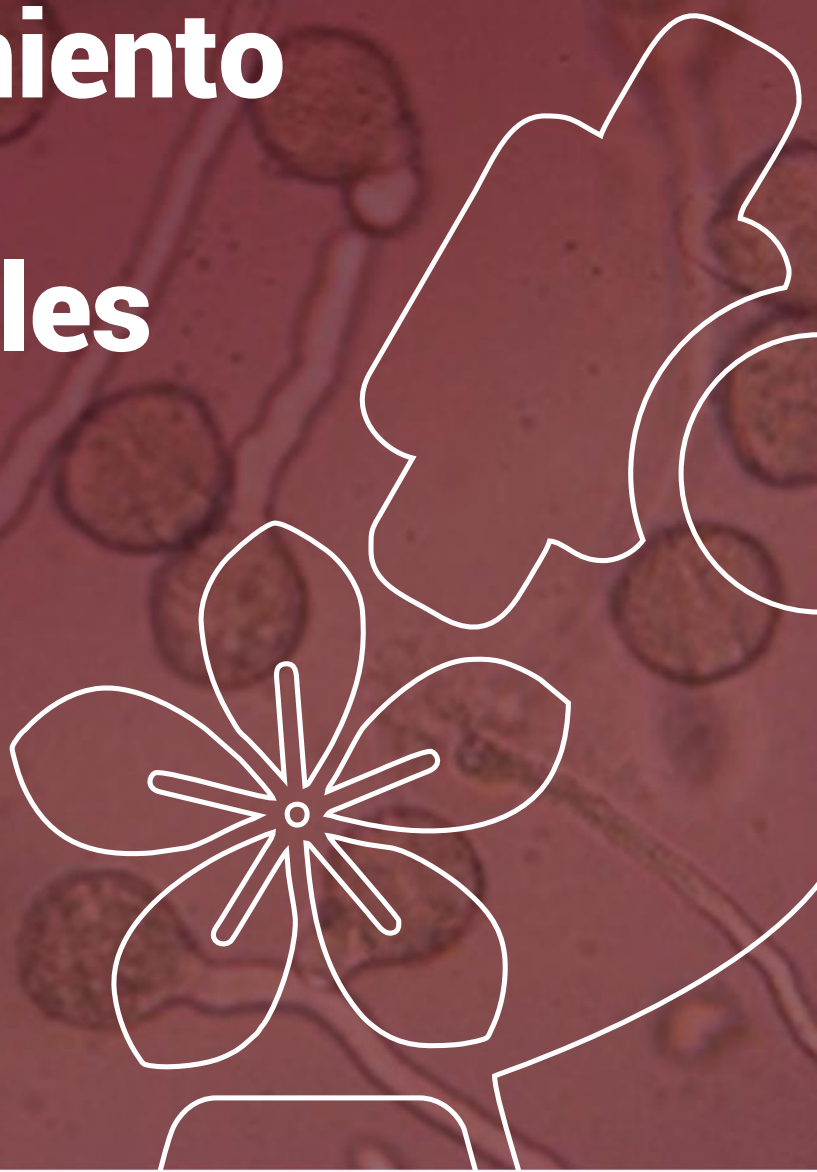




MICROCURSO

Técnicas de microscopía aplicadas al mejoramiento de plantas ornamentales





MICROCURSO

Técnicas de microscopía aplicadas al mejoramiento de plantas ornamentales

Elaborado por

PROCADIS - Gerencia de Formación y Capacitación; Dirección Nacional Asistente de Desarrollo, Gestión y Fortalecimiento de las Personas; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Contenidos

Tec. en Floricultura María Andrea Coviella (Instituto de Floricultura - INTA)

*Agradezco especialmente a la Ing. Agr. Dra. María Silvina Soto
del Instituto de Floricultura del INTA por haberme alentado a llevarlo a cabo,
a Paula Bologna por su exhaustiva lectura y a Alan S. Gracer
por las fotos realizadas en los procedimientos de las diversas técnicas.*



ÍNDICE

1. Conservación de material vegetal para técnicas histológicas	3
1.1. Fijación de materiales.....	3
1.2. Procedimiento de Fijación	4
2. Microscopía óptica.....	5
2.1. Microscopía óptica sin fijación.....	5
2.1.1. Viabilidad de polen	5
2.1.2. Germinación in vitro de granos de polen.....	9
2.1.3. Receptividad estigmática (Modificada)	11
2.1.4. Procesamiento de epidermis: Técnica de peeling.....	12
2.1.5. Montaje de materiales semipermanente	14
2.2. Material fijado.....	16
2.2.1. Técnica de inclusión de tejidos en parafina para Microscopía óptica	16
2.3. Colorantes	26
3. Microscopía de Fluorescencia	28
3.1. Microscopía de fluorescencia sin fijación	29
3.1.1. Viabilidad de polen por fluorescencia.....	29
3.2. Microscopía de fluorescencia con fijación.....	33
3.2.1. Observación de crecimiento de tubo polínico en estilo.....	33
Bibliografía.....	36
Trabajos realizados en el Instituto de Floricultura	38
Diccionario	40



Este material es difundido bajo licencia Creative Commons – BY – NC – SA. Es posible copiar, utilizar y transmitir esta obra, con la condición de mencionar a los autores y de no hacer uso comercial. Si se modifica o transforma esta obra o alguno de sus elementos, se debe distribuir el resultado bajo la misma licencia Creative Commons.



1. Conservación de material vegetal para técnicas histológicas

1.1. Fijación de materiales

El objetivo de la fijación es matar a las células preservando la estructura celular que tenía cuando estaba viva.

¿Cuál es la función del fijador? Tener la capacidad de penetrar y matar los tejidos rápidamente. Debe ser ácido para permitir una coagulación paulatina de las proteínas de modo que el citoplasma no sufra contracciones. Las células de un tejido bien fijado se mantienen turgentes: no se hinchan ni se plasmolizan (D'ambrogio, 1986).

Existen varios tipos de fijadores: FAA, CRAF, CARNOY, FARMER, GLUTARALDEHIDO, TETROXIDO DE OSMIO. En nuestro caso, dependiendo la técnica de laboratorio que se use, utilizamos el **FAA** y el **GLUTARALDEHIDO**.

FAA: es el fijador más utilizado para estudios morfológicos e histológicos en vegetales. Éste desnaturaliza las proteínas por precipitación y está compuesto por una mezcla balanceada de tres fijadores simples: formol, alcohol etílico y ácido acético (Tabla 1).

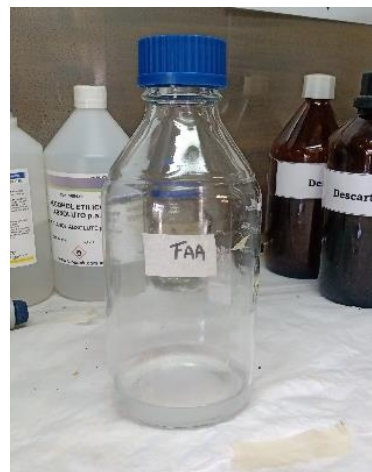
Formol: tiene poder de penetración. Coagula rápidamente las proteínas, endurece los tejidos y conserva los lípidos.

Alcohol etílico: su penetración es más lenta. Deshidrata y endurece al mismo tiempo, disuelve los lípidos y conserva las sustancias inorgánicas.

Ácido acético: hincha las células. Tiene buen poder de penetración impidiendo el endurecimiento de los tejidos.

La fijación se realiza a temperatura ambiente porque se produce gradualmente, teniendo un tiempo mínimo de fijación de 24 a 48 h. A través del paso del tiempo el líquido del material fijado se torna de un color amarillento a amarronado.

Este fijador también se utiliza como líquido conservante. Por ser volátil es recomendable controlar su volumen regularmente. En los caso de materiales delicados como ápices de tallo o raíces, se fijan por 24 ó 48 h, luego se remueve el fijador con agua corriente. Si no se procesa inmediatamente, se lo conserva en alcohol 70°. Esto se realiza para que no se deshidrate excesivamente o no se torne quebradizo el material.



*Frasco para preparar el FAA
bajo campana.*



COMPONENTES	PROPORCIÓN	CANTIDAD PARA 1 LT
Formol 40%	1	100 ml
Alcohol etílico 96°	5	500 ml
Ácido acético	0.5	50 ml
Agua destilada	3.5	350 ml

Tabla 1: Componentes para la preparación de FAA.

Glutarandehído: fijador que preserva muy bien la estructura citoplasmática. Como desventaja se presenta muy inestable y de baja penetración. Se lo utiliza con una solución tampón de fosfato de pH 7,2-7,4 para que no se precipiten las proteínas por acidificación. El tiempo de fijación es de 2 h. y a baja temperatura (0-4 °C).

Este fijador no coagulante es utilizado tanto en microscopía óptica como electrónica. Se lo comercializa en forma de solución acuosa en distintos porcentajes.

1.2. Procedimiento de Fijación

Todos los órganos vegetales (tallos, hojas, pistilos, rizomas, bulbos, raíces, flores, ovarios, etc.) pueden ser fijados. Se debe seleccionar el material fresco, hidratado y sano. En caso de subdividir el material utilizar un bisturí bien afilado, para realizar cortes rápidos y nítidos, sin rasgar el tejido vegetal.

Colocar las muestras en recipientes de plásticos, de boca ancha y herméticos, que contengan un volumen del fijador varias veces superior al tejido u órgano a fijar (Fig. 1).



Fig. 1: Frascos con órganos vegetales fijados en FAA.



