

## **MONOGRAFÍA**

### **LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS COMO BASE PARA LA INTERPRETACIÓN DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS EN LAS PLANTAS.**

**Autores: Silvia Alemán García, Leticia Fuentes, Amalia Domínguez Suárez, Yunel Pérez Hernández.**

Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas.

#### **INTRODUCCION:**

El conocimiento anatómico de las plantas es importante porque sus funciones están relacionadas con su estructura y permite tener una mejor capacidad para evaluar su funcionamiento (Herrera-Flores et al., 2005). Para esto es necesario el uso de las técnicas histológicas, definiéndose estas como el conjunto de operaciones a las que se somete una materia organizada, a fin de posibilitar su estudio al microscopio.

El examen al microscopio se hace generalmente por luz transmitida, lo que significa que la luz debe "atravesar" el objeto a examinar para llegar, después de haber pasado por las distintas lentes del microscopio, a impresionar a nuestro órgano visual, por lo que el material vegetal, debe ser reducido a láminas muy delgadas y transparentes (Aimale y Gatti, 2007).

Una de las principales herramientas para el estudio de la célula es el microscopio óptico. En general las células y tejidos vivos son difíciles de estudiar, se pueden realizar estudios de tejidos, realizando cortes a mano alzada con una hojilla bien afilada y haciendo observaciones con el microscopio óptico, previo montaje de la muestra sobre un porta objeto de vidrio, con una gota de agua y cubriendo con un vidrio cubre objeto (Anon<sup>a</sup>, 2006).

La histología vegetal propicia la descripción, con los términos adecuados, de las estructuras vistas a través de microscopios, y su identificación, además del establecimiento de una posible relación entre sus características morfológicas y su función, los métodos de estudio de células y tejidos, procesamiento de muestras para su estudio microscópico-óptico y microscópico-electrónico, el fundamento de las técnicas histoquímicas, la preparación de las muestras para la observación al microscopio óptico, son entre otros los aspectos que se abordan en esta monografía.

El presente trabajo tiene como objetivo valorar la utilidad de los estudios histológicos para la caracterización morfológica y la evaluación de la respuesta fisiológica en las plantas.

## DESARROLLO:

### 1. Microscopía.

Los métodos de análisis microscópicos han sido y siguen siendo, de gran utilidad en el estudio de las estructuras y componentes celulares. El principio en que se basan todos los microscopios es similar: un primer juego de lentes forma una imagen real que se incrementa al observarse a través de un segundo juego de lentes. Mediante un sistema de lentes y fuentes de iluminación se puede hacer visible un objeto microscópico. Los microscopios pueden aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original (Mateo, 2007). El tamaño de la imagen resultará tanto mayor si la distancia focal del segundo juego de lentes se hace menor y si se aumenta la distancia entre ambos. Sin embargo lo más importante en microscopía no es lograr grandes aumentos sino imágenes resueltas, o sea con mayor resolución, lo cual está determinado por la calidad del juego de lentes objetivos (Peña y Saralegui, 1982).

La resolución se define como la distancia que puede existir entre dos puntos que se observan por separados, y está determinado por la difracción de las ondas a través de las cuales se observan los objetos. El poder de resolución de un microscopio es por tanto la capacidad de éste para resolver dos puntos separados una distancia dada, cuanto mayor sea el poder resolutivo, mayor será la definición de un objeto. Los microscopios de gran poder resolutivo son especialmente buenos para ver pequeñas estructuras. El poder resolutivo de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda utilizada y de una propiedad óptica de la lente conocida como apertura numérica. Como los microscopios ópticos utilizan luz visible, la longitud de onda está fijada y es por lo que la resolución de un objeto es función de la apertura numérica; cuanto mayor sea la apertura, el objeto resuelto será más pequeño, como se refleja en la fórmula matemática siguiente:

$$d = \frac{0.5 \lambda}{N \sin a}$$

d: poder resolutivo;  $\lambda$ : longitud de onda; a: mitad del ángulo de la lente objetivo; N: índice de refracción del medio; N sen a: apertura numérica.

Un factor que afecta a la apertura numérica, además de la construcción de la lente, es el medio a través del cual pasa la luz. Mientras que el objetivo esté separado del objeto por el aire, su apertura numérica nunca será mayor de 1,0; para conseguir aperturas numéricas mayores que ésta, el objetivo debe estar inmerso en un líquido de mayor índice de refracción que el aire. A estos líquidos se les denomina aceites de inmersión que se utilizan con los objetivos de inmersión obteniendo una apertura numérica entre 1,2 y 1,4. Aún así, al utilizarse la luz visible (longitud de onda) estos microscopios llegan a tener un poder de resolución de aproximadamente 0,25  $\mu\text{m}$ , lo que significa que las partículas con un tamaño más pequeño de 0,25  $\mu\text{m}$  no pueden distinguirse unas de otras (Mateo, 2007).

## **1.1 Microscopio Óptico.**

El tipo de microscopio más utilizado es el microscopio óptico, que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de las 2.000 veces.

El equipamiento adicional de un microscopio consta de un armazón con un soporte que sostiene el material examinado y de un mecanismo que permite acercar y alejar el tubo para enfocar la muestra. Los especímenes o muestras que se examinan con un microscopio son transparentes y se observan con una luz que los atraviesa, y se suelen colocar sobre un rectángulo fino de vidrio. El soporte tiene un orificio por el que pasa la luz. Bajo el soporte se encuentra un espejo que refleja la luz para que atraviese el espécimen. El microscopio puede contar con una fuente de luz eléctrica que dirige la luz a través de la muestra.

