. Un indicador de que el aire se ha retirado es cuando las muestras bajan al fondo del recipiente con el fijador.

2.3. Tipos de cortes

Los cortes se pueden realizar en material fresco (sin ningún tratamiento previo) o en material fijado, en dependencia del objetivo del estudio. Cuando el material está previamente fijado, este debe ser lavado con agua destilada para eliminar el fijador. Si el material no se va a cortar de inmediato, después del tiempo de fijación se conservarán en etanol 50% o 70%. Los cortes se pueden ejecutar a mano alzada o

incluidos en algún material que les brinde soporte; estos últimos deberán realizarse en un micrótopo.

2.3.1. Cortes a mano alzada

Un método rápido y sencillo de obtener los detalles anatómicos de una estructura es realizar cortes a mano alzada. El material vegetal puede ser previamente fijado o material fresco. Cuando se van a realizar estudios histoquímicos o de localización de compuestos químicos en tejidos vegetales, es recomendado usar material sin fijar y realizar los cortes a mano alzada. Los fijadores y las sustancias deshidratadoras suelen lavar los componentes químicos de los tejidos.

El corte a mano alzada se realiza generalmente con una hoja de afeitar (gillete), aunque también se puede usar un micrótopo de mano. El tamaño recomendado de la muestra es de 1 x 1 cm (Sandoval 2005). Para obtener un corte más preciso se puede utilizar un soporte, el cual puede ser un segmento de plumavit (Fig. 2). Para obtener cortes de buena calidad es importante la posición de la hoja de afeitar (Fig. 2A). Los cortes obtenidos se deben recoger con un pincel fino y depositar en una placa de Petri con agua destilada. En un corte a mano alzada, las secciones obtenidas llegan a tener un grosor de aproximadamente 50 μm (Fig. 2B).

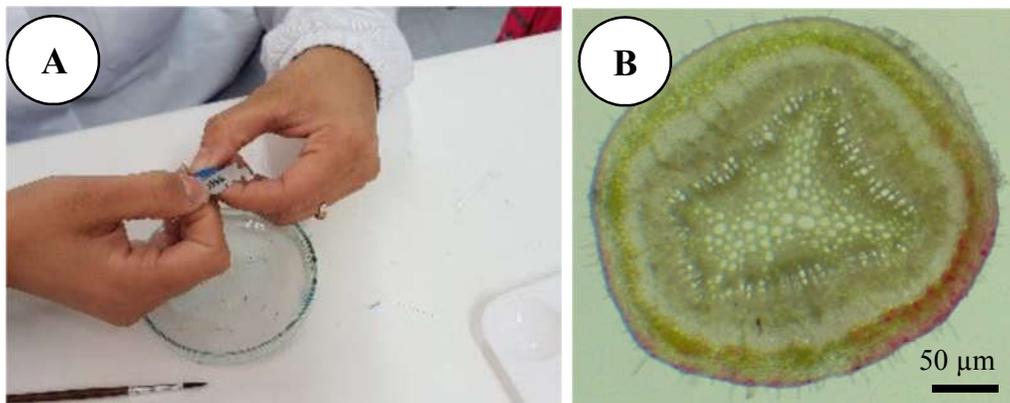


Figura 2. A: Técnica de corte a mano alzada utilizando como soporte plumavit. Los cortes se recolectan en una placa Petri con agua destilada con ayuda de un pincel. **B:** Corte sin tinción (blanco) del tallo de *Nothofagus obliqua* realizado a mano alzada.

Los cortes obtenidos deben colocarse inmediatamente en agua destilada para evitar su deshidratación. Si los cortes obtenidos fueran muy gruesos, se puede realizar el aclarado de estos con hipoclorito de sodio, seguido de lavados consecutivos con agua destilada para retirar el hipoclorito y que no interfiera en el

proceso de tinción. Un buen indicador para saber si se ha retirado todo el hipoclorito, es oler hasta no detectarse el olor típico de esta sustancia.

2.3.2. Cortes con micrótopo

En materiales difíciles de cortar o cuando se necesitan cortes muy delgados, se realizan cortes con micrótopo. Para este tipo de cortes son necesarios varios pasos previos. Primeramente, el órgano vegetal tiene que ser fijado. En dependencia del tipo de medio de inclusión, el material vegetal deberá ser o no deshidratado. La inclusión o infiltración es un proceso en el que el tejido se rodea de un medio para soportar el seccionamiento. En anatomía vegetal los medios de inclusión más usados son a base de parafinas, aunque el polietilen-glicol (PEG) también se utiliza con muy buenos resultados. Ambos materiales se pueden cortar en micrótopo rotatorio (Fig. 3A). Para realizar los cortes, se deben confeccionar bloques que se colocan sobre un casete histológico (Fig. 3B) o se pegan a un taco de madera (Fig. 3C) en dependencia de las características del micrótopo.

Después de la fijación y antes de la inclusión o infiltración, es aconsejable eliminar el fijador mediante enjuagues sucesivos con una solución de lavado adecuada, que puede ser agua, etanol o algún buffer. Para FAA, el enjuague con etanol 50% es suficiente. Si se utiliza un buffer como componente de un fijador, como en el caso de Karnovsky, las muestras deben enjuagarse con el mismo tampón varias veces antes de la deshidratación. La eliminación incorrecta de los agentes de fijación puede interferir con los procedimientos posteriores de tinción.

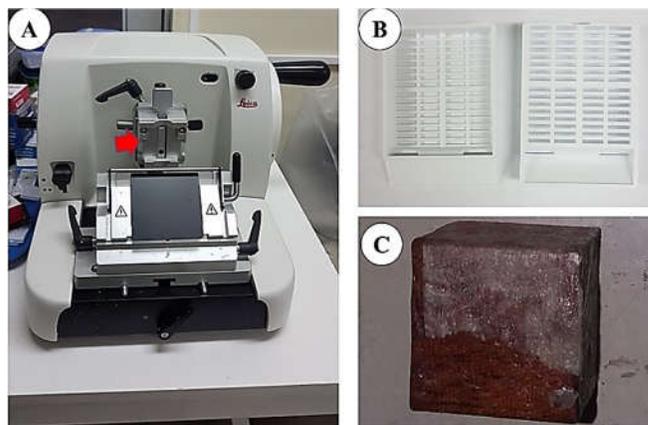


Figura 3. A: Micrótopo rotatorio. A- B: Soportes para los bloques anatómicos. B: Casete histológico. C: Taco de madera. El micrótopo (A) está habilitado para soportes tipo casete histológico (B) el cual se coloca en el soporte señalado con flecha roja.