Procedimiento:

1. Verter suavemente el fijador en el recipiente y luego sumergir la muestra.
2. Agitar para que la muestra entre en contacto con el fijador y penetre bien en los tejidos.
3. Etiquetar el material colocando dentro del recipiente un papel blanco con los datos del material escritos con lápiz negro de grafito (código, fecha, tratamiento, etc.).
4. Agitar el recipiente para homogeneizar el fijador.

Tener en cuenta que si el material es muy grande se fija por partes (hojas, tallos) y si la muestra es pequeña puede fijarse entera. En caso de raíces u órganos subterráneos (bulbos, tubérculos, rizomas) antes de la fijación, lavarlos con agua corriente para eliminar partículas de tierra o sustrato que puedan estar adheridas.



Fig. 2: Frascos con órganos vegetales para procesar.

2. Microscopía óptica

2.1. Microscopía óptica sin fijación

2.1.1. Viabilidad de polen -Técnica de Alexander Modificada (Alexander 1969)

La posibilidad de conservar polen a largo plazo es una herramienta de importancia en programas de mejoramiento, semilleros y otros trabajos de investigación. Trabajar con polen conservado permite numerosas prácticas como: la factibilidad de hacer cruzamientos entre plantas que no florecen al mismo tiempo, prescindir de la necesidad de criar líneas parentales al mismo tiempo, cosechar el polen en óptimas condiciones sin depender del momento para la polinización, poder realizar intercambio de germoplasma, entre otras (Shivanna, 2005).





En la conservación de polen es muy importante impedir la proliferación de hongos. Una de las metodologías más usadas es la extracción de estambres de las anteras con una pinza, y su colocación en las cápsulas debidamente rotuladas, luego las cápsulas se colocan en cajas plásticas con silicagel y en la heladera (Fig. 3).

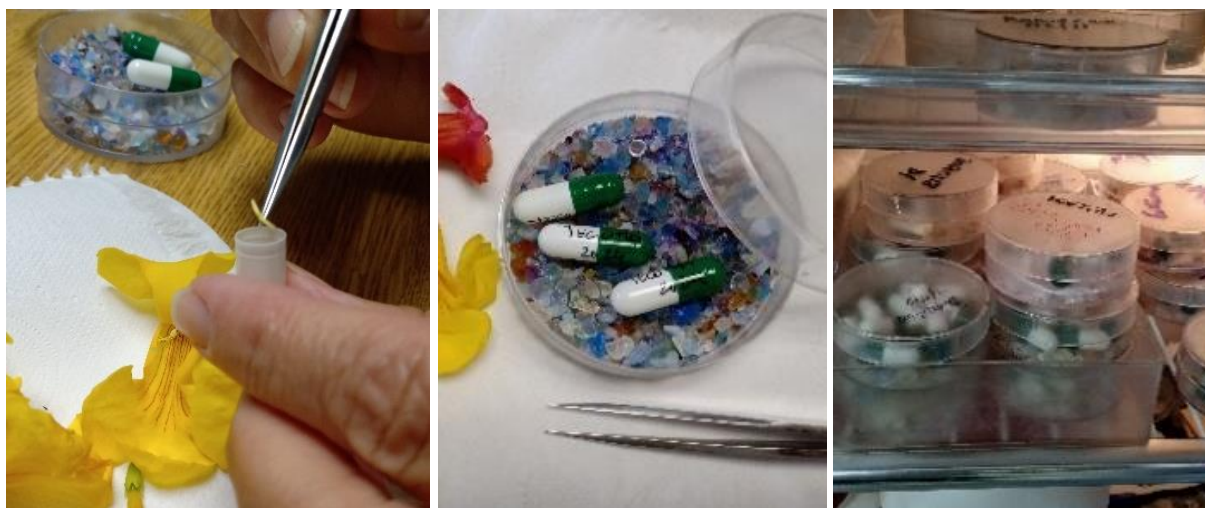


Fig. 3: Introducción de anteras en la cápsulas y conservación de las cajas con silicagel a 4 °C.

Estudios en conservación del polen mostraron una relación directa entre el porcentaje de humedad relativa en el polen conservado y la longevidad. Es decir que aquellos granos que toleran un descenso de la humedad relativa entre el 0% y el 30%, sin perder la viabilidad, presentan mayor longevidad que aquellos cuya viabilidad disminuye con el descenso de humedad relativa. Cabe destacar que un bajo porcentaje de humedad relativa permite la conservación del polen a bajas temperaturas (0 °C hasta -70 °C) lo cual incrementa la longevidad (Shivanna, 2005).

Harrington (1970) clasifica la longevidad del polen en tres grupos: longevidad larga: polen que se puede conservar más de 6 meses; longevidad media: cuando su conservación presenta un rango de 1 a 3 meses y longevidad corta: la conservación de polen se extiende desde unos minutos hasta 1 mes.

Observación: Es muy importante tener en cuenta que para utilizar polen conservado se lo debe hidratar previamente en cámara húmeda. El tiempo de hidratado puede ser de 4 o 5 h hasta 24h, dependiendo de la especie.

Materiales:

Granos de polen, solución de Alexander (ver bibliografía), portaobjeto, placa caliente a 20 °C, cubreobjeto, pipetas Pasteur, microscopio óptico.

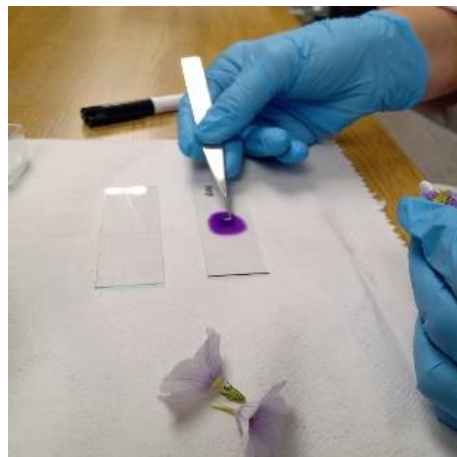


Procedimiento:

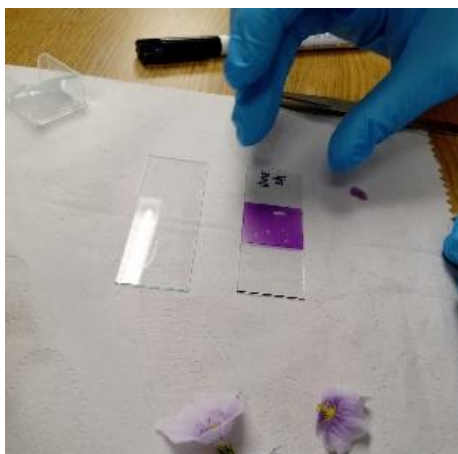
1. Identificar la muestra en un portaobjeto con marcador indeleble y colocar 1 ó 2 gotas de la solución Alexander.



2. Tomar las anteras frescas y con una pinza, sacudir las anteras sobre la gota de la solución.

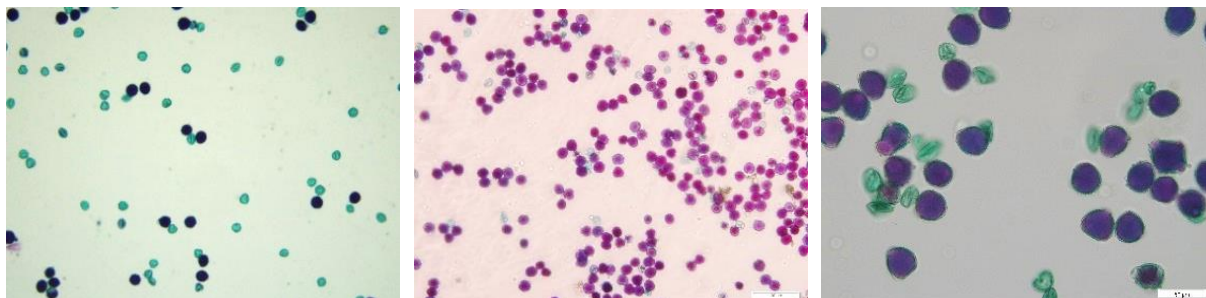


3. Colocar el cubreobjeto y llevarlo a una placa caliente (20 °C), por unos 15 a 20 minutos.





4. Observar en el microscopio óptico.



Observación de granos de polen de Calibrachoa y Petunia.

Resultados:

Los granos polen rojos-violáceos son viables y los azules-verdosos, inviables.

Consideraciones:

Colorantes de la solución:

Verde de malaquita: es un colorante débilmente básico utilizado para teñir las paredes de polen.

Orange G: se utiliza para tinciones nucleares y citoplasmáticas en procedimientos de tinción múltiple. Se encontró que su adición a la presente mezcla de colorantes mejoraba la diferenciación.

Fucsina ácida: se utiliza para teñir el citoplasma, protoplasma y las mitocondrias. Colorea el polen no abortado de rojo, rojo intenso o fucsia dependiendo del material.

Todos estos colorantes se añaden a un medio acuoso que contiene fenol, alcohol, glicerol e hidrato de cloral. El alcohol ácido acético glacial se utiliza para bajar el pH.



VIDEO



Técnica Alexander
(Instituto de Floricultura – CIRN – INTA)

https://youtu.be/hY_6GB6Ds1k



2.1.2. Germinación in vitro de granos de polen

La germinación de polen in vitro es una técnica que permite no solo estudiar la viabilidad del polen, sino también el vigor de éste, mediante la evaluación de la velocidad del crecimiento del tubo polínico. Esta técnica es muy utilizada en las áreas de mejoramiento y de biotecnología, particularmente en la estrategia de selección de polen (Shivanna and Sawhney, 2005).

Numerosos métodos y medios de cultivo han sido utilizados para la germinación de polen in vitro, encontrando generalmente medios de cultivo con calcio y/o boro, combinados con sacarosa en concentraciones que varían entre 10% y 20% como un recurso nutricional y osmótico (Dickinson, 2005; Pfahler, 1967).