Los MO actuales tiene un poder resolutivo de  $0,2 \mu\text{m}$ , (Anon, 2007) unas mil veces la del ojo humano. Existen distintas variantes de observación en MO.

**1.1.2 Microscopía óptica normal:** (de campo brillante coloreado): usa como fuente de luz directa bien una bombilla bien la luz solar, el material a observar se colorea con colorantes específicos que aumentan el contraste y revelan detalles que no aprecian de otra manera.

**1.1.3 Microscopía de campo brillante:** el material se observa sin coloración. La luz pasa directamente y se aprecian detalles que estén naturalmente coloreados.

**1.1.4 El microscopía de campo oscuro:** utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras del espécimen aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal, para ello utiliza un condensador y objetivo especial que iluminan el espécimen en la muestra frente a un fondo oscuro.

**1.1.5 Microscopía de contraste de fase:** es un microscopio óptico modificado que permite contrastar sustancias de diferente grosor o densidad. Mediante un condensador y un objetivo especial se controla la iluminación de tal manera que vaya en diferentes rutas a través de las distintas partes de una célula, se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin colorear. Es ideal para especímenes delgados, o células aisladas. El microscopio de fase ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo en el microscopio de fase el cono de luz es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de

un espécimen transparente, haciéndolo visible. Este tipo de microscopio es muy útil a la hora de examinar tejidos vivos, por lo que se utiliza con frecuencia en biología.

**1.1.6 Microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) (Nomarski)** Utiliza dos rayos de luz polarizada y las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado. Fue diseñado para observar relieves de especímenes muy difíciles de manejar, es muy utilizado en los tratamientos de fertilización in-vitro actuales. DIC se usa cuando el espécimen es muy grueso para usar contraste de fases.

## 1.2 El Microscopio Electrónico

El microscopio electrónico utiliza un flujo de electrones en lugar de luz. Consta fundamentalmente de un tubo de rayos catódicos, en el cual debe mantenerse el vacío. El cátodo está constituido por un filamento de tungsteno, que al calentarse eléctricamente emite los electrones, los cuales son atraídos hacia el ánodo por una diferencia de potencial de 50.000 a 100.000 voltios. La lente del condensador enfoca este haz y lo dirige hacia el objeto que se observa, cuya preparación exige técnicas especiales. Los electrones chocan contra la preparación, sobre la cual se desvían de manera desigual.

Con el objetivo se enfoca la imagen, que es ampliada por la lente de proyección. Para variar los aumentos en el microscopio electrónico basta variar la distancia focal de la lente proyectora.

Como los electrones no impresionan la retina del ojo humano, debe recogerse la imagen del microscopio electrónico en una pantalla fluorescente, la cual posee una superficie impregnada con fósforo o sulfuro de cinc. La imagen obtenida en esta pantalla puede fotografiarse.

Se acostumbra utilizar el término microfotografías para las fotografías tomadas a través del microscopio óptico y micrografía o electromicrografía para las que se toman en el microscopio electrónico.

Los aumentos máximos conseguidos en el microscopio electrónico son del orden de 2.000.000 (¡dos millones de aumento!) mediante el acoplamiento al microscopio electrónico de un amplificador de imagen y una cámara de televisión. En resumen, el microscopio electrónico consta esencialmente de:

- a. Un filamento de tungsteno (cátodo) que emite electrones.
- b. Condensador o lente electromagnética, que concentra el haz de electrones.
- c. Objetivo o lente electromagnética, que amplía el cono de proyección del haz de luz.
- d. Ocular o lente electromagnética, que aumenta la imagen.
- e. Proyector o lente proyectora, que amplía la imagen.
- f. Pantalla fluorescente, que recoge la imagen para hacerla visible al ojo humano.

Existen varios tipos de microscopios electrónicos, que cada día se perfeccionan más.

**1.2.1 El microscopio electrónico de transmisión:** utiliza un haz de electrones acelerados por un alto voltaje (cien mil voltios). Este haz ilumina una sección muy fina de la muestra, sean tejidos, células u otro material.

**1.2.2 El microscopio electrónico de barrido:** utiliza para el estudio de la morfología y la topografía de los elementos. Estos instrumentos utilizan voltajes cercanos a los 20.000 voltios. Las lentes magnéticas utilizan un haz muy fino de electrones para penetrar repetidamente la muestra, y se produce una imagen ampliada de la superficie observada en la pantalla de un monitor.

**1.2.3 El microscopio electrónico mixto:** tiene propiedades comunes con el de transmisión y con el de barrido y resulta muy útil para ciertas investigaciones. Hay otros microscopios analíticos que detectan señales características de los elementos que constituyen la muestra.

Con estos poderosos instrumentos, que utilizan el flujo de electrones y las radiaciones electromagnéticas así como la aplicación de técnicas histoquímicas y bioquímicas, además del empleo de marcadores radiactivos, se han logrado grandes avances en la biología celular.