2.4. Material embebido en polietileno-glicol (PEG 6000)

El polietileno-glicol se utiliza en la anatomía vegetal para el procesamiento de materiales duros, con diferentes grados de complejidad estructural y numerosos indumentos, como tricomas. El PEG (Fig. 4) es altamente hidrófilo y su masa molecular oscila entre 200 y 10000, según la estructura del polímero. El PEG 6000 se ha utilizado exitosamente para infiltrar material vegetal (Ferreira et al. 2014, 2017). La temperatura de fusión del PEG 6000 es de 60°C y su solubilidad es alta, incluso en presencia de electrolitos. A esto se debe su éxito en la anatomía vegetal, ya que mantiene la integridad del contenido celular incluso después de todos los procesos previos a la infiltración.

Las ventajas del PEG sobre las parafinas y sus derivados son numerosas. Debido a la solubilidad del PEG en agua, para la infiltración con este polímero no se necesita deshidratación, por lo que el material vegetal conserva su contenido celular. En estudios histoquímicos de materiales difíciles de cortar, el PEG se ha utilizado exitosamente (Ferreira et al. 2014, 2017).



Figura 4. Recipiente de polietileno-glicol 6000 utilizado en anatomía vegetal.

Pasos para inclusión y emblocamiento en PEG 6000 (según Ferreira et al. 2014, 2017).

1. El material previamente fijado en FAA o Karnovsky se debe lavar en agua destilada tres veces por 5 min.
2. Las muestras se colocan en una solución de PEG al 25% en estufa a 60°C.

3. Cuando el volumen del recipiente con PEG al 25% haya alcanzado la mitad del volumen inicial, generalmente entre las 24 a 48 h, se añade una solución de PEG 100% hasta alcanzar el volumen inicial.
4. Las muestras se dejan por 24-48 h, tiempo en el cual se realizan los bloques de PEG. Para ello se utilizará PEG al 100%. Los bloques se colocarán en congelador para mantener su dureza y frialdad.

2.4.1. Cortes al micrótopo

Para ejecutar los cortes de los bloques de PEG, se utiliza un microtopo rotatorio (Fig. 3A). Los cortes se realizarán entre 15-40 μm . A diferencia de los cortes de material embebido en parafinas, los cortes en PEG se obtienen de a uno, los que se recolectan con ayuda de un pincel fino y se depositan sobre una placa Petri con agua destilada a temperatura de 40°C. Las secciones se lavan con agua destilada para retirar el PEG y con la ayuda del pincel se colocan sobre los portaobjetos. Durante el seccionamiento, el bloque debe mantenerse frío y húmedo. Para lograrlo, se recomienda utilizar un pequeño bloque de hielo envuelto en toalla nova o similar, el cual se colocará sobre el bloque entre corte y corte.

2.5. Material embebido en parafina (Paraplast®)

El medio de infiltración más usado en anatomía vegetal es la parafina, que actualmente ha sido sustituida por polímeros de parafina como el Paraplast® (Fig. 5). El Paraplast® está compuesto por una mezcla refinada de parafinas muy purificadas que contienen polímeros plásticos de peso molecular regulado. Esto ayuda a mejorar la infiltración de los tejidos y obtener cortes de alta calidad con una mínima compresión. El Paraplast® imprime a los tejidos quebradizos y difíciles de cortar una elasticidad innata, que hace posibles cortes excelentes y desprovistos de pliegues. Sin embargo, las parafinas y sus derivados son insolubles en agua, por lo que para la inclusión en este medio es necesario la deshidratación del material vegetal.

2.5.1. Deshidratación

Para muestras que se incluirán en parafina o sus derivados, la deshidratación es un paso obligatorio para retirar el agua de los tejidos, debido a que la parafina no es miscible con el agua. Existen varios tipos de series de deshidratación que incluyen etanol, metanol, acetona, alcohol butílico y el alcohol isoamílico. En este epígrafe se describirá la serie butílica.



Figura 5. Recipiente de Paraplast Plus® utilizado en anatomía vegetal.

Deshidratación en serie butílica: esta técnica se describe en Kraus y Arduin (1997) y fue adaptada en el Laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.

1. Las muestras fijadas se pasan a una solución de etanol. Si se utiliza el FAA como fijador, el etanol se usará al 50% o 70%. Si se utiliza un fijador acuoso, después de un lavado breve con agua o tampón, la deshidratación comienza con etanol 30%.
2. La deshidratación continuará de forma gradual en soluciones de butanol: 50, 70, 85, 90, 100% y butanol absoluto.

Observaciones: la deshidratación debe ser gradual, especialmente para células vegetales vacuoladas. La deshidratación rápida puede causar una rápida difusión, lo que puede provocar plasmólisis y colapso de las células. La duración de cada paso de deshidratación varía en dependencia del tamaño de la muestra y del fijador utilizado. Un tiempo adecuado puede ser de 2 h. La deshidratación se realiza en frascos tapados y las soluciones se descartan después de usadas.

2.5.2. Inclusión en Paraplast®

Antes del proceso de infiltración en parafina o sus derivados, se necesita de un fluido de transición, uno recomendable es el butanol-aceite mineral. Los cortes deben estar inmersos en este fluido de transición por al menos 12 h. Después de

este paso, se realizan diferentes cambios de Paraplast®, generalmente cuatro cambios. En estos pasos se infiltra el material vegetal en Paraplast® fundido por espacio no menor de 12 h. Este tiempo depende del tipo de material vegetal. La infiltración se realiza en estufa a 60°C todo el tiempo que dure el proceso. El Paraplast® es reciclable, por lo que no se desecha en cada uso. El objetivo de diferentes cambios de Paraplast® es ir eliminando el butanol y aceite mineral que pueda quedar en las células hasta lograr la infiltración total de Paraplast® puro.

La inclusión se realiza en Paraplast® puro. La confección de los bloques de Paraplast® se realiza en moldes comerciales (Fig. 6 A, C), los que pueden ser sustituidos por bloques de papel (Fig. 6 D) y de papel de aluminio, siempre que puedan ser retirados una vez que el bloque se solidifique. Este proceso se realiza sobre placa caliente a fin de trabajar con parafina fundida. Para lograr la solidificación de los bloques, y como el Paraplast® se solidifica a temperatura ambiente, este proceso se realiza a temperatura ambiente. Un aspecto importantísimo en este paso, es colocar la muestra en la posición anatómica correcta en la cual se desea realizar el corte, y que los cortes se mantengan en posición vertical.