Materiales:

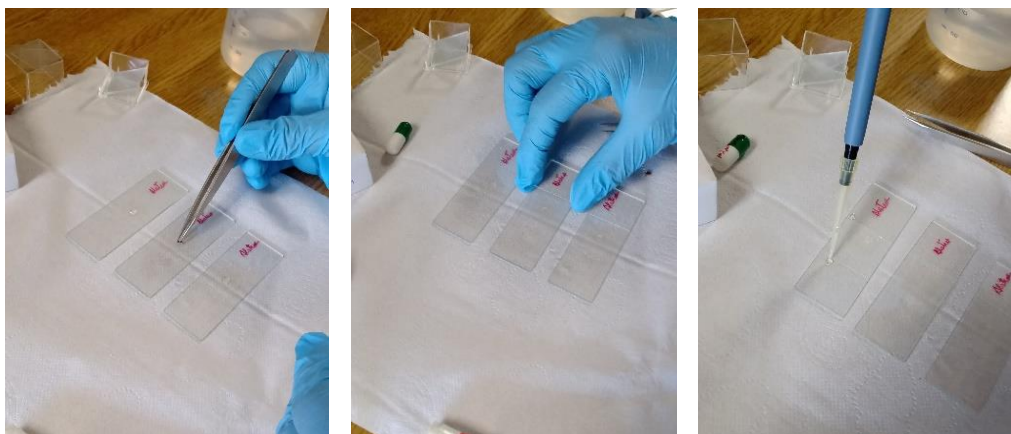
Polen fresco, soluciones de sacarosa y ácido bórico, portaobjeto con una concavidad marca Slides®, cubreobjeto de 24x24 mm, agua destilada, microscopio de campo claro.

Procedimiento:

1. Colocar en un portaobjeto con una concavidad, 7 μ l de solución de sacarosa y ácido bórico.



2. Con una pinza tomar las anteras y dispersar el polen. Luego colocar el cubreobjeto y sellarlo con agua destilada alrededor.

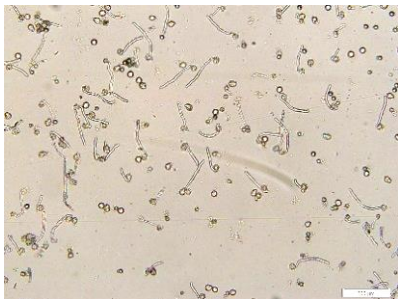




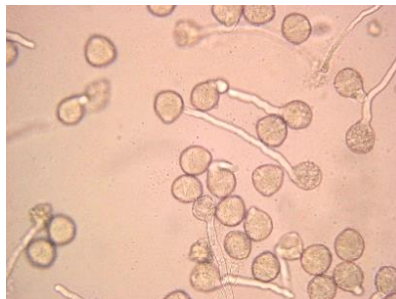
3. Colocar en una cámara húmeda a 25 °C de temperatura constante durante 5 horas.



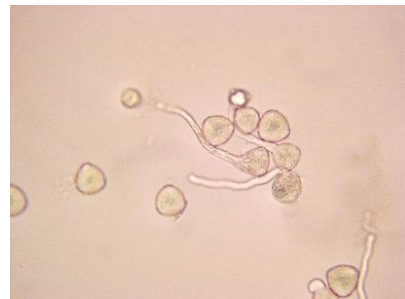
4. Observar al microscopio.



Calibrachoa caesia



C. humilis



C. ovalifolia

Consideraciones:

Efecto de la sacarosa: el polen maduro requiere azúcares derivados del almidón como fuente de energía para favorecer la germinación del polen. La formación del tubo polínico requiere azúcares (p.ej., calosa) como componentes principales de la pared celular y los tapones. Por lo tanto, el metabolismo del almidón y el azúcar son necesarios para la dehiscencia de las anteras, la germinación del polen y el crecimiento de los tubos (Liu, 2021).

Ácido bórico: su participación está vinculada directamente con la síntesis de pectina e indirectamente en el desarrollo de la membrana del tubo polínico (Naik 2015) y previene la polimerización excesiva de azúcares en los sitios del metabolismo del azúcar (Scott, 1960). El boro es un microelemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas vasculares (Stangoulis et al., 2001) y se cree que promueve la germinación del polen al afectar la actividad H^+ -ATPasa, que inicia la germinación del polen y el crecimiento de los tubos (Feijo et al., 1995; Obermeyer y Blatt, 1995).

La combinación de azúcar y ácido bórico promueve la germinación del polen y el desarrollo de los tubos. El boro forma un complejo con el azúcar, que mejora la translocación de moléculas manteniendo la osmorregulación, la síntesis de pectina y posterior distribución para el alargamiento del tubo polínico (Biswas et al., 2014).



VIDEO



Técnica de germinación in vitro de granos de polen

(Instituto de Floricultura – CIRN – INTA)

<https://youtu.be/SA4zMWBC3ql>



2.1.3. Receptividad estigmática (Modificada)

Para que una polinización sea exitosa se requiere no solo que el polen sea viable, sino también que el estigma este receptivo. La receptividad estigmática puede estudiarse en forma directa mediante la polinización controlada en diferentes estados de desarrollo floral, donde se observa la germinación de los granos de polen sobre el estigma (Shivanna y Rangaswamy, 1992) (Ver pág. 34. Crecimiento del tubo polínico).

Un método muy utilizado e indirecto para el estudio de la receptividad estigmática es la prueba de peróxido de hidrógeno (Galen y Plowright, 1987). En este caso se realiza la inmersión de los estigmas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante aproximadamente 3 minutos y la observación de la presencia o ausencia de burbujas de aire a simple vista. Esta reacción de burbujeo ocurre debido al contacto del peróxido de hidrógeno con las peroxidasas presentes en el estigma receptor (Zeisler 1938). Esta técnica permite visualizar si el estigma esta receptivo, para lo cual la extracción del estilo se realiza en el laboratorio, con la precaución de no dañar el estigma para evitar falsos positivos, ya que los daños producen burbujeos (Ferreira, 2021).

Materiales:

Estigmas de flores recién cosechadas, libres de polen y sin roturas, peróxido de hidrógeno 10%, pipeta, caja de Petri, pinza, papel y microscopio.

Procedimiento:

1. Tomar la flor extraer el estilo y apoyarlo sobre la caja de Petri SIN DAÑAR EL ESTIGMA.





2. Colocar unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre el estigma.



3. Esperar unos segundos y observar en lupa.



Resultado:

Si se observa burbujeo en el estigma es que está receptivo.

2.1.4. Procesamiento de epidermis: Técnica de peeling

Si bien el tejido epidérmico está presente en todos los órganos del cuerpo primario de la planta (flores, frutos y semillas) para su estudio, se emplea comúnmente la epidermis de la lámina foliar.

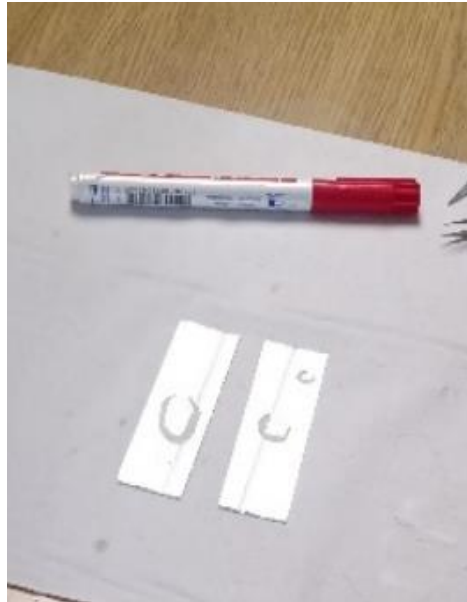
El análisis en superficie de este tejido proporciona información acerca del tipo, tamaño y forma de las células que lo conforman.

El Peeling es una técnica rápida y sencilla que consiste en la separación o aislamiento de la epidermis del mesófilo. Se puede trabajar con hojas frescas o fijadas, aunque se logran mejores resultados con hojas algo carnosas (Zarlavsky, 2014).



Materiales:

Hojas frescas o fijadas, placa de Petri, portaobjetos, aguja histológica, pipeta Pasteur, pincel, pinza de punta fina, hipoclorito de sodio, colorante safranina diluida.



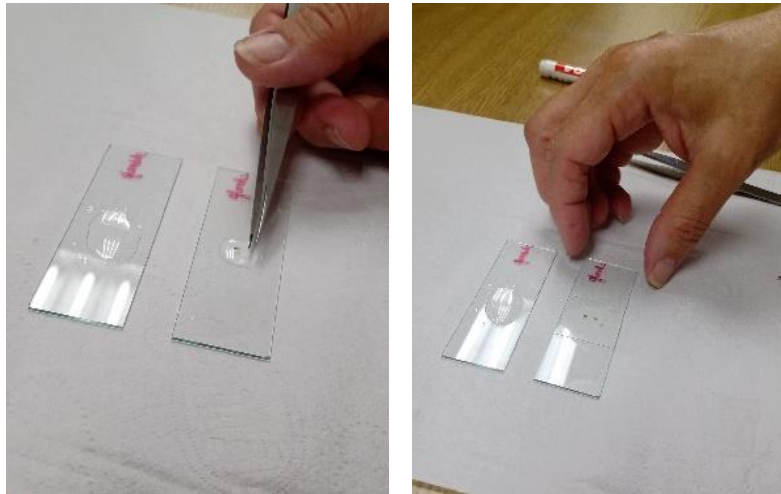
Procedimiento:

1. Lavar la hoja con agua corriente sosteniéndola entre los dedos índice y pulgar.
2. Introducir la punta de una aguja histológica por debajo de la epidermis.
3. Tomar la epidermis con una pinza de puntas finas y tirar suavemente hasta desprenderla en sentido contrapuesto.