### **1.3 Mediciones Microscópicas.**

Muchas veces interesa al observador conocer el tamaño real de los objetos o microorganismos que está observando a través del microscopio (Wikipedia, 2006). Para estas mediciones pueden utilizarse varios métodos:

#### **Método de los micrómetros:**

Se utiliza para esto un micrómetro de platina o de objetivo, que consiste en un portaobjetos en cuyo centro se halla una escala graduada (de 2 mm de longitud), con separaciones, entre cada división, de una centésima de milímetro. Además se utiliza un micrómetro ocular que lleva una escala graduada en décimas de milímetros. Se coloca el micrómetro objetivo sobre la platina y se enfoca el microscopio hasta que las líneas de la escala graduada aparezcan nítidas. Luego se hace superponer la escala del ocular y se toma como referencia las primeras divisiones en que una línea del micrómetro objetivo y una línea del micrómetro ocular coincidan o se superpongan exactamente. Luego, por simple regla de tres, se calcula el valor en micras de cada división ocular. Veamos un ejemplo. Si 9 divisiones del micrómetro objetivo (0,09mm) equivalen a 30 divisiones del micrómetro ocular, cada división del ocular equivaldrá a:

$$\frac{0,09}{30} = 0,003 \text{ mm} = 3 \text{ micras}$$

Quiere decir que para el objetivo calibrado y el ocular utilizado, cada división del micrómetro ocular equivale a 3 micras. Una vez obtenido este dato para cada objetivo en la forma que hemos expuesto, teniendo el microscopio ocular podrían hacerse todas las mediciones que se deseen. Para medir, por ejemplo, una célula de una preparación, procedemos así: haremos coincidir los extremos de la célula con las divisiones del micrómetro ocular. Si la longitud del organismo es de 75 divisiones del micrómetro ocular, y cada división equivale a 3 micras, la longitud de la célula será  $75 \times 3 = 225$

mieras. También se pueden efectuar mediciones en el microscopio con cámara clara y utilizando una regla. En realidad, estas medidas no son tan exactas como cuando se utilizan micrómetros por errores que se introducen superponiendo imágenes.

### **1.3 Microfotografía Digital.**

Se pueden hacer microfotografías utilizando un microscopio o estereo-microscopio y una sencilla cámara digital de bajo coste. Incluso una webcam puede servir. Lo único que hay que hacer es enfocar el microscopio y colocar el objetivo de la cámara directamente sobre el ocular, estando la cámara en el modo "primeros planos". Usando la pantalla CCD de la cámara para encuadrar, no queda más que disparar (Anon<sup>b</sup>, 2006).

Otro método descrito (Arce F. P., et. al 2001) empleado microscopios Olympus y Nikon. La cámara utilizada ha sido una Coolpix 990 de Nikon (resolución 3,34 Megapixels). El método consiste en fotografiar a través del ocular del microscopio, sin elementos interpuestos, con la cámara en posición "macro" sin flash, dejando que el automatismo de la cámara haga el resto. Para todos los aumentos, los resultados de este método son excelentes. Las precauciones para obtener fotos correctas a baja magnificación (las más complicadas) son mínimas, consistiendo generalmente en el aumento de la intensidad de luz. Pocas tomas requieren alguna forma de tratamiento de mejora digital (fácilmente realizable a través del soporte lógico (software suministrado con la cámara), pudiendo incorporarse las fotografías a diapositivas y incluso enviarse para publicación en forma de impresiones en papel con calidad más que suficiente.

El resultado final dependerá de factores como la calidad de los sistemas ópticos empleados, la fuente luminosa o el sensor CCD de la cámara. Así, las posibilidades finales de las imágenes obtenidas serán más amplias si utilizamos sistemas de captura por encima de 1,2 Megapíxeles pudiendo entonces plantearnos incluso la reproducción en papel. Si el destino es la Web, las imágenes obtenidas deberán "pesar" menos y en consecuencia, de necesitan resoluciones menores. En cualquier caso, un programa de retoque fotográfico, del estilo de PhotoShop, FireWorks, PhotoPaint, Illustratos o PaintShopPro, se hace imprescindible.

#### **1.3.1 Procesamiento y análisis de imagen**

Es de vital importancia tener un excelente material histológico con una adecuada tinción que resalte las estructuras de interés, lo cual facilitará el procesamiento de la imagen y optimizará los resultados (Userpater et. al 2003). Todos estos puntos deben ser verificados adecuadamente y la vigilancia en el control de su calidad contribuye a la "calidad total" de un archivo de imagen digital.

### **1.3.1.2 Captura de la imagen**

El proceso comienza con la ubicación de la imagen histológica ideal en el microscopio, para luego corregir luz y foco requeridos, capturarla con una cámara digital, en color o en escala de grises, y guardarla como archivo de imagen en el disco duro de la computadora. Es recomendable tener un back up o una copia en CD de los archivos. También la imagen puede ser adquirida desde video, scanner, CD de fotos y colecciones de imágenes guardadas en base de datos.

### **1.3.1.3 Procesamiento de la imagen**

La utilización de igualadores, substracción de fondos, corrección y aplanamiento de campos, son algunas de las opciones que se aplican para reducir las irregularidades de la imagen, y para retocar color, brillo o contraste. El uso de filtros permite endurecer o suavizar, distorsionar o realzar bordes de la imagen. También se puede separar objetos contiguos o sobrepuestos y otras operaciones morfométricas. Los materiales deben digitalizarse con niveles de luz, aumento y longitud focal, predeterminados; de la misma forma que cualquier otro parámetro que pueda hacer variar la calidad o el aspecto final de la imagen. Posteriormente, una vez obtenida la imagen con el analizador, se deben ajustar los parámetros de contraste, brillo y corrección gamma (parámetro de iluminación), así como la aplicación de filtros o alguna de las aplicaciones anteriormente mencionadas, dependiendo de los requerimientos de la imagen a analizar, de los objetivos del protocolo y del investigador.

### **1.3.4 Medición**

El análisis puede ser de campo completo simultáneamente o de áreas de interés individuales o múltiples. Una vez realizados los ajustes mencionados en el párrafo anterior, se procede a marcar el sector o la estructura a estudiar utilizando una herramienta del analizador "área de interés".