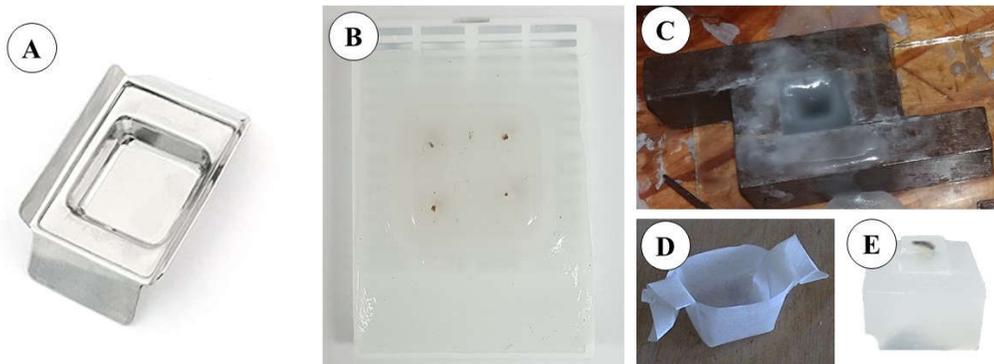


Figura 6. Distintos tipos de moldes para confección de bloques de Paraplast. **A:** molde de acero inoxidable. **B:** bloque de Paraplast unido a un casete histológico. **C:** Barras de Leuckart como molde para un bloque de Paraplast. **D:** molde hecho con papel. **E:** Bloque de Paraplast, el cual es resultado del uso del molde en C y D.

2.5.3. Seccionamiento en microtomo rotatorio

Los cortes de los bloques de Paraplast® se realizan en micrótomos rotatorios, con un espesor entre 8-12 μm . En este paso es importante la colocación de la navaja y

el ángulo de inclinación de esta para obtener buenos resultados. La ventaja de dicho equipo consiste en que cada corte se pega al anterior formándose una cinta (Fig. 7). El portaobjetos se cubre con una capa delgada de adhesivo (Haupt 1930, adhesivo comercial, u otro tipo de adhesivo) sobre la que se colocan las cintas; estas deben flotar. Todo el proceso se realiza sobre una placa caliente (40 a 50°C) (Fig. 7). Una vez seco el adhesivo, las láminas portaobjetos se retiran de la plancha y se dejan secar por 24 h.

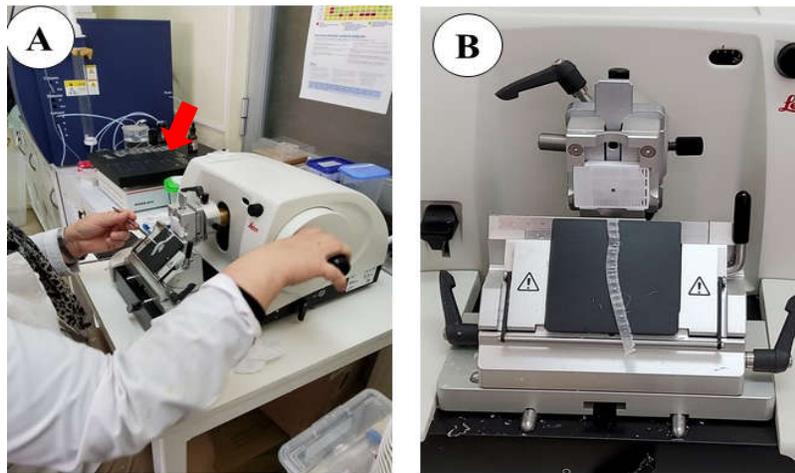


Fig. 7. Cortes de bloques de Paraplast en microtomo rotatorio. **A:** Manejo del microtomo durante el corte. **B:** Secciones unidas en una cinta continua. Nótese en (A) la placa calefactora (flecha roja), con portaobjetos con cortes, previamente se depositó una capa delgada de adhesivo de Haupt.

2.6. Desparafinación e hidratación

Antes de proceder a la tinción de las secciones vegetales, se debe eliminar el medio de inclusión a través de un proceso de desparafinación. Para eliminar el Paraplast®, por ejemplo, se puede utilizar acetato de butilo a 37°C. Las láminas portaobjetos contenidas en una cubeta anatómica con acetato de butilo se ponen en baño María a 37°C por más o menos 20 min. Después se retira el acetado de butilo y se añade etanol 100% y se deja por 4 min en baño de María. Posteriormente, se realiza un proceso de rehidratación para preparar los tejidos para la tinción. La rehidratación se realiza con serie descendente de etanol (100, 90, 80, 70 y 50%).

2.7. Tinción

La elección del (los) colorante (s) depende del tipo de estudio que se vaya a realizar. Es preferible una doble coloración, lo que permite la diferenciación de las células de acuerdo con su afinidad por los distintos colorantes. Existen numerosas combinaciones de colorantes; la más usada es la coloración con safranina-Astra blue (SB). Debido a que el Astra blue ya no se comercializa, se utilizan otras duplas de coloración como la combinación safranina-verde rápido y safranina-azul de alcán, las cuales se utilizan en el LSqA.

2.7.1. Tinción con safranina-Astra blue (0,5%) (Bukatsch 1972)

Tinción en solución de safranina-Astra blue (0,5%) por 20 min.

1. Enjuagar con agua destilada hasta dos veces.
2. Deshidratación etanólica (100, 90, 80, 70 y 50%) por más o menos 2 min en cada solución.
3. Deshidratación con acetato de butilo absoluto. Las láminas pueden permanecer en acetato de butilo hasta la etapa de montaje.

2.7.2. Tinción con safranina-verde rápido

Esta técnica se ha adaptado del sitio web de la Universidad de Vigo (<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-safranina-a-v.php>)

1. Tinción en safranina 1% por 4 min. Algunos autores recomiendan tiempos superiores, de hasta 30 min (Sandoval 2005). En nuestra experiencia entre 20-30 min se consigue el mejor resultado.
2. Lavar bien en agua destilada (2 veces).
3. Pasar por etanol 96%.
4. Tinción con solución de verde rápido 1% por 40 s. El tiempo se debe controlar muy bien, pues el verde rápido elimina la tinción de safranina. En nuestra experiencia, un pase rápido por la solución de verde rápido es suficiente para lograr la tinción deseada.
5. Deshidratación con etanol 100%, seguido de butanol absoluto y acetato de butilo por 1 min en cada sustancia.

2.7.3. Tinción con safranina-azul de alción (Luque et al. 1996)

1. Tinción en safranina 1% por 1 min.
2. Lavar bien en agua destilada por 20 s (3 veces).
3. Tinción con azul de alción entre 3 a 5 min.
4. Lavar con agua destilada.
5. Diferenciar en etanol 96%.
6. Deshidratación con etanol 100% (2 veces), seguido de acetato de butilo por 1 min en cada sustancia.