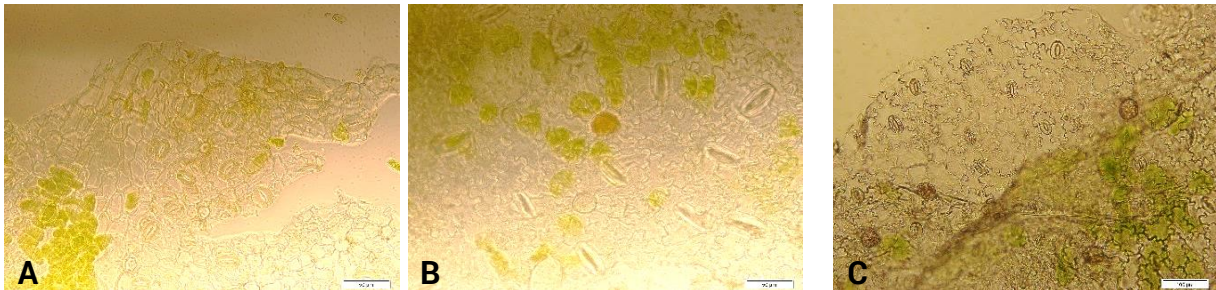




4. Colocar sobre el portaobjeto unas gotas de agua destilada y sobre ella el tejido de la hoja con la cara de la epidermis que se desea estudiar hacia arriba. Luego colocar un cubreobjeto para que no se deshidrate la muestra a observar.



5. Observar al microscopio.



A y B Estomas de *Lippia* 2 y 4 n.

Estomas de *Bacopa* 4 n.

Consideraciones:

Se puede aclarar la muestra sobre el portaobjeto con unas gotas de hipoclorito de sodio y esperar unos minutos. Luego lavar suavemente con agua destilada. Agregar unas gotas de safranina diluida y dejar actuar 5'. Lavar nuevamente con agua destilada con mucho cuidado. Por último, colocar el cubreobjeto y observar.

2.1.5. Montaje de materiales semipermanente (Zarlavsky, 2014)

Si se desea disponer de un preparado semipermanente se debe utilizar gelatina-glicerina que es un medio hidrosoluble, económico, durable y de fácil preparación.

Para la preparación de 100 ml de solución semipermanente se requiere Polvo de gelatina (grado alimentario), agua destilada, glicerina pura y ácido fénico (Tabla 2).





COMPONENTES	CANTIDAD PARA 100 ml
Polvo gelatina (grado alimentario)	7 g
Agua destilada	42 ml
Glicerina pura	50 ml
Ac. fénico	3 a 4 gotas

Tabla 2. Preparación de 100 ml de solución semipermanente.

También se comercializan medios de montaje comerciales listos para usar.

Preparación:

1. Colocar el agua destilada en un vaso de precipitados. Agregar la gelatina y revolver con varilla de vidrio.
2. Llevar a baño María y revolver hasta que la gelatina se disuelva. Dejar reposar hasta que se forme un gel.
3. Agregar la glicerina y continuar revolviendo hasta homogeneizar.
4. Agregar el ácido fénico y revolver suavemente hasta que desaparezcan los grumos.
5. Retirar del fuego y verter la gelatina en tubo de ensayo, hasta $\frac{3}{4}$ partes. Colocar una varilla de vidrio en cada tubo. Dejar enfriar y tapar con Parafim® para evitar que se contamine.

Precauciones:

El ácido fénico produce quemaduras en la piel, por lo cual es necesario consultar previamente la hoja de seguridad.

Sugerencia:

Un sustituto del ácido fénico es el metilparabeno o Nipagin. Es un polvo color blanco inoloro utilizado en la industria farmacéutica y cosmética como conservador y agente antimicrobiano. Se puede adquirir en farmacias donde se elaboran recetas magistrales.

Preparación:

1. Disolver el polvo (0,1%) en el volumen total de agua destilada caliente y agitar con varilla de vidrio.
2. Dejar enfriar y filtrar.
3. Agregar la gelatina y revolver.
4. Llevar a baño María hasta que la gelatina se disuelva. Agregar la glicerina y revolver hasta homogeneizar.



2.2. Material fijado



2.2.1. Técnica de inclusión de tejidos en parafina para Microscopía óptica (Zarlavsky, 2014)

Introducción

El estudio microscópico de los tejidos vegetales requiere de la transparencia de los mismos, la cual puede lograrse mediante la obtención de cortes muy delgados. Hay materiales que pueden ser cortados directamente, como las maderas, obteniendo láminas delgadas y bastante transparentes para su examen al microscopio. Pero otros órganos vegetales como tallos jóvenes, meristemas, hojas, flores, etc., carecen de la consistencia para ser cortados directamente por lo que requieren de tratamientos que les confieran la dureza adecuada.

Un procedimiento muy empleado es la inclusión en parafina, la cual consiste en la imbibición del material a estudiar en un fluido que luego solidifica. La matriz sólida resultante no solo recubre el material, sino que ocupa los espacios inter- e intracelulares generando una consistencia homogénea y puede ser seccionado exitosamente mediante finas láminas.

Una de las sustancias más empleadas para la inclusión de tejidos vegetales es la parafina. El proceso consta de varias etapas: **deshidratación, clarificación, infiltración e inclusión**. La duración de las distintas etapas debe ajustarse a las características del material como su consistencia, tipo, tamaño y tamaño de órgano, entre otras características inherentes a la especie a estudiar.

Preparación del material

Para facilitar el proceso de inclusión cortar el material fijado y lavado, en porciones más pequeñas, ejemplo:

- *Tallos jóvenes o crecimiento primario*: cortar trozos de 0,5 mm Ø y 1 cm de largo.
- *Tallos y raíces de consistencia dura o de crecimiento secundario*: no superar 5 a 6 mm Ø y 1 cm de largo.
- *Raíces*: las raíces al ser blanquecinas o amarillentas se deben colorear durante la deshidratación para facilitar la distinción en el proceso, empleando algún colorante soluble en alcohol como fast Green o azul de anilina.
- *Hojas*: cuando es pequeña puede ser procesada entera. Pero si son de mayor tamaño, se debe procesar una porción de la parte central, de 1 cm de lado conteniendo el nervio central.
- *Flores*: pequeñas o botones florales se procesan enteras, mientras que las de mayor tamaño se procesan en partes.
- *Frutos*: generalmente deben ser cortados en trozos para su correcta inclusión o ser procesados en porciones representativas.
- *Semillas*: en general deben ser pretratadas para ablandarlas, de acuerdo con el tamaño y las sustancias de reserva.



Deshidratación y clarificación

La **deshidratación** es el primer paso del proceso de penetración de la parafina en el tejido. El objetivo de esta etapa es eliminar gradualmente el agua de los tejidos y reemplazarla por un fluido intermediario, que es el alcohol. Esto se realiza con alcohol etílico en grado creciente hasta alcohol absoluto. El período de inmersión en este último debe ser lo más breve posible pues causa endurecimiento en los tejidos. Si es necesario detener este proceso, se recomienda dejar el material en alcohol 96° donde puede permanecer por más de 24 h.



Para identificar la muestra se recomienda colocar en el interior del recipiente, junto con la muestra, una tira de papel escrita con lápiz negro de grafito. Todos los pasajes, desde la deshidratación hasta la clarificación, se realizan dentro de un frasco de vidrio transparente, de boca ancha y con tapa. Los cambios de alcohol se realizan con una pipeta Pasteur para evitar dañar o perder el material.

En la clarificación, se reemplaza el fluido intermedio no miscible en parafina (alcohol), por un segundo fluido intermedio miscible que es el xileno. Este proceso debe realizarse bajo campana por los vapores nocivos del xileno.

En esta etapa se emplean mezclas graduales de alcohol y xileno. Como el xileno no es miscible con el agua, si la deshidratación no fue completa, el clarificante se vuelve opaco, turbio y de aspecto lechoso. Si esto ocurre, volver a deshidratar con una serie de graduaciones de alcoholes nueva. Este proceso debe dejar el material completamente translúcido.

También en este proceso, no es conveniente dejar las muestras en xileno puro más tiempo del indicado, ya que aumenta la dureza del tejido.

En la actualidad existen clarificantes sustitutos del xileno como el Para Clear o Histo Clear.

Infiltración e inclusión

La **infiltración** consiste en la lenta penetración de parafina fundida en el interior del tejido. Durante esta etapa, el xileno o un sustituto es reemplazado por parafina.

La parafina de uso histológico tiene un punto de fusión (PF) de 56-58 °C y se comercializa tanto en bloque como en filamentos o pellets con diferentes nombres comerciales. También existen parafinas de distintos colores que permiten visualizar y orientar pequeñas muestras fácilmente.



La parafina es sólida a temperatura ambiente por tal motivo la infiltración debe transcurrir a temperatura levemente superior al punto de fusión, dentro de una estufa y con el frasco destapado para que se evapore el xileno. Las parafinas de PF más elevados (60-62 °C) son más duras una vez solidificadas, por lo tanto, son convenientes para incluir tejidos duros o cuando el corte debe llevarse a cabo con temperatura de ambiente elevada (verano).