El siguiente paso es codificar en grupo/s las estructuras previamente seleccionadas según color o tono de grises para una rápida identificación, clasificación y verificación.

Paso seguido, se procede al conteo automatizado de las áreas identificadas. Ejemplos de las estructuras que pueden ser medidas: área mesófilo de la hoja, área parénquima clorofílico (empalizada o esponjoso), área vascular, núcleos celulares. Estas estructuras pueden ser marcadas con distintas técnicas de tinción que incluyen: Hematoxilina-Eosina, Azul de metilo, Azul de toluidina, etc.

## **1.4 Preparaciones Microscópicas**

La realización de buenas preparaciones microscópicas es indispensable para el estudio anatómico de los diferentes órganos y estructuras vegetales y ello depende de la

calidad de los cortes o secciones histológicas, de los procesos de tinción y de montaje, además de los procesos previos de muerte y fijación del material vegetal.

Las preparaciones microscópicas se utilizan con fines docentes e investigativos y en ambos casos en ocasiones la observación que se pretende realizar es exploratoria, como por ejemplo cuando se desea obtener información solamente sobre la disposición de los diferentes tejidos que forman una hoja determinada y es por ello que los cortes pueden ser más o menos finos siempre y cuando se dejen atravesar por la luz y no es necesaria la tensión y el montaje.

Si por el contrario la observación es más profunda, y se van a tener en cuenta aspectos cuantitativos y cualitativos, como presencia de pelos, número de células que los forman, grosor de la cutícula, etc., mientras más finos sean los cortes y más apropiados los procesos de tinción y montaje, mayor y mejor será la información obtenida (Peña, E. and Saralegui, H. 1982).

### **1.4.1 Pasos de las Preparaciones microscópicas**

#### **1.4.1.1 Fijación**

La fijación tiene por objeto matar las células y conservarlas, hasta donde sea posible, en el estado en que se encontraban durante la vida. Por lo tanto es un método histológico destinado a obtener preparados duraderos que conservan la estructura morfológica y química de las células y tejidos al estado vivo y que permite realizar, posteriormente, los procedimientos de coloración o de identificación que facilitan el completo conocimiento de su constitución íntima. Se llaman fijadores a las sustancias químicas o a los agentes físicos que se utilizan para tal fin.

Cualidades que debe tener un fijador:

1. Actuar con rapidez, matando y fijando a las células antes de que aparezcan los fenómenos agónicos o post-mortem (autólisis, desintegración, etc.).
2. Poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta hasta en las capas profundas de la pieza a fijar.
3. Conservar, en lo posible, los detalles estructurales que presentaban in vivo.
4. Permitir o favorecer el empleo de los procedimientos necesarios para su observación ulterior (ejecución de cortes, coloración, etc.).
5. Impedir la desaparición de los elementos solubles durante la fijación o después de ella.
6. No provocar o impedir la producción de estructuras artificiales.
7. No retraer excesivamente los tejidos ni volverlos friables o quebradizos.



## Manera de actuar de los fijadores

Varía con la composición o naturaleza de los mismos: coagulando las proteínas sin combinarse con ellas (alcohol, ácido pícrico, yodo, calor), formando combinaciones químicas con las sustancias orgánicas (ácido crómico y sus sales), o reduciéndose en contacto con las mismas y originando en su seno un precipitado sumamente fino (ácido ósmico, bicloruro de mercurio, cloruro de oro). La mayor parte de los fijadores actúan como oxidantes, favoreciendo así la coloración ulterior de los tejidos (recuérdese que éstos, en su mayoría, son reductores que muchos colorantes se transforman en leucobases incoloras al combinar una molécula de hidrógeno con su cromóforo).

## Fijadores químicos

Son los más utilizados; pueden ser fijadores simples, constituidos por una sola sustancia química, y fijadores compuestos o mezclas fijadoras cuando varias sustancias intervienen en su constitución.

### Fijadores Simples:

a) Formol al 10%, es el más usado. Su empleo es aconsejable en todos los casos en que no se disponga de un fijador especial, principalmente cuando se trata de fijar órganos o tejidos para estudios histológicos topográficos.

b) Alcohol etílico absoluto o de 96%, se usa generalmente en microquímica.

c) Alcohol metílico, se lo emplea con frecuencia para fijar frotis desecados (sangre, médula ósea, ganglio, bazo, líquidos de punción, etc.).

d) Ácido ósmico al 1 ó 2%, es poco penetrante pero enérgico, conserva muy bien estructuras celulares.

e) Bicromato de potasio al 3-5%.

### Fijadores Compuestos:

En su composición intervienen un número variable de fijadores simples racionalmente elegidos con el fin de completar la acción de cada uno de ellos o atenuar sus defectos.

a) Líquido de Fleming, mezcla cromo-osmio-acética.

b) Líquido de Zenker, mezcla bicromato-sublimado-acética.

c) Líquido de Helly, mezcla Zenker-formol.

d) Líquido de Bouin, mezcla picro-formos-acética.

e) Líquido de Duboscq-Brasil, o Bouin alcohólico.

Fijadores Físicos:

1. Deseccación.
2. Calor seco.
3. Calor húmedo.
4. Frío.
5. Congelación y desecación.

#### **1.4.1.2 Deshidratación**

Las piezas al ser retiradas del fijador, o después de haberlas lavado, están embebidas en agua; impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, debemos deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente.