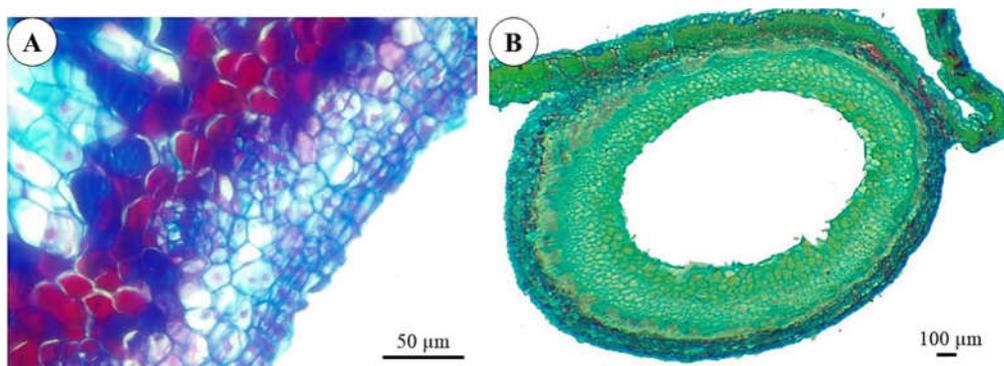


Figura 8. Secciones teñidas con diferente dupla de colorantes. **A:** tejidos internos de agalla de *Andescecidium parrai* teñidos con safranina y azul de Astra. **B:** vista general de una agalla de insecto en hojas de *Nothofagus obliqua* teñido con safranina y azul de alción.

2.8. Montaje

El montaje puede ser permanente, obteniéndose láminas que tienen una duración indefinida o semipermanente, cuando se preparan láminas de corta duración. Sobre los cortes se coloca barniz vitral o bálsamo de Canadá, más recientemente estamos utilizando Pertex® para fijar los cortes al portaobjeto. Los cortes se cubren con la lámina cubreobjeto y se dejan reposar en una superficie plana y con un peso que presione levemente el cubreobjeto. Para mejor sellaje, una vez completamente secas, se pasa brillo de uñas por el borde de la lámina cubreobjetos. Una lámina terminada debe ser debidamente identificada, para ello se coloca una etiqueta en la cual se indica: nombre de la planta, órgano, tipo de corte, coloración utilizada, nombre de quien la realizó y fecha. Por ello, es indispensable una correcta identificación de las muestras en el paso de recolección del material vegetal.

2.9. Análisis de las muestras y toma de imágenes

El análisis de las muestras preparadas, sean semipermanentes o permanentes, se realizará en un microscopio óptico (Fig. 9). Las muestras se observarán a diferentes aumentos para facilitar la observación y descripción de las estructuras deseadas. Las descripciones anatómicas suelen ir acompañadas de imágenes o fotografías científicas, denominadas fotomicrografías (todas las imágenes microscópicas mostradas en este manual son fotomicrografías). Para obtener fotomicrografías se utilizan fotomicroscopios, o sea microscopios acoplados a cámaras digitales. Es recomendable tomar imágenes a diferentes aumentos para facilitar la interpretación y visualización de los resultados. Cuando se utiliza las fotomicrografías, estas deben ir acompañadas de una escala referencial, obtenidas según el aumento con que se tomó la imagen.



Figura 9. Fotomicroscopio Leica acoplado a un computador donde se almacenan, a través de un software, las fotomicrografías tomadas. La cámara digital está acoplada al microscopio y se ubica en la parte superior del mismo (flecha azul).

2.10. Técnicas histoquímicas

Las células vegetales contienen numerosos metabolitos primarios y secundarios que cumplen diferentes funciones. A través de técnicas histoquímicas estas sustancias se pueden identificar, debido a la capacidad de algunos colorantes específicos de reaccionar con los metabolitos y producir coloraciones o precipitados fáciles de observar al microscopio. A continuación, se describirán algunas de las técnicas histoquímicas utilizadas en la literatura científica para la identificación de componentes estructurales y de reservas en las células vegetales.

Aunque algunos metabolitos se pueden detectar en muestras incluidas en Paraplast® u otros medios de inclusión, las sustancias químicas que se aplican durante el proceso preparativo de las muestras, pueden lavar la mayor parte del contenido celular. Esto provoca que se obtengan falsos negativos, debido a la interferencia de fijadores, soluciones deshidratantes y del medio de inclusión. La inclusión en PEG 6000 (Ferreira et al. 2014, 2017) se ha utilizado con muy buenos resultados para determinar metabolitos primarios y secundarios, debido a que las muestras no necesitan ser deshidratadas para incluirlas en este medio de inclusión. Los mejores resultados histoquímicos se obtienen en muestras cortadas a mano alzada. El mayor inconveniente con este tipo de corte es lograr secciones lo suficientemente delgadas como para que permitan pasar la luz del microscopio y puedan ser observadas. Otro inconveniente es la dureza del material que se vaya a cortar, pues tejidos muy blandos o duros pueden ser difíciles de seccionar y se necesitará de técnicas anatómicas que faciliten el corte. Si se fuese a utilizar secciones obtenidas en micrótopo, ya sean incluidas en PEG o Paraplast®, hay que cerciorarse siempre de eliminar el medio de inclusión de los cortes para facilitar la reacción con el colorante de la prueba histoquímica. Muchas de las reacciones histoquímicas son efímeras, por lo que es importante que, una vez concluido el tiempo establecido en la técnica, se observen al microscopio y se tomen las imágenes correspondientes.

2.10.1. Detección de almidón con reactivo de Lugol (Johansen 1940)

Procedimiento

- Colocar los cortes en el reactivo de Lugol por 5 a 10 min.
- Lavar con agua destilada
- Montar con agua o gelatina glicerizada.

Resultado: los granos de almidón se colorean de castaño y negro azulado (Fig. 10 A-B).