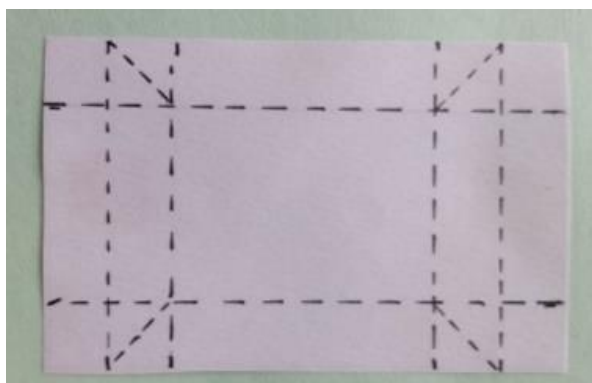
Al igual que en la clarificación, realizar de 2 a 3 cambios de mezclas xileno-parafina hasta llegar a la parafina pura. Este proceso se realiza dentro de la estufa. Se aconseja tener un recipiente dentro de la estufa para volcar las mezclas xileno-parafina que se descartan. Una vez en parafina pura, el material puede quedar allí por tiempo indefinido.

En la etapa de **inclusión**, cuando la parafina ha infiltrado completamente el material, se deja solidificar en porciones de forma y tamaño adecuados para su corte en micrótopo (bloques de parafina). Por ello la parafina fundida y el material se vacían en moldes. Pueden usarse moldes de papel plastificado, los cuales se confeccionan a mano, o moldes industriales que pueden ser de silicona o cubeta para fabricar cubos de hielo.

Si la inclusión se realiza en moldes de papel, se debe armar una caja como la Fig. 1. Su tamaño y altura dependerán de la cantidad de material a incluir.

Como realizar el molde de papel:

Se debe utilizar papel sedoso para realizar un molde o soporte que contenga el medio de inclusión en estado líquido y la muestra a cortar, esto facilitará la extracción de las muestras, que pueden ser de tamaño variable. En la siguiente figura se muestra el esquema para un rectángulo de 8 x 5 cm donde las líneas entrecortadas indican zona de doblez.



Inclusión en el molde

Retirar el frasco de la estufa con el material y la parafina, volcar sobre el molde apoyado en una plancha tibia (35-40 °C). Acomodar y orientar el material (según se quieran obtener cortes transversales o longitudinales) con la ayuda de una herramienta (aguja histológica o pinza de puntas finas) calentada en la llama del mechero. Luego se retira el molde de la plancha colocándolo sobre una superficie plana hasta que solidifique, controlando que no se formen burbujas entorno del material a cortar.



Si el material consta de varias porciones, separarlas dejando 1 cm libre entre porciones. Colocar la etiqueta rotulada dentro del molde.

Recomendaciones:

- La parafina debe estar libre de burbujas de aire alrededor de la muestra. Para evitar esto, volcar lentamente y con cuidado el contenido del frasco en el molde. En el caso que se formen, eliminarlas con la punta de la aguja histológica caliente.
- Cuando la temperatura del laboratorio es baja, realizar la inclusión con el molde apoyado sobre una placa termostática graduada a 40-55 °C. Si el frasco de parafina se solidifica, colocarlo en un recipiente a baño María.
- En verano, para lograr una solidificación correcta, una vez iniciado el endurecimiento es conveniente sumergir el molde en un recipiente con agua helada o disponerlo en la heladera.
- El material incluido puede ser conservado indefinidamente hasta ser sometido a corte, coloración y estudio microscópico.

Tallado y corte

La parafina desmoldada se corta con un bisturí o espátula calentada a la llama en bloques individuales que contienen una o más muestras. Luego se procede a adherir cada bloque a un cubo de madera de 2 cm de lado, previamente embebido en parafina. Es aconsejable colocar los cubos dentro de un recipiente que contenga parafina líquida dentro de la estufa. Es recomendable fijar la base del bloque a una de las caras transversales del cubo de madera, ya que ellas proporcionan mejor adherencia. Para ello, fundir superficialmente el bloque y el recubrimiento del cubo con una espátula calentada en la llama de un mechero.

Una vez fijado, tallar los lados del bloque y quitar el excedente de parafina, para lograr que la arista superior e inferior del bloque queden paralelas. Esto facilitará realizar los cortes del bloque en micrótopo, que los sucesivos cortes se adhieran entre sí y se forme una cinta recta.





El material embebido en parafina es cortado con un micrótomos rotativo manual o motorizado. Las cuchillas son fabricadas en acero inoxidable y vienen de diferente largo, ángulo de corte y perfil. Al realizar el corte, la cuchilla permanece fija mientras el tejido incluido en el bloque de parafina se mueve de arriba hacia abajo pasando por el filo de la cuchilla.

Cada corte realizado queda adherido al siguiente por medio de un mecanismo de avance de precisión, que permite ajustar el espesor de corte, que varía según el modelo del micrótomos. De este modo, los sucesivos cortes forman una cinta de parafina de espesor constante y seriado. Lo más frecuente es cortar a 10-12 μm .

Ciertas combinaciones de material, tipo de parafina y de cuchilla permiten también obtener cortes mucho más delgados (hasta 6 μm).

Metodología:

1. Sujetar a la unidad cubo-bloque de parafina mediante la correspondiente mordaza del micrótomos.
2. Seleccionar el espesor de corte en escala graduada.
3. Acercar la cuchilla al bloque hasta que éste coincida con el filo de ésta.
4. Accionar la manivela varias veces hasta que comiencen a aparecer los cortes. Al comienzo serán solo de parafina, pero de a poco aparecerá el material. Cuando esto ocurra, observar un corte con el microscopio para comprobar si la orientación es correcta y el grosor es el deseado. En caso contrario, reajustar la posición del bloque y/o de la mordaza.
5. Sostener la cinta que empieza a formarse con un pincel de pelo fino y cortarla periódicamente en segmentos de 5 cm de longitud.
6. Continuar cortando hasta agotar el material.

Dificultades que se suelen presentar

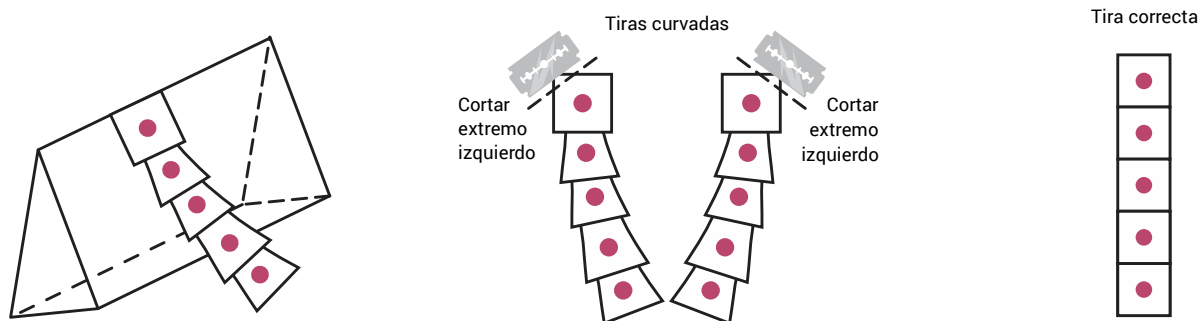
La tira de parafina no se forma.

- A. Parafina muy dura: reincluir el bloque en parafina de PF más bajo (54 °C).
- B. Cortar secciones más delgadas.
- C. Cuchilla desafilada.
- D. Desenrollar la sección y sostenerla suavemente contra la cuchilla con un pincel. Continuar sosteniendo la sección a medida que se corta. Es probable que comience a formarse la cinta.
- E. Pasar muy suavemente la yema del dedo índice sobre los bordes superior e inferior del bloque de parafina.
- F. Exhalar la respiración sobre el bloque antes de cortar.



Las tiras salen curvadas.

- A. Volver a tallar el bloque.
- B. El borde del bloque no está paralelo a la cuchilla y se debe corregir su posición.
- C. Irregularidades en el filo de la cuchilla; cambiar el lugar de corte de la cuchilla.
- D. Material con tejido de distinto grado de dureza.



Secciones comprimidas, arrugadas o encimadas.

- A. Cuchilla muy desafilada.
- B. Temperatura ambiente muy alta: enfriar el bloque en un recipiente con agua helada, colocarlo en la heladera unos minutos o encender el aire acondicionado.
- C. Reincluir en parafina más dura (PF 58-60 °C).
- D. Filo de la cuchilla sucio con parafina: limpiar con un trapo embebido en alcohol o xileno.
- E. Parafina con residuo de xileno: desparafinar el bloque e incluir nuevamente con parafina líquida.
- F. Disminuir la velocidad de corte ya que cortes muy rápidos impiden la correcta formación de la cinta.
- G. Aumentar la inclinación de la cuchilla. El ángulo debe ser determinado por el tipo de micrótom, de la cuchilla y del material a cortar.

Las secciones se desmenuzan y el material se desgarra.

- A. Material blando y pulposo, incompletamente infiltrado debido a una insuficiente deshidratación o clarificación: reinfiltrar e incluir nuevamente. Repetir el procedimiento con una deshidratación más lenta. Aumentar el volumen del deshidratante, utilizar frascos de inclusión de mayor tamaño.
- B. Material muy duro o quebradizo, el ablandamiento fue inadecuado o permaneció demasiado tiempo en xileno.
- C. La parafina se separa del material debido a una inadecuada infiltración por una incompleta deshidratación o a una rápida infiltración.



Tiras rayadas o con raspaduras longitudinales.

- A. La cuchilla está mellada: cambiar el lugar de corte o cambiar la cuchilla.
- B. El filo de la cuchilla puede estar sucio: limpiar con un trapo embebido en alcohol o xileno.
- C. El material puede presentar algunas células de paredes muy duras o cristales.

Las secciones se vuelan.

- A. Es otro de los problemas causados por la electricidad estática producida por la fricción del cortado: aumentar la humedad ambiente colocando un vaso con agua hirviendo cerca del micrótopo.