Las piezas perfectamente deshidratadas se sumergen en el disolvente, xilol, no debe aparecer ninguna turbidez. Si se pone blanco-lechoso es que la deshidratación no ha sido bien lograda y debemos repetir el baño de alcohol absoluto cerciorándonos que realmente lo sea: una gota de alcohol agregada a unos ml de xilol no debe enturbiarlo.

#### **1.4.1.3 Inclusión**

Penetración de la parafina: Se sumergen las piezas en parafina (56-58° de punto de fusión), mantenida líquida en la estufa a no más de 62°C. Después de 1 a 2 horas se renueva la parafina.

Inclusión definitiva o formación del bloque: En moldes de papel o de metal (barras de Leuckart) se vierte la parafina fundida, del mismo punto de fusión de la que ha servido para la penetración. Se colocan las piezas orientándolas y luego se pone el molde en heladera.

#### **1.4.1.4 Realización de cortes microtómicos**

El objeto de la inclusión que hemos descrito anteriormente es hacer posible la reducción del tejido a cortes lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz para examinarlo al microscopio. Los micrótomos son instrumentos de gran

precisión que nos proporcionan cortes delgados parejos y de espesor graduable. Los cortes más corrientes son los de 4-6 micrones.

Consideraremos cuatro tipos de micrótomos: el de deslizamiento, el tipo Minot, el de congelación, y el crióstato o criótomo:

- Tipo deslizamiento: en este caso la pieza queda fija mientras la cuchilla se desliza por unas guías especiales merced a un soporte al que se sujeta la cuchilla con unos tornillos.

- Tipo Minot: en este caso la cuchilla queda fija y es la pieza la que se desliza sujeta a una platina, ésta se desliza verticalmente cuando se hace girar una manivela. Permite obtener cortes seriados en forma de cinta.

- Tipo congelación: se parece al de deslizamiento, pero la cuchilla o navaja, en lugar de deslizarse, gira sobre un eje. Por otra parte, el aparato se caracteriza por tener un sistema de congelación colocado debajo de la platina que utiliza la expansión brusca del anhídrido carbónico contenido en un cilindro con el cual se comunica.

- Crióstato: consta de un micrótomos tipo Minot incluido en una cámara de congelación. El volante de inercia que controla la realización del corte permanece en el exterior, mientras que la cuchilla y el mecanismo de avance están situados dentro de la cámara fría (normalmente a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Pese a la disposición horizontal de la cuchilla, la obtención de secciones seriadas es posible gracias a la existencia de un sistema anti-enrollamiento que obliga al corte a deslizarse sobre la superficie de la cuchilla. En los modelos más modernos es posible optar por el corte manual o motorizado, así como enfriar rápidamente la muestra a  $-60^{\circ}\text{C}$  gracias a la existencia de una placa de congelación instantánea. Frente al micrótomos convencional de congelación, el crióstato posee la gran ventaja de permitir la obtención de cortes mucho más delgados (por lo general de  $4\ \mu\text{m}$  y, en manos experimentadas, hasta  $2\ \mu\text{m}$ ).

Los cortes de parafina se extienden, al obtenerlos del micrótomos, en agua tibia contenida en un cristalizador. En esa misma agua se introducen portaobjetos, previamente desengrasados, cubiertos con una capa de adhesivo de Mayer y, con la ayuda de una aguja histológica, se colocan los cortes sobre el portaobjetos y a continuación se levanta.

#### **1.4.1.5 Coloración**

Luego de realizado el corte, se procede a rehidratarlo para permitir su coloración.

Colorantes: reciben esta denominación las sustancias que pueden conferir color a otros cuerpos.

Coloración: es el proceso mediante el cual un cuerpo es teñido por una sustancia colorante, sin perder el color cuando es lavado con el disolvente utilizado al preparar la solución colorante.

Clasificación de los colorantes:

Según su origen se clasifican en:

Colorantes Naturales:

- Animales (carmín)
- Vegetales (hematoxilina, orceína, azafrán)

Colorantes Artificiales O Sintéticos (Colores de Anilina):

- Ácidos: sales cuya base es incolora y su ácido es coloreado (eosina o eosinato de sodio). Son colorantes citoplasmáticos.
- Básicos: sales cuya base es coloreada y el ácido es incoloro (azul de metileno o clorhidrato de azul de metileno). Son colorantes nucleares.
- Neutros: sales en las que tanto el ácido como la base son coloreados. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro.
- Indiferentes: no forman sales. Tiñen aquellas sustancias que tienen un poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante (Sudán III, rojo escarlata).

Por otro lado, las coloraciones pueden ser:

- Ortocromáticas: los tejidos adquieren un color igual al de la solución colorante empleada.
- Metacromáticas: una sustancia o un componente celular se tiñe con un color diferente al del colorante empleado.

Métodos de coloración:

- Coloración directa: existe una verdadera afinidad entre el colorante y el objeto.
- Coloración indirecta: requiere la intervención de intermediarios o mordientes para que la coloración tenga lugar.
- Coloración progresiva: se hace actuar el colorante hasta que llegue a su punto óptimo.
- Coloración regresiva: se realiza primero una sobrecoloración y luego se elimina el resto del colorante por medio de diferenciadores. A este proceso se lo denomina diferenciación.

### **1.4.1.6 Montaje**

Luego de la coloración, se deshidrata el corte y se procede a la aclaración y montaje definitivo, dado que nos hemos propuesto hacer un preparado en condiciones de ser observado y protegido del ambiente para evitar su deterioro.

La deshidratación se realiza con alcoholes de graduaciones crecientes.