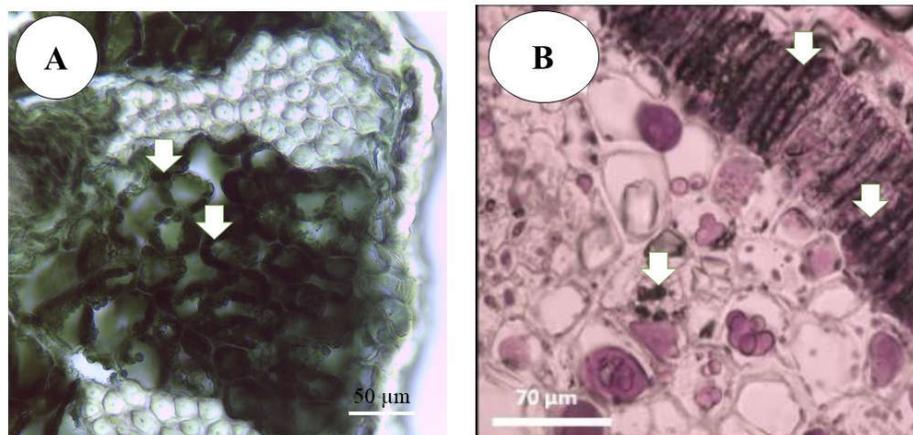


Figura 10. Granos de almidón (flecha) detectados por reacción con Lugol. **A:** en filocladios de *Ulex europaeus* incluido en PEG 6000. **B:** en peciolo de *Callistemon* sp. Cortados a mano alzada.

2.10.2. Detección de lípidos con Sudan (black, red, III y IV) (Brundrett et al. 1991)

Pueden utilizarse cualquiera de los Sudan referidos, los resultados serán los mismos solo con variaciones de coloración.

Procedimiento

- Colocar los cortes entre 15 a 30 min en solución etanólica de Sudan recién filtrada. El recipiente debe estar tapado para evitar la evaporación de etanol.
- Lavar en etanol 70% seguido de lavado en agua destilada.
- Montar con agua o gelatina glicerinada.

Resultado: Las gotículas de lípidos se colorean de anaranjado con Sudan III, rojo con Sudan IX y Sudan red, y azul o negro con Sudan black (Fig. 11).

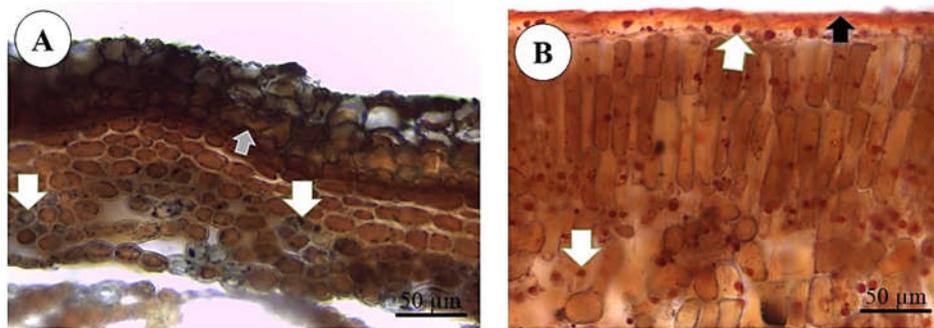


Figura 11. Gotículas de lípidos (flechas). **A:** en tallos de *Schinus polygama* incluidos en PEG 6000 y detectados con Sudan black. **B:** en hojas de *S. polygama* cortadas a mano alzada y detectadas con Sudan IV. Nótese en (A) (flecha gris) la detección de suberina en las paredes del súber y en (B) (flecha negra) la detección de compuestos lípidos en la cutícula adaxial.

2.10.3. Detección de proteínas con azul de bromofenol (Mazia et al. 1953)

Procedimiento

- Colocar los cortes en solución acuosa de azul de bromofenol hasta que aparezca coloración azul.
- Lavar en ácido acético al 2% por 15 min.
- Lavar en agua destilada por 3 min.
- Montar con agua o gelatina glicerinada.

Resultado: Las proteínas se tiñen de color azul oscuro a púrpura (Fig. 12).

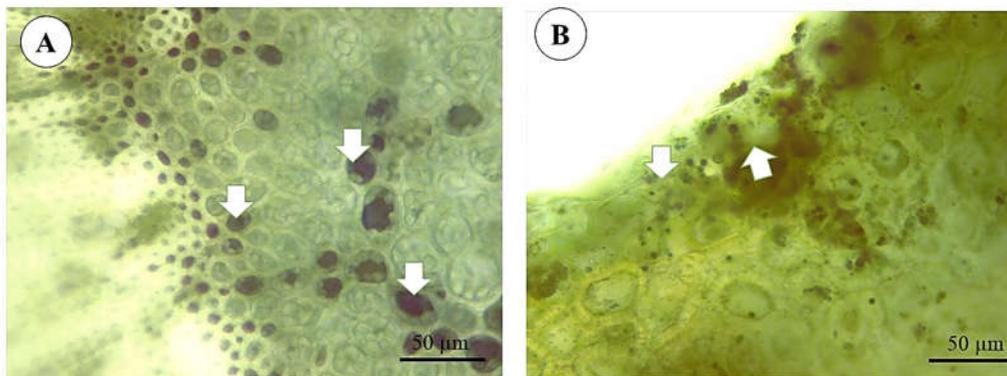


Figura 12. Proteínas detectadas en cortes a mano alzada por reacción con azul de bromofenol (flecha). **A:** en tallos de *Schinus polygama*. **B:** en el tejido nutritivo de agallas de *Espinosa nothofagi* inducidas en yemas de *Nothofagus obliqua*.

2.10.4. Detección de polifenoles

2.10.4.1. Detección de polifenoles con formalina-sulfato de hierro III (Johansen 1940)

Procedimiento

- Fijar segmentos del órgano en solución de formalina y sulfato de hierro por 48 h.
- Lavar en agua destilada.
- Cortar a mano alzada o en embeber el PEG y cortar con micrótom.
- Montar en agua o gelatina glicerinada.

2.10.4.2. Detección de polifenoles con cloruro de hierro III (Johansen 1940)

Procedimiento

- Colocar los cortes en solución etanólica de cloruro de hierro III (FeCl_3) por 15 a 30 min.
- Lavar con etanol 95%.
- Montar con agua o gelatina glicerinada.

Resultado: Los fenoles totales se tiñen de color marrón o café a negro (Fig. 13).