Extensión y pegado de cortes

En esta etapa las cintas de parafina se cortan en porciones, se colocan sobre el protaobjeto con el adhesivo y se estiran sobre el agua en la placa termostática, para su posterior coloración. Los adhesivos histológicos más comúnmente utilizados son albúmina de Meyer o adhesivo de Haupt. En nuestro caso utilizamos una solución de Sigma®: Poly-L-Lysine.

Tener en cuenta de trabajar sobre un fondo oscuro, como una cartulina gruesa y emplear portaobjetos esmerilados para realizar la identificación individual de cada material con lápiz de grafito.

Preparación de Albumina de Meyer (Tabla 3).

COMPONENTES	CANTIDAD
Clara de Huevo	30 ml
Glicerina pura	30 ml
Fenol	2 grs

Tabla 3: Componentes para la preparación de Albumina de Meyer (60 ml).

1. Batir una clara de huevo a punto nieve y filtrar.
2. Agregar igual volumen de glicerina, el fenol y mezclar con varilla de vidrio.
3. Conservar tapado en frasco de vidrio color caramelo por varias semanas en refrigeración.

Modo de empleo

Untar un portaobjeto con una gota de albúmina y agregar encima unas gotas de agua.

Cortes seriados

Montar los fragmentos de cinta en un orden lógico, de modo que la secuencia avance siempre de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.



Observación

Siempre que se estudia un material determinado es conveniente que se realice en forma progresiva desde lo macroscópico a lo microscópico; es decir, inicialmente a simple vista, luego con lupa o microscopio estereoscópico (disección de órganos), con microscopio óptico (observaciones histológicas) y finalmente si es necesario con microscopio electrónico (caracterización de organelas). Generalmente, el material debe haber sido fijado, cortado, coloreado y montado para que esté en condiciones de ser observado al microscopio. La unidad más utilizada en microscopía es el micrón o micrómetro (μm), que equivale a la milésima parte del milímetro (Tabla 4).

DENOMINACIÓN	ABREVIATURA	FACTOR
Milímetro	mm	10^{-3}
Micrón o micrómetro	μm	10^{-6}
Nanómetro	nm	10^{-9}
Ángstrom	Å	10^{-10}

Tabla 4: Unidades de uso corriente en microscopía.

La observación no es fácil debido a que las células son de pequeño tamaño y más aún, sus componentes (membranas 5-10 nm, ribosoma 19 x 26 nm). Antes de colorearlas son transparentes a la luz visible, por lo que se han diseñado instrumentos que permiten aumentar el poder resolutivo y lograr una mejor definición del material observado (Suárez, et al. 2022).

Desparafinado y coloración doble con Safranina y Fast Green

Para realizar la coloración es necesario eliminar la parafina de los cortes extendidos y pegados en el portaobjeto. Este proceso comúnmente se realiza con xileno, que es muy miscible con la parafina. Una vez desparafinados los cortes, se hidratan para la coloración y posteriormente se deshidratan para el montaje.

Para comenzar el desparafinado, hay que disponer de una batería de 13 botellas color caramelo que contengan los líquidos a emplear en cada paso. El método tradicional consiste en colocar los preparados en cajas de coplin que se van llenando y vaciando de cada líquido correspondiente. Los pasajes se realizan siempre en la misma caja de coplin, recuperando los líquidos.



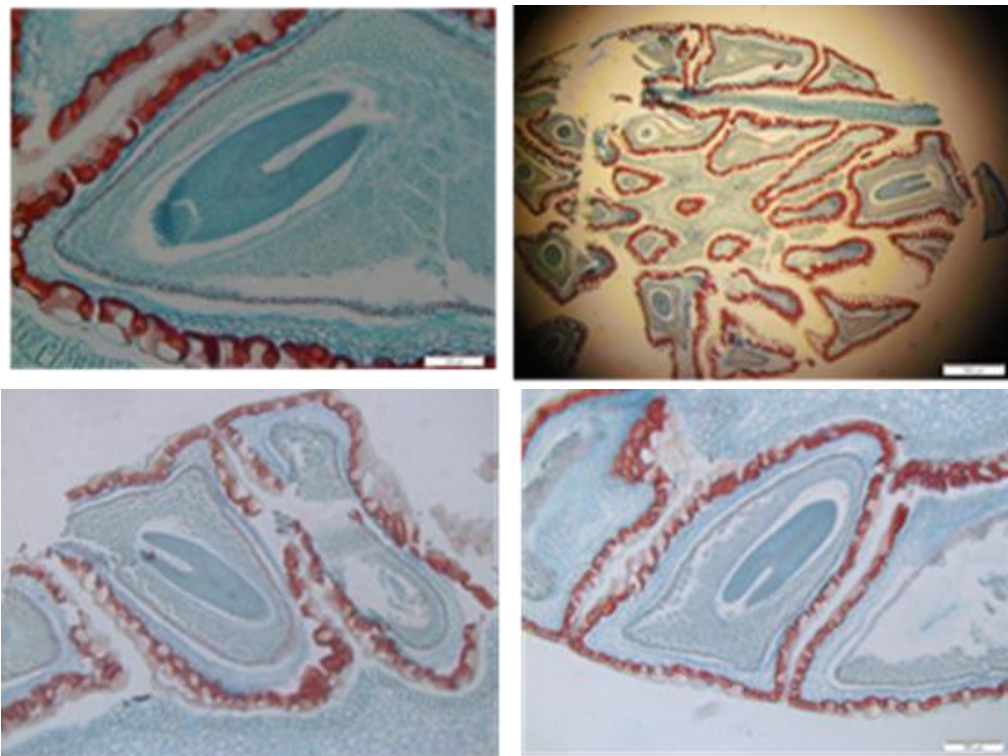
**Metodología:**

1. Colocar los portaobjetos con los cortes extendidos, pegados y secos dentro del coplin con xileno de 10 a 15'.
2. Cambiar el xileno por otro limpio y dejar actuar durante 5'.
3. Realizar pasajes por alcohol etílico 100°, 96°, 90° dejando actuar 1 a 2' cada uno.
4. Colorear con safranina a saturación en alcohol etílico 80°. El tiempo puede variar de 1 a 24 h dependiendo del tejido y de la calidad del colorante.
5. Realizar lavados con alcohol etílico 80°, 90°, 96° durante 1' cada uno.
6. Colorear con fast Green a saturación en alcohol etílico 100° de 15 a 30'.
7. Lavar rápidamente con alcohol etílico 100° 2 veces durante 1 a 2' en cada uno.
8. Dejar en xileno hasta el montaje final.
9. Montaje definitivo con bálsamo natural o artificial.

Resultado de la doble coloración:

La safranina (rojo) colorea las células con paredes lignificadas como por ej: elementos de vasos, traqueidas, fibras; como así también núcleos y cutícula. En el caso del fast Green (celeste verdoso) tiñe las células con paredes no lignificadas como por ej: parénquima, elementos del tubo criboso y el citoplasma.

El fast Green puede ser reemplazado por otro colorante citoplasmático como azul de anilina al 1% en alcohol etílico 96°.



Cortes histológicos de diferentes etapas de embriogénesis en el género Nierembergia.



Montaje definitivo

El montaje es el último paso del proceso de inclusión. Consiste en recubrir los cortes con una capa delgada de una sustancia transparente y estable llamada medio de montaje que a su vez se cubre con un cubreobjeto, para una duración del preparado a largo plazo.

Metodología:

1. Con una pinza, retirar el portaobjeto del coplin.
2. Disponer el portaobjeto sobre un papel absorbente con los cortes hacia arriba, y aplicar una gota del medio de montaje sobre el portaobjeto. Colocar un cubreobjeto limpio y de tamaño adecuado para contener toda la muestra.
3. Hacer contacto desde un extremo dejando deslizar el cubreobjeto suavemente para evitar que se formen burbujas de aire.
4. Ejercer una leve presión con la pinza en el centro del cubreobjeto para afirmarlo.
5. Colocar el preparado en posición horizontal hasta que evapore el xileno y se seque, evitando el deslizamiento del cubreobjeto. Este procedimiento es necesario realizarlo bajo campana. Se dejan allí 24 h.
6. Si queda excedente del medio de montaje, rasparlo con una hoja de afeitar.
7. Limpiar los restos de colorante que pudieron quedar alrededor del cubreobjeto con un trapo de algodón humedecido en agua y una gota de detergente. Luego secar con trapo limpio.
8. Rotular con una etiqueta o marcador permanente y guardarlo para su futura observación.

Recomendación:

Al utilizar el medio de montaje de secado rápido (Bálsamo de Canadá, Biopack®), emplear una pipeta Pasteur descartable y cargarla cada vez que se va a utilizar. Mantener el frasco cerrado debido a que se endurece rápidamente.

Protocolo tentativo de tiempos de inclusión

Deshidratación (Tabla 5). Clarificación (Tabla 6). Infiltración (Tabla 7).

Alcohol etílico (EtOH)	Ápice de tallo, raíz y raíces primarias	Pecíolos, tallos herbáceos, flores pequeñas, anteras y ovario	Hojas	Material de herbario rehidratado
70°	10 a 30 min	1 h	1 h	1 h
80°	"	1 a 12 h	2 a 12 h	12 a 24 h
90°	"	1 a 12 h	2 a 12 h	12 a 24 h
96°	"	1 a 24 h	1 a 24 h	24 h
100°	"	1 a 2 h	1 a 2 h	1 a 2 h

Tabla 5: Deshidratación.



Alcohol etílico (EtOH)	Ápice de tallo, raíz y raíces primarias	Pecíolos, tallos herbáceos, flores pequeñas, anteras y ovario	Hojas	Material de herbario rehidratado
EtOH 100° - xileno (3:1)	30 min a 1 h	1 a 3 h	1 a 3 h	2 a 4 h
EtOH 100° - xileno (1:1)	30 min a 1 h	3 h	1 a 3 h	2 a 4 h
EtOH 100° - xileno (1:3)	30 min a 1 h	3 h	1 a 3 h	2 a 4 h
Xileno puro	1 h	1 a 3 h	1 a 3 h	2 h

Tabla 6: Clarificación.