La aclaración se realiza con xilol o carboxilol. El objetivo de este paso es impregnar el corte con un disolvente del Bálsamo de Canadá, que al mismo tiempo le confiere un índice de refracción semejante al del vidrio.

Para el montaje se limpia el portaobjeto alrededor del corte y se deposita sobre el mismo una gota de Bálsamo de Canadá disuelto en xilol y se cubre con un cubreobjeto. Se deja secar unas horas antes de su observación al microscopio.

## **2. Caracterización anatómica en plantas mediante microscopía.**

Los estudios realizados por Robert Hooke en fragmentos de corcho, constituyeron los primeros pasos en el mundo de la Biología en general y de la Citología en particular, impulsando el desarrollo de técnicas que en un inicio, permitieron definir las características de células procariotas y eucariotas, diferenciar la célula vegetal de la animal, corroborar el papel de la célula como unidad morfofuncional de todos los seres vivos y el origen celular de toda célula a partir de la división de otra ya existente.

Desde el punto de vista fisiológico estos estudios han permitido llegar a comprender mejor los aspectos de la relación estructura función de determinados tejidos de la planta y su adaptación a las condiciones del medio, los mismos han permitido profundizar en aspectos citológicos de la reproducción y el desarrollo embrionario de las plantas.

### **2.1. Histología y Sistemática Vegetal.**

Las diferencias morfológicas entre los diferentes taxa vegetales, por ejemplo entre algas, coniferofitas y espermatofitas, y dentro de estas últimas entre Liliatas y magnoliatas, se corresponden con diferencias marcadas en su estructura interna que han permitido establecer patrones histológicos de diferenciación entre los mismos.

Más allá de la identificación de estos grupos con diferencias anatómicas y morfológicas tan marcadas, el desarrollo de estas técnicas ha facilitado el desarrollo de la Botánica Sistemática al establecer particularidades histológicas que permiten la identificación de géneros, especies y variedades.

El estudio histológico de los granos de polen ha conducido al surgimiento de una nueva ciencia denominada palinología, cuyos estudios han permitido la identificación de especies tanto desde el punto de vista taxonómico como de utilidad práctica para otras ramas como la medicina, la criminalística, entre otras.

### **2.2. La histología como técnica auxiliar para la Biotecnología.**

La propagación de plantas por métodos biotecnológicos parte del cultivo en condiciones *in vitro* de fragmentos vegetales que luego de desdiferenciarse, pueden regenerar órganos o plantas completas por diferentes vías: la organogénesis directa o indirecta (Gómez, 1998), la embriogénesis somática, entre otras. La definición y diferenciación

de estos patrones de regeneración en plantas, fue realizada mediante estudios histológicos que permitieron apreciar el desarrollo de tejidos vegetales a partir de un grupo celular como sucede en la organogénesis (fig. 1), así como la formación de un embrión con características y estadios celulares muy similares a la de uno cigótico en el proceso de embriogénesis somática (Fig. 2).

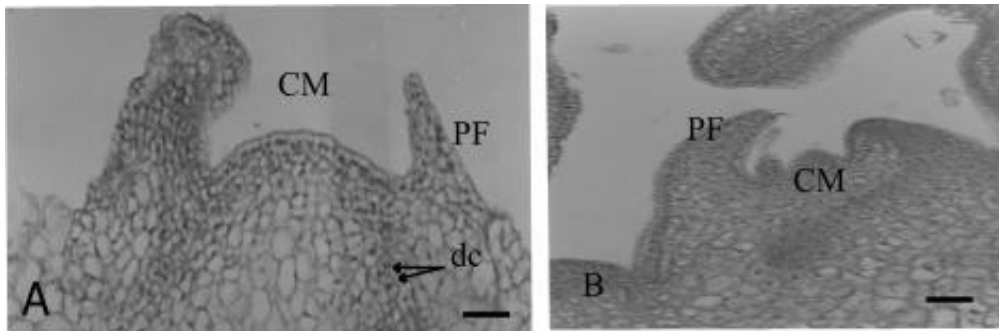


Fig. 1. Fotografía al microscopio óptico NIKON OPHITON (400 X) de cortes histológicos de fragmentos de callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, a los 25 días en medio de inducción donde se aprecia la formación del domo meristemático mediante proceso organogénico. A) Callo obtenido de hipocótilo. Barra inferior izquierda= 50  $\mu$ m 2. B) Callo obtenido de hojas verdaderas. Barra inferior izquierda= 100  $\mu$ m CM: cono meristemático, (PF) primordios foliares, dc: células en fase de división celular. (Fuentes et al. 2005).

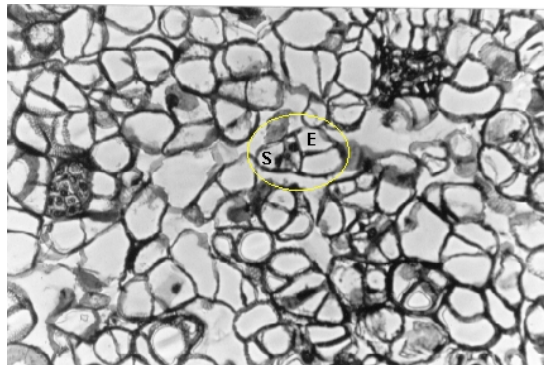


Fig. 2 Microfotografía Óptica Karl Zeiss 400X Células embriónicas polarizadas y en división. Formación de S (suspensor) y E (embrión).

Estudios realizados en el proceso embriogénico del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) evidenciaron claramente las diferentes fases de este proceso con las particularidades de las monocotiledóneas, en las que se desarrolla un embrión somático (Fig. 3) con las estructuras correspondientes a un embrión cigótico (Alemán et al 2003).