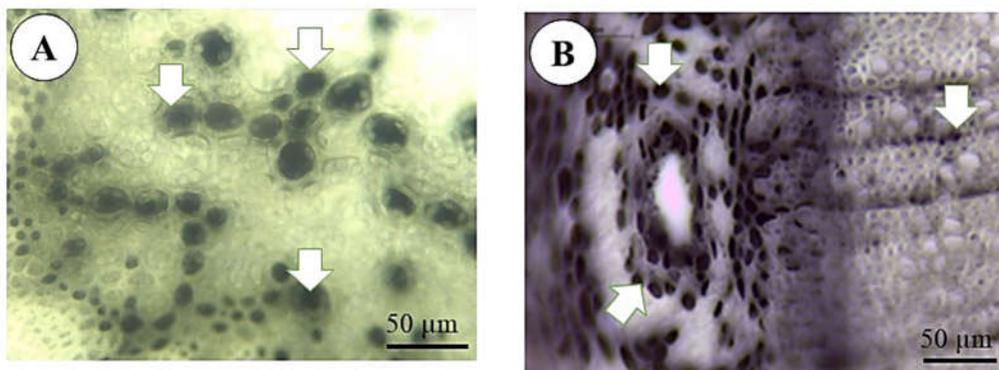


Figura 13. Fenoles totales detectados (flechas) en tallos de *Schinus polygama*. **A:** por reacción con cloruro de hierro III en cortes a mano alzada de la médula del tallo. **B:** con formalina-sulfato de hierro III en muestras embebidas en PEG 6000.

2.10.5. Detección de ligninas

2.10.5.1. Por reacción con floroglucinol acidificado (reactivo de Wiesner)

(Johansen 1940)

Procedimiento

- Colocar los cortes en solución etanólica de floroglucinol y añadir 1 o 2 gotas de ácido clorhídrico al 25% por 5 min.
- Montar en ácido clorhídrico al 25%. Observar rápido porque la reacción es efímera.

Resultado: las ligninas se tiñen de rosado (Fig. 14 A-B)

2.10.5.2. Por reacción con reactivo de Maule (Patten et al. 2007)

Procedimiento

- Colocar los cortes en solución de permanganato de potasio (1%) por 5 min.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar en solución con ácido clorhídrico 10% hasta que las secciones se tornen marrón o café, aproximadamente por 5 a 10 min.
- Lavar dos veces con agua destilada.
- Montar en amonio concentrado.

Resultado: la lignina se tiñe de rojo, anaranjado o café (Fig. 14 C).

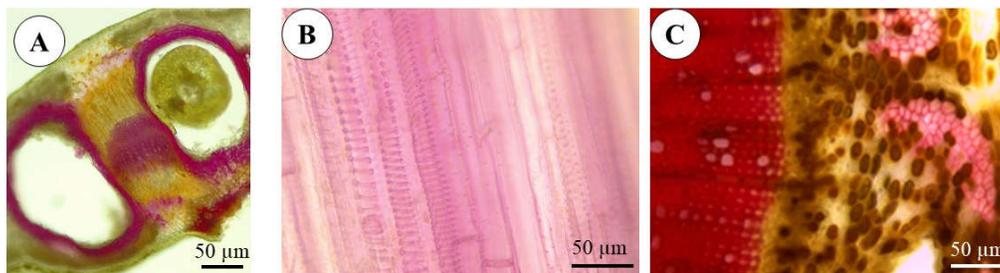


Figura 14. Detección de ligninas por reacción con reactivo de Wiesner (A-B) y reactivo de Maule (C). **A:** en agallas de *Ophelimus migdanorum* inducidas en el nervio central de una hoja de *Eucalyptus globulus*. Obsérvese también detección de ligninas en fibras perivasculares y elementos del xilema. **B:** en traqueidas helicoidales de hojas de *Ulex europaeus*. **C:** en tallos de *Schinus polygama* embebidos en PEG 6000.

2.10.6. Detección de terpenoides por reacción con reactivo de NADI (David y Carde 1964)

Procedimiento

- Colocar los cortes en el reactivo de NADI (α -naftol 1%, dimetil-p-fenilendiamina en buffer fosfato 0.01 M a pH 7.2) por aproximadamente 1 h en total oscuridad.
- Lavar en agua destilada.
- Montar en agua o gelatina glicerizada.

Resultado: los terpenos se tiñen de azul (aceites esenciales) a rojo (oleorresinas) o adquieren color violeta púrpura cuando hay una mezcla de aceites esenciales con oleorresinas (Fig. 15).

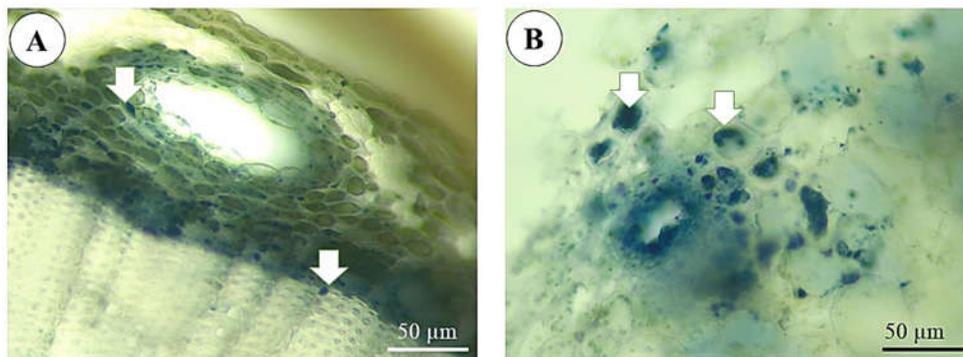


Figura 15. Detección de terpenoides por reacción con NADI en cortes a mano alzada. A: en tallos de *Schinus polygama*. B: en agallas de *Andescecidium parrai* inducidas en yemas de *S. polygama*.

2.10.7. Detección de alcaloides

2.10.7.1. Por reacción con reactivo de Dragendorff (Yolder y Mahlberg 1976)

Procedimiento

- Colocar los cortes en reactivo de Dragendorff entre 5 a 15 min.
- Lavar en agua destilada.
- Montar en agua o gelatina glicerizada. Observar rápidamente porque la reacción es efímera.

Resultado: los alcaloides se colorean de castaño (Fig. 16).

2.10.7.2. Por reacción con reactivo de Dittmar (Furr y Mahlberg 1981)

Procedimiento

- Colocar los cortes en solución de yoduro de potasio y yodo por 5 a 10 min.
- Montar en agua o gelatina glicerizada. Observar rápidamente porque la reacción es efímera.

Resultado: los alcaloides se colorean de castaño rojizo (Fig. 16).