Alcohol etílico (EtOH)	Ápice de tallo, raíz y raíces primarias	Pecíolos, tallos herbáceos, flores pequeñas, anteras y ovario	Hojas	Material de herbario rehidratado
Xileno- parafina (3:1)	1 h	1 a 6 h	3 a 6 h	2 a 12 h
Xileno- parafina (1:1)	1 h	1 a 6 h	3 a 6 h	1 noche
Xileno- parafina (1:3)	1 h	1 a 6 h	3 a 6 h	1 noche
Xileno- parafina puro	30 h a 1 noche	1 noche	1 noche	1 noche

Tabla 7: Infiltración.

2.3. Colorantes

Un colorante es una sustancia que posee color y es capaz de cederlo a un tejido, al combinarse con otra sustancia.

Si el material que se tiñe queda de un color semejante al del colorante usado, decimos que el colorante es ortocromático (ejemplo: safranina). Algunos colorantes tiñen estructuras en 2 colores distintos y se los llama metacromáticos (ejemplo: violeta de cresilo, tiñe de color violeta los tejidos con paredes celulares primarias y color verde las paredes celulares secundaria). El azul de toluidina colorea al citoplasma de azul mientras que las lipoproteínas se colorean de rojo.

Existen colorantes naturales extraídos de productos animales o vegetales como el carmín; la orceína y la hematoxilina. Y otros artificiales extraídos del alquitrán y derivados del benceno como por ejemplo safranina, verde rápido (fast Green), violeta y azul de cresilo y rojo neutro.

Tipos de coloraciones generales

1. **Directos:** la coloración se produce simplemente por inmersión en el baño de colorante ej: safranina.



2. **Indirectos:** es necesario que el material a colorear sea tratado por una sustancia que lo prepare para recibir al colorante denominado mordiente. Ejemplos de mordientes: carbonato de sodio 2%, cloruro de bario al 2%, cromato de amonio al 4%, permanganato de potasio al 1%. Un ejemplo de colorante es la hematoxilina.
3. **Combinados:** para la coloración se emplean varios colorantes y puede ser:
 - a) *Combinada sucesiva:* cada colorante actúa de manera independiente y se fija a un elemento determinado como es el caso de safranina-verde rápido.
 - b) *Combinada simultánea:* se prepara la mezcla de líquidos colorantes y al introducir el material se produce la coloración como es el caso de carmin-verde mirande. Se recomienda utilizar la coloración sucesiva que ofrece mejores resultados.

Coloraciones específicas

Se utilizan para reconocer sustancias o estructuras celulares determinadas (Tabla 8).

SUSTANCIA O ESTRUCTURA CELULAR	COLORANTE
Almidón	Lugol
Citoplasma	Fucsina ácida, azul de anilina, verde rápido, verde de malaquita o naranja G
Calosa	Azul de resorcina o azul de anilina
Cromosomas	Hematoxilina, safranina, carmín o verde de metilo
Grasas	Sudán III o IV
Laminilla media	Rojo de rutenio o hematoxilina férrica
Mitocondrias	Verde Jano; cristal violeta o hematoxilina férrica de Heidenhains
Núcleos	Hematoxilina o safranina
Paredes celulósicas	Azul de anilina, hematoxilina de Delafield, verde rápido o rojo Congo
Paredes cutinizadas	Safranina, verde de metilo, fucsina ácida o azul de metilo
Paredes lignificadas	Safranina, violeta de cresilo, verde iodo o verde de metilo
Paredes primarias de células vivas y vacuolas	Rojo neutro
Proteínas	Safranina

Tabla 8: Coloraciones específicas.

Coloraciones vitales

Los métodos de coloración descritos hasta el momento no son compatibles con la vida de las células, pero existe una forma de coloración vital que no afecta la vida de la misma, por ejemplo el rojo neutro y el verde Jano, éstos son muy poco tóxicos y se emplean en soluciones muy diluidas. (Suárez, et al. 2022).



Montaje

Para obtener un preparado microscópico se debe ubicar entre un portaobjeto y un cubreobjeto, en un medio que sea apropiado para la observación y la conservación del mismo.

Los medios de montaje pueden ser **líquidos** (agua; lactofenol; agua-glicerina) o **sólidos** (gelatina-glicerina; bálsamo de Canadá o sintéticos) (Suárez, et al. 2022).

Bálsamo de Canadá: también llamado trementina de Canadá o bálsamo de abeto. Está hecho de la resina del árbol de abeto balsámico (*Abies balsamea*) de América del Norte boreal. La resina, disuelta en aceites esenciales, es un líquido viscoso, pegajoso, incoloro o amarillento que se convierte en una masa de color amarillento transparente cuando los aceites esenciales se han dejado evaporar. En biología, por ejemplo, se puede utilizar para conservar muestras microscópicas utilizando el bálsamo de Canadá para pegar la disposición en conjunto y encerrar la muestra para conservarla.

Cuando se requiere hacer observaciones rápidas, sin que interese la conservación de los materiales, se utiliza agua destilada o glicerina diluida en agua al 50%.

3. Microscopía de Fluorescencia (Zarlavsky, 2014)

La microscopía de fluorescencia es una importante herramienta para observar la distribución de moléculas específicas en células y tejidos. Se basa en la propiedad que presentan algunos átomos o moléculas de absorber luz en un rango particular de longitudes de onda y emitir luz en una longitud de onda mayor.

Ciertas sustancias presentes en vegetales, como la clorofila y la lignina, poseen la propiedad de emitir fluorescencia al ser excitadas por luz de longitud de onda corta, principalmente en el rango ultravioleta (UV) y azul. Este fenómeno se denomina autofluorescencia o fluorescencia primaria, ya que es una característica intrínseca de estas moléculas. En contraste, cuando las sustancias de interés no presentan autofluorescencia, se puede inducir mediante el uso de fluorocromos o colorantes fluorescentes. Estas moléculas se unen específicamente a ciertas estructuras o componentes celulares, permitiendo su visualización. A este proceso se le conoce como fluorescencia inducida o secundaria.

En un microscopio de fluorescencia, la muestra se ilumina con una fuente de luz que contiene las longitudes de onda de excitación adecuadas para el fluorocromo utilizado. Un conjunto de filtros ópticos específicos selecciona la luz de excitación y bloquea la luz de excitación dispersa, permitiendo el paso únicamente de la luz emitida por el fluorocromo (fluorescencia). De esta manera, solo se visualizan las estructuras a las



que se han unido los fluorocromos, destacando sobre un fondo oscuro. Si la luz de excitación incidente es ultravioleta, invisible al ojo humano, solo se apreciarán las estructuras que emiten luz en el rango visible del espectro electromagnético, es decir, las estructuras fluorescentes.

Para una observación correcta de la fluorescencia, se recomienda:

1. Trabajar con el mínimo de luz ambiente.
2. Encender la lámpara UV del microscopio y esperar a que se estabilice.
3. Alejar todo lo posible el condensador de luz transmitida, para evitar que la luz que atraviesa la muestra se refleje en él y disminuya el contraste entre las estructuras fluorescentes y las no fluorescentes.
4. Quitar los filtros no esenciales para la observación.

Al finalizar la observación, se recomienda apagar la lámpara de alta presión de mercurio y dejarla enfriar durante al menos una hora antes de volver a utilizarla (Zarlavsky, 2014).

SUSTANCIA	REACTIVO/COLORANTE/FLUOROCROMO	RESULTADO
Calosa	Azul de anilina	Amarillo verdoso
Lípidos	Azul de nilo	Amarilla
Suberina y cutina	Naranja de acridina	Naranja brillante
Células dañadas	Ioduro de propidio	Rojo
Células metabólicamente activas	Diacetato de fluoresceína	Verde
Lignina	Naranja de acridina	Amarillo a rojo

Tabla 9: Reacciones histoquímicas para microscopía de fluorescencia.

3.1. Microscopía de fluorescencia sin fijación

3.1.1. Viabilidad de polen por fluorescencia

Uno de los métodos que permite estudiar la viabilidad de los granos es la observación con luz ultravioleta.

La técnica de doble marcaje que emplea diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (PI) se ha utilizado eficazmente para marcar protoplastos de plantas muertas y viables. Greissl (1989) fue el primero en sugerir el uso de FDA y PI para evaluar la calidad del polen al poder diferenciar tanto el polen muerto como el viable.





El diacetato de fluoresceína (FDA) se acumula en el citoplasma de los granos de polen viables que tienen membranas plasmáticas intactas, ya que las esterasas intracelulares lo hidrolizan a fluoresceína. Por otro lado, el yoduro de propidio (PI) entra en los granos de polen no viables (aquellos con membranas celulares dañadas) y se une a sus ácidos nucleicos. Esta combinación de colorantes permite distinguir la fluorescencia amarillo-verdosa de los granos de polen viables (gracias a la fluoresceína del FDA) de la fluorescencia roja de los no viables (debido a la unión del PI al ADN/ARN). La base de esta reacción fluorocromática radica en que el FDA puede penetrar las células vivas y ser retenido, mientras que el PI solo puede teñir el material genético de las células que han perdido la integridad de su membrana.