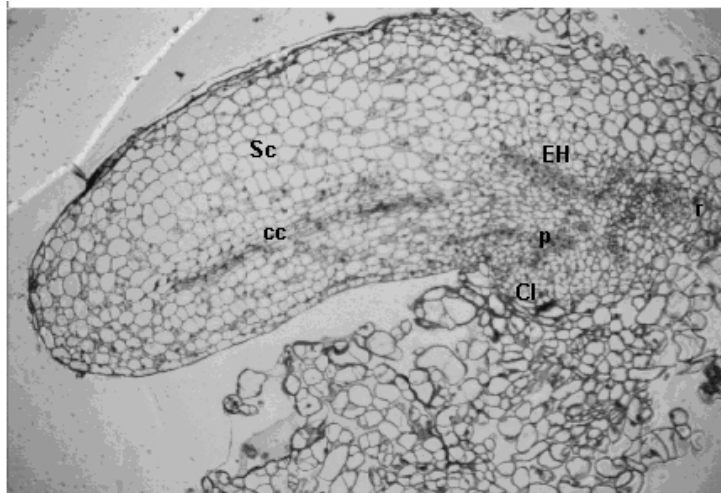


Fig. 3 **Microfotografía Óptica Karl Zeiss 400X** Corte longitudinal de un embrión de henequén. Sc (escutelum), Cl (coleóptilo), cc (cilindro cambial), EH (eje hipocótilo), p (plúmula), r (radícula).

### **2.3. La histología como herramienta para evaluar los cambios en las respuestas al estrés de las plantas.**

Existen especies que poseen características fisiológicas y morfológicas que les permiten sobrevivir y aún crecer en condiciones de estrés, el comportamiento de una especie resulta de la interacción entre ésta y el ambiente en el que se desarrolla (Silva et al. 2001). El comportamiento así como la actividad fotosintética resultan tanto de procesos fisiológicos básicos (mecanismos moleculares) como de una estructura morfológica subyacente (anatomía interna o geometría de la hoja); es decir, hay una estricta relación estructura-función. Podemos afirmar que una es el reflejo de la otra, y que ambas se perfeccionaron a lo largo de la evolución.

De esta manera, si aceptamos que la interacción genotipo-medio ambiente produce una estructura con una función determinada, podemos pensar que cualquier afectación puede afectar tanto a la estructura como a la función. Por lo tanto, cualquier estrés tendrá una consecuencia estructural, morfológica o funcional. Desde este punto de vista se facilita el estudio del estrés, pues lo podemos abordar tanto desde el aspecto morfológico como funcional (González, 2007) y así con técnicas y métodos adecuados, podemos obtener elementos de razonamiento para dilucidar como está funcionando una especie en un ambiente determinado.

La observación anatómica del mesófilo de la hoja nos permite visualizar sus partes. Básicamente presenta dos epidermis: inferior y superior, con cutículas, estomas en la epidermis, un tejido fotosintético, parénquima en empalizada de células alargadas dispuestas en capas, un parénquima esponjoso básicamente de almacenamiento, y numerosos espacios aéreos entre las células. Esta estructura cambia drásticamente ante factores como: el estrés hídrico, salino, lumínico, térmico o contaminante.

La anatomía de la hoja puede influir también sobre la fotosíntesis de manera significativa provocando entre otros efectos, diferencias en la eficiencia del uso de la luz (Rodés y Collazo, 2006). a su vez la anatomía foliar esta influenciada por factores

ambientales, siendo la disponibilidad de agua y las condiciones de iluminación de primordial importancia ya que puede provocar cambios en la estructura interna y la organización de los tejidos, así como en la morfología de la hoja, todos tendientes a hacer más eficientes la captura de la energía solar. La disposición, tamaño, posición, número, densidad, y estructura de los estomas, así como el grosor de las hojas, son elementos distintivos de las plantas que se desarrollan en diferentes condiciones ambientales y como tal influirán en su actividad fotosintética.

En variedades de *Phaseolus vulgaris* (Suge, 1980) se examinaron la deshidratación y la resistencia a la sequía según los efectos del estrés mecánico, en condiciones de invernadero. Los resultados de este trabajo mostraron que la pérdida de agua por las hojas desprendidas se redujo considerablemente debido al estrés mecánico. También se redujo la cantidad de transpiración relativa, especialmente después de desprender las hojas. La resistencia a la sequía aumentó en las plantas sometidas a estrés. En algunas variedades el efecto de la restricción de agua se evidenció primero en el resquebrajamiento de la región del epicotilo y produjo la muerte de los meristemas apicales. Se encontró que el estrés mecánico reducía tanto el agrietamiento como la muerte de los meristemas apicales. Cuando se restringió el suministro de agua durante 22 días no hubo supervivencia de plantas, mientras que todas las plantas sometidas a estrés mecánico sobrevivieron después de recibir riego nuevamente. Los cambios morfológicos causados por el estrés mecánico a su vez contribuyeron a la supervivencia de las plantas como una de las estrategias de adaptación utilizadas en condiciones ambientales severas.

Otros trabajos en *Phaseolus vulgaris* han utilizado la anatomía de la hoja como indicador de tolerancia a la sequía (Jiménez et al., 1998)

El efecto de concentraciones altas de NaCl en el suelo tiene efectos diferentes en dependencia del órgano que se trate (González, 2007), en raíces se observa una disminución en el diámetro, la misma que en los haces vasculares, si la concentración se lleva a 600 mM, hay una desorganización de los tejidos. Sin embargo en el tallo es inversa, el diámetro se incrementa a medida que aumenta la concentración de Na.