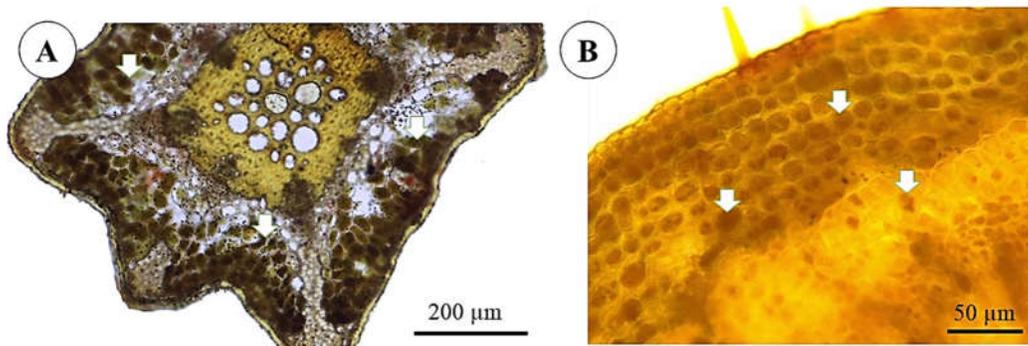


Figura 16. Detección de alcaloides (flechas blancas) en cortes a mano alzada. **A:** en tallos de *Ulex europaeus* con reactivo de Dragendorff. **B:** en tallos de *Nothofagus obliqua* con reactivo de Dittmar.

2.11. Programas para mediciones citohistológicas

Las mediciones espaciales (longitud, espesor, área, diámetro, etc.) de estructuras microscópicas (micrometría) son muy frecuentes y útiles en la investigación científica. Usualmente, las imágenes adquiridas con cámaras digitales se transfieren a una computadora, y las mediciones se realizan con ayuda de programas analizadores de imágenes. Existen varios programas para el procesamiento y análisis de imágenes, entre los más usados están el Image-J (Research Services Branch del National Institute of Mental Health) y AxioVision (CarlZeiss MicroImaging, Jena, Germany). Ambos programas son de acceso gratis. Los mismos cuentan con herramientas que permiten realizar diferentes mediciones (Fig. 15). La interfaz de ambos programas es sencilla y fácil de usar, además de algunos tutoriales que se pueden consultar en la plataforma YouTube. Pero obtener mediciones fidedignas es crucial que las imágenes cuenten con una escala. Las escalas son únicas para cada microscopio, por lo que si cambiamos de microscopio, se debe asignar la escala correspondiente.

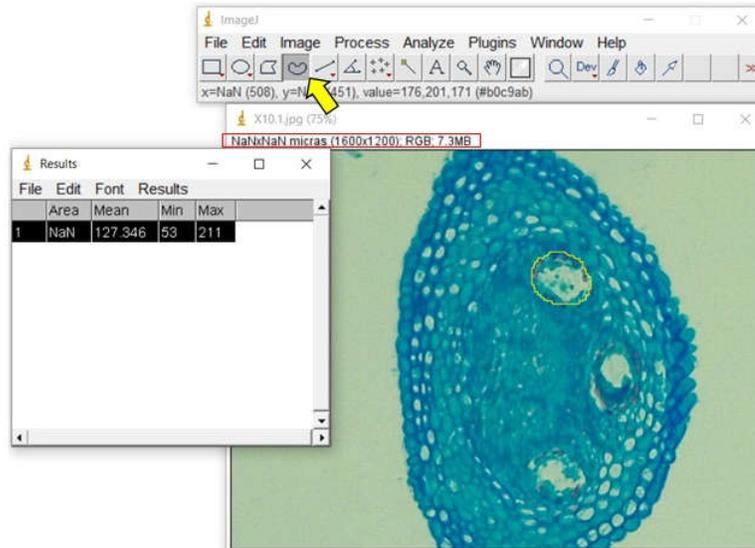


Figura 17. Interfaz del Programa Image-J (centro superior), acompañada de una imagen de peciolo de *Schinus polygama*. Nótese el círculo amarillo que indica la medición del diámetro de un canal resinífero con la herramienta selección a mano alzada (flecha). La imagen de la izquierda muestra el resultado con el valor de la medición (Área). Para la medición se asignó una escala (recuadro rojo) obtenida con el microscopio donde se tomó la fotomicrografía.

2.12. Preparación de soluciones

A. Solución de azul de bromofenol (para 25 ml)

Cloruro de mercurio 1%: 0,25 g
 Azul de bromofenol 0,05%: 0,0125 g
 Ácido acético 2%: 0,5 ml
 Agua destilada: 25 ml

B. Solución etanólica de cloruro férrico (para 100 ml)

Cloruro de hierro III: 2 g
 Etanol 95%: 100 ml

C. Reactivo de Dragendorff (para 100 ml)

Nitrato de bismuto: 8 g
 Ácido nítrico: 20 ml
 Yoduro de potasio: 22.7 g
 Agua destilada: 100 ml

Preparación: disolver el nitrato de bismuto en el ácido nítrico, añadir el yoduro de potasio disuelto en un 50 ml, completar hasta 100 ml con agua destilada.

D. Reactivo de Wiesner (para 100 ml)

Floroglucinol: 1 g
Etanol 95%: 100 ml
Ácido clorhídrico: 2,5 ml
Agua destilada: 10 ml

E. Reactivo Lugol (para 100 ml)

Yoduro de potasio: 1,5 g
Yodo: 0,3 g
Agua destilada: 100 ml

F. Reactivo de NADI

Solución A

Alfa-naftol: 0,01 g
Etanol 4%: 1 ml

Solución B

N, N-dimetil-1-naftilamina 1%: 0,01 g
Agua destilada: 1 ml

Solución C

Tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7,2
Mezclar soluciones A, B y C a razón de 1:1:98

Las soluciones se mantienen por separadas y solo se mezclan al momento de realizar la prueba. Se deben colocar en frascos oscuros o cubiertos con papel de aluminio y mantener en congelación hasta momentos previos a su uso.

G. Solución de sudan (para 25 ml)

Sudan (III, IV, black, red): 0,125 g
Etanol 70%: 25 ml

Preparación: disolver en agitación el sudan en el etanol disolver en agitación. Filtrar en fibra de vidrio.

H. Reactivo Maüle

Solución 1

Permanganato de potasio: 0,25 g
Agua destilada: 25 ml

Solución 2

Ácido clorhídrico 10%: 7,8 ml

Agua destilada: hasta completar 25 ml

Solución 3

Hidróxido de amonio concentrado

I. Reactivo de Dittmar (Furr y Mahlberg 1981)

Yoduro de potasio: 1 g

Nitrato de sodio: 1 g

Agua: 30 ml

Ácido clorhídrico: 30 ml

Preparación: añadir el ácido clorhídrico al final.

J. Fijador Formaldehído: Ácido acético: Alcohol etílico (FAA) (1:1:18)

Formaldehído 37%: 5 ml

Ácido Acético p.a: 5 ml

Etanol 70% o 50%: 90 ml

Preparación: añadir los reactivos en ese mismo orden.

K. Solución de Karnovsky 4%

-Glutaraldehído 2,5%: disolver 2,0 ml de glutaraldehído 25% en 24 ml de tampón fosfato 0,02 M, pH 7,2, adicionar 24 ml de agua destilada.

-Formaldehído 4,0%: disolver 0,8 g de paraformaldehído en 20 ml de agua destilada y añadir de 1 a 3 gotas de hidróxido de sodio al 40%.

Observaciones: Colocar en el agitador magnético a 65°C, 15 ml de agua destilada y añadir el paraformaldehído. Mantener en agitación hasta que se disuelva y añadir las gotas de NaOH para que aclare la solución. Después de frío, completar con agua destilada hasta los 20 ml.

-Hidróxido de sodio 40%: disolver 4 g de NaOH en 10 ml de agua destilada.

Observación: agregue el NaOH de a poco en 8 ml de agua, no debe invertir el orden, y complete hasta 10 ml.

-Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,2:

Solución A: Fosfato de sodio monobásico monohidratado: 2,76 g en 100 ml de agua destilada.

Solución B: Fosfato de sodio dibásico heptahidratado: 5,37 g en 100 ml de agua destilada.

L. Adesivo de Haupt o gelatina glicerinada

Gelatina: 1g

Fenol: 2 g

Glicerina: 15 ml

Agua destilada hasta: 100ml

Observación: disolver la gelatina en agua fría, calentar en el microondas hasta que quede homogéneo.

M. Safranina- azul de Astra (safra-blue) 0,5%

Safranina: 0,05 g
Azul de Astra: 0,45 g
Agua destilada: 100 ml

N. Azul de Astra 1%

Azul de Astra: 1,0 g
Agua destilada: 100 ml
Preparación: disolver el colorante en agua y filtrar en lana de vidrio.

O. Safranina 1%

Safranina: 0,1 g
Agua destilada: 10 ml

P. Solución de PEG 6000 al 25%

PEG 6000: 25 g
Agua destilada: 100 ml
Preparación: se prepara en plancha calefactora para facilitar la disolución del PEG.

Q. Solución de Azul alción

Azul alción: 1 g
Agua destilada: 97 ml
Ácido acético glacial: 3 ml
Preparación: dejar en agitación al menos una hora y posteriormente filtrar.
Se puede usar durante varios años.

R. Solución de safranina etanólica

Safranina: 1 g
Alcohol etílico 50º: 100 ml

S. Verde rápido:

Verde rápido: 1 g
Alcohol etílico 100º: 50 ml
Esencia de clavo: 50 ml

III. Referencias

- Brundrett, M. C., Kendrick, B., & Peterson, C. A. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(3), 111-116.
- Bukatsch, F. (1972). Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. *Mikrokosmos*, 61(8), 255.
- David, R., & Carde, J. P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif nadi. *CR Acad Sci Paris*, 258, 1338-1340.
- Ferreira, B. G., Falcioni, R., Guedes, L. M., Avritzer, S. C., Antunes, W. C., Souza, L. A., & Isaias, R. M. (2017). Preventing false negatives for histochemical detection of phenolics and lignins in PEG-embedded plant tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65(2), 105-116.
- Ferreira, B. G., Teixeira, C. T., & Isaias, R. M. (2014). Efficiency of the polyethylene-glycol (PEG) embedding medium for plant histochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(8), 577-583.
- Furr, M., & Mahlberg, P. G. (1981). Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 44(2), 153-159.
- Haupt, A.W. (1930). A gelatin fixative for paraffin sections. *Stain Technology*, 5(3), 97-98.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London.
- Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 27, 137-138.
- Kraus J, Arduin M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica, RJ, EDUR. 198 pp.
- Luque, R., Sousa, H. C. D., & Kraus, J. E. (1996). Métodos de coloração de Roeser (1972): modificado-e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcão 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica*, 10, 199-212.
- Mazia, D., Brewer, P. A., & Alfert, M. (1953). The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *The Biological Bulletin*, 104(1), 57-67.
- Patten, A. M., Jourdes, M., Brown, E. E., Laborie, M. P., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2007). Reaction tissue formation and stem tensile modulus properties in wild-

type and p-coumarate-3-hydroxylase downregulated lines of alfalfa, *Medicago sativa* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 94(6), 912-925.

Yeung, E.C.T., Stasolla, C., Sumner, M.J., & Huang, B.Q. (Eds.). (2015). *Plant microtechniques and protocols*. Switzerland: Springer International Publishing.

Yoder, L. R., & Mahlberg, P. G. (1976). Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63(9), 1167-1173.

GLOSARIO

Adhesivo: cualquier sustancia que permita adherir las secciones anatómicas a un portaobjeto.

Autolisis: proceso mediante el cual la célula se autodestruye, también se denomina autodigestión.

Buffer: sustancia o mezcla de sustancia en solución que evita los cambios de pH.

Deshidratación: proceso de eliminar el agua de las células vegetales.

Fijadores: son moléculas o mezclas de moléculas en solución que se usan para preservar las características tisulares lo más parecido posible a su estado vivo.

Histoquímica: técnicas de tinción que implican la modificación química de algunas moléculas tisulares para posteriormente ponerlas de manifiesto con colorantes.

Inclusión: consiste en infiltrar una muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar a las características del tejido.

Lignificación: deposición de lignina en las paredes celulares de las plantas que le proporciona fuerza mecánica a los tejidos vegetales.

Meristemos: grupos de células indiferenciadas responsables del crecimiento permanente de las plantas debido a que tienen una alta capacidad de división celular y posteriormente pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares.

Micras (μm): medida longitudinal equivalente a una milésima parte de un milímetro.

Microscopía: conjunto de teorías y técnica relacionadas con el uso de microscopios que permiten visualizar objetos no visibles al ojo humano.

Micrótom: es un equipo mecánico de precisión que se utiliza para realizar cortes en tejidos que han sido incluidos en parafina o polietilenglicol, obteniéndose secciones de espesor micrométrico para que sean visibles en el microscopio.

Paraplast: mezcla refinada de parafinas muy purificadas que contienen polímeros plásticos de peso molecular regulado utilizado para infiltración de los tejidos y obtener cortes de alta calidad con una mínima compresión.

Tinción: proceso de coloreado de cortes histológicos a través de sustancias coloreadas que se unen a componentes tisulares por afinidad electroquímica.

Agradecimientos: este manual fue apoyado por el Proyecto E21-002 de la Dirección de Docencia de la Universidad de Concepción y por el Proyecto Fondecyt Iniciación 11200360.