En el trabajo de Longstreth y Novel (1997) en las hojas de diferentes especies, el efecto del Na se manifiesta con una desorganización del parénquima de empalizada y una disminución del tamaño.

Otro ejemplo es el de la respuesta de la conductividad hidráulica y el grosor de los vasos del xilema frente a estrés hídrico, existiendo correlación entre estos factores, en los trabajos de Pire et al. (2007) en Vid, donde se observó que la conductividad hidráulica disminuyó por efecto del déficit hídrico y esta disminución estuvo asociada con un menor grosor de los vasos del xilema.

Una posibilidad práctica de estos estudios es seleccionar genotipos resistentes dentro de una misma especie con respuestas favorables a factores adversos para ser cultivados en áreas de condiciones ambientales severas.



## CONCLUSIONES:

Los estudios histológicos son de vital importancia para llegar a conclusiones certeras en la valoración de la respuesta que manifiestan las plantas a diferentes condiciones, además el contar con una herramienta como el análisis de imágenes implica poseer un proceso automatizado, significativamente objetivo, medianamente rápido, y cuyos resultados pueden fácilmente acumularse, analizarse estadísticamente y graficarse. La posibilidad de almacenar digitalmente las imágenes permite su re-análisis futuro. Todo esto significa poder pasar de una valoración individual y casi artesanal de una imagen, a un proceso que posibilita resultados con menor variación, facilitando y optimizando el análisis comparativo de los mismos.

## RECOMENDACIONES:

Las técnicas histológicas pertenecen al tipo denominado "Técnicas contra reloj", lo que se aconseja desarrollarlas cuando su trabajo le permita realizar solo esta actividad. El éxito en su utilización está relacionado a un control cuidadoso de los tiempos establecidos para cada técnica, en la perseverancia que obliga a verificar cada paso y repetir el protocolo las veces que sean necesarias.

Por su utilidad en la evaluación integral de la respuesta de las plantas a diferentes condiciones será necesario continuar profundizando en los diferentes métodos de trabajo para poder aplicarlas como herramientas indispensables.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Alemán, S., González, G. and Barredo, F. 2002. Estudio histológico de la embriogénesis somática en henequén. *Revista Biotecnología Vegetal*. 2: 1, 51-56.
- Anon<sup>a</sup>, 2006. Libro Botánica Online. In: <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg>.
- Anon<sup>b</sup>, 2006. Microfotografías Digital. In: <http://www.bioxeo.com/artigos/microfoto.htm>.
- Anon, 2007. Principios de Microscopía. In: <http://www.fai.unne.edu.ar/biologia/microscopia/microscopia1.htm>
- Arce F. P., Buleta L., Mayorga M., Fernández F. 2001. Microfotografía barata y sencilla. Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla". Santander. España. IV-CVHAP 2001
- Fuentes, Leticia, Mesa, A., Ruiz, María Luisa., Fernández, Martha, Pélaez de Lucas, María Isabel. 2005 Estudio histológico de la organogénesis *in vitro* de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 28(3): 199-203.
- Gómez, R (1998). Embriogénesis Somática. En .Pérez Ponce, J.N (Ed) *Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología* Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. pp 57-79.
- González, J.A. 2007. Ecofisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. In: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro07/Cap3>.
- Herrera-Flores, T.S., Cárdenas-Soriano, E., Ortiz-Cereceres, J., Acosta-Gallegos, J. and Mendoza-Castillo, M. C. 2005. Anatomy of the pod of three species of the genus *Phaseolus*, *Agrociencia* 39: 595-602.

- Jiménez, Gotilla; Ramírez, María Antonieta; Vallejo, P; González, F; Muñoz, M; Izquierdo, S. (1998) Anatomía de la hoja como indicador de tolerancia a la sequía en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Plant genetics and breeding; Plant physiology - Growth and development INIFAP(Mexico) p. 171
- Laboratorio de Nefrología Experimental, Instituto de Investigaciones Cardiológicas (ININCA), Universidad de Buenos Aires, Argentina
- Longstreth, D. J y P.S. Nobel 1997 Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for fotosíntesis. Plant Physiol 63: 700- 703.
- Mateos, P.F. 2007. Observación de los microorganismos: el microscopio, preparación y examen de muestras. In: <http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema02.html>
- Peña, Esperanza; Saralegui, Hildelisa. 1982. Técnicas de Anatomía Vegetal. Dpto. de textos y Materiales Didácticos Universidad de La Habana.
- Pire, R; Sanabria, María E; Pereira, Aracelys; Díez, J. 2007. Conductividad hidráulica y grosor de los vasos del xilema en cinco materiales de vid sometidos a déficit hídrico ISSN 0378-1844 INCI v.32 n.1 Caracas.
- Rodés G. Rosa; Collazo O. Margarita. 2006. Manual de Prácticas de Fotosíntesis 1era ed. Universidad Autónoma de México ISBN: 970-32-3313-9 p.7
- Suge, H. 1990. Dehydration and drought resistance in *Phaseolus vulgaris* as affected by mechanical stress. Reports of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University 31:1-10.
- Userpater, J.M., Ferder, M., Inserra, P. I., Stella, I. Y., Ferder, L.F. and Inserra, F. 2003 Aplicación del análisis de imágenes computarizado en la histopatología renal. *Rev. Nefrol. Diál. y Transp.*, 23: 4, 139-144.
- Wikipedia, 2006. Microscopio compuesto. In: [http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio compuesto](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_compuesto).