Materiales:

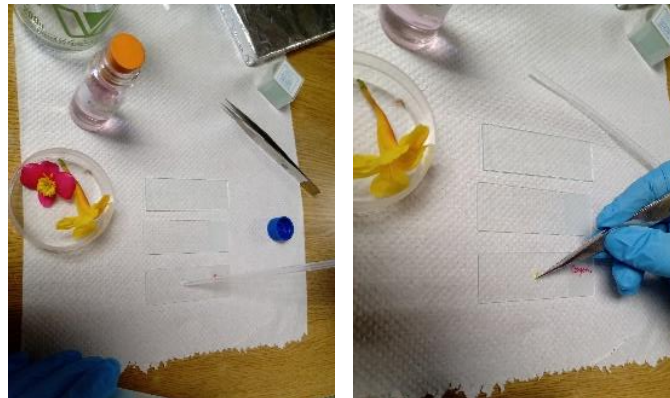
Granos de polen fresco, solución de sacarosa 0,5M, solución de fluorocromos FDA al 5% (diacetato de fluoresceína) preparada de la siguiente manera: Solución Stock 5 mg/1ml acetona. Luego se toma una alícuota de 200 μ l = 0,2 ml (FDA stock) en 10 ml de agua destilada y se utiliza inmediatamente. PI (yoduro de propidio) al 0,02% (1 mg/50 ml de agua bidestilada). Ambas soluciones (stock y de trabajo) se conservan a 4 °C. Portaobjeto, cubreobjeto, pipetas Pasteur, microscopio de epi-fluorescencia.





Procedimiento:

1. Tomar la antera de la flor, desprender suavemente los granos de polen sobre el portaobjeto, agregar 2 gotas de la solución de sacarosa 0,5M y esperar 15' para hidratarlos.



2. Agregar 2 gotas de FDA (diacetato de fluoresceína) y 1 gota de PI (ioduro de propidio) esperar 10' a temperatura ambiente manteniendo cubierta la muestra con una tapa protegida con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz y preservar la intensidad de los fluorocromos.



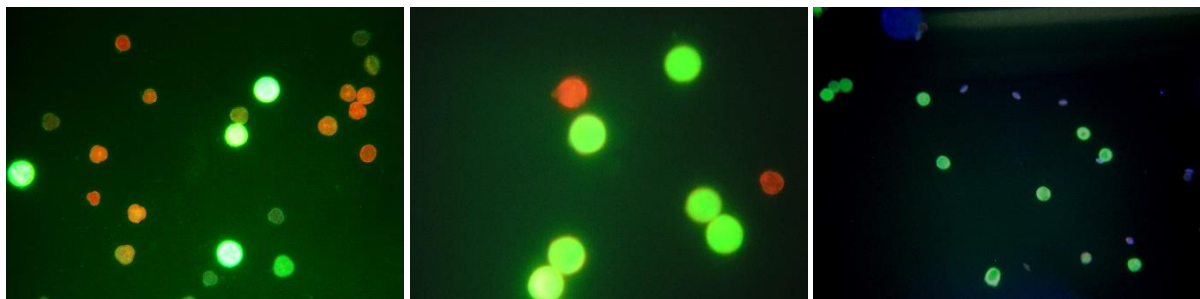
3. Colocar el cubreobjeto y sacar el exceso de líquido con un papel.





4. Observar en el microscopio de epi-fluorescencia (OLYMPUS BX 50) con filtros de excitación y emisión 330-385 nm y 420 nm respectivamente.

Se recomienda observar inmediatamente después de finalizada la preparación, ya que a medida que transcurre el tiempo, la intensidad de la fluorescencia se pierde gradualmente.



Handroanthus híbrido.

Calibrachoa híbrido.

Jacaranda híbrido.

Resultado:

Los granos de polen verde fluorescente se consideran viables y los granos rojos, inviables.

Consideraciones

El diacetato de fluoresceína (FDA) y sus derivados son moléculas no fluorescentes que se difunden en las células y son hidrolizadas por esterasas intracelulares no específicas para dar productos fluorescentes. Los productos fluorescentes pueden acumularse solo en aquellas células que tienen membranas celulares intactas; por lo tanto, las células muertas con membranas con fugas no se tiñen. La cinética precisa del transporte de membrana y la hidrólisis intracelular de FDA y sus análogos (como CDCFDA) están relacionadas con las funciones celulares, por lo que el etiquetado de FDA se puede usar para monitorear células mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia de las células marcadas con colorantes FDA varía considerablemente entre las líneas celulares y las cepas, probablemente debido a las diferencias en la actividad de la esterasa intracelular. CFSE es un derivado de FDA reactivo con amina que se usa ampliamente para monitorear la proliferación celular con un citómetro de flujo.

https://logosbio.com/es/cell_counting_acc/fluorescein-diacetate-propidium-iodide-stain-fda-pi-stain

El yoduro de propidio (PI) es un agente intercalante fluorescente que se puede utilizar para teñir células y ácidos nucleicos. El PI se une al ADN intercalándose entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia. Cuando está en una solución acuosa, el PI tiene un máximo de excitación fluorescente de 493 nm (azul-verde) y un máximo de emisión de 636 nm (rojo). En microscopía se utiliza para visualizar el núcleo y otros orgánulos que contienen ADN. El yoduro de propidio no es permeable a la membrana, lo que lo hace útil para diferenciar células necróticas, apoptóticas y sanas, según la integridad de la membrana. El PI también se une al ARN, lo que requiere un tratamiento con nucleasas para distinguir entre la tinción de ARN y ADN. El PI se utiliza ampliamente en la tinción fluorescente y en la visualización de la pared celular vegetal. (https://hmn.wiki/es/Propidium_iodide)



VIDEO



Viabilidad de grano de polen por fluorescencia

(Instituto de Floricultura – CIRN – INTA)

<https://youtu.be/rjmtYq4mSsE>

3.2. Microscopía de fluorescencia con fijación

3.2.1. Observación de crecimiento de tubo polínico en estilo

El estudio del crecimiento del tubo polínico a través del estilo y su llegada al óvulo es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético de plantas, ya que proporciona un indicador temprano de una posible fertilización exitosa. Observar el desarrollo del tubo polínico permite evaluar la compatibilidad entre el polen y el pistilo, y determinar el sitio donde se produce la detención o el crecimiento anómalo del tubo polínico, lo cual aporta información crucial sobre los mecanismos de incompatibilidad (como se menciona en Wheeler, 2001). El tubo polínico presenta calosa (un polisacárido compuesto principalmente por β -1,3-glucano) en su pared celular. A medida que el tubo crece a través del estilo, se forman tapones de calosa que separan las zonas funcionalmente activas del tubo de las zonas ya recorridas. La tinción con azul de anilina permite visualizar estos tapones de calosa, ya que el azul de anilina se une específicamente a la calosa y emite fluorescencia bajo luz ultravioleta. Por lo tanto, la técnica de tinción con azul de anilina y microscopía de fluorescencia es una herramienta valiosa para analizar la germinación del polen in vivo (en el gineceo) y el crecimiento del tubo polínico dentro del pistilo, incluyendo el ovario y los óvulos. La presente técnica se basa en dicha especificidad y su posterior observación con microscopio de epi-fluorescencia y filtro UV (Martin, 1959).

Después de la tinción con azul de anilina al 1% en agua destilada y bajo la acción de la luz ultravioleta, la calosa, un polisacárido de síntesis, presente en los tubos polínicos fluoresce amarillo brillante o amarillo verdoso, lo cual permite identificarla fácilmente (Zarlavsky, 2014).

Materiales:

Pistilos de flores frescas o fijados en FAA o en alcohol etílico, hidróxido de sodio (NaOH) 0,6N, hipoclorito de sodio al 50%, cajas de Petri, azul de anilina 0,1% en agua, microtubos de 2 ml, portaobjeto, cubreobjeto 24x 60 mm, microscopio de epi-fluorescencia (OLYMPUS BX 50) con filtros de excitación y emisión 330-385 nm y 420 nm respectivamente.





Procedimiento:

1. Colectar pistilos a intervalos regulares post-polinización.
2. Fijar en FAA o alcohol etílico, por al menos 24 horas.
3. Enjuagar con agua destilada.



4. Tratar con NaOH 0,6N a temperatura ambiente durante toda la noche o incubar a 40-45 °C el tiempo requerido hasta ablandarlo y aclararlo, para permitir una adecuada penetración del colorante.

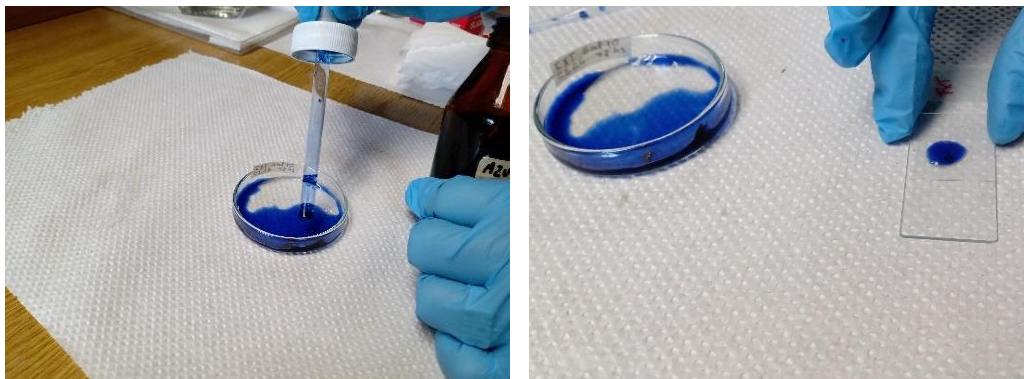


5. Tocar suavemente para controlar el ablandamiento.
6. Eliminar el NaOH con abundante agua destilada.
7. Clarificar con el hipoclorito de sodio al 50% hasta que el material se torne blanco.





8. Eliminar el hipoclorito con bastantes enjuagues en agua destilada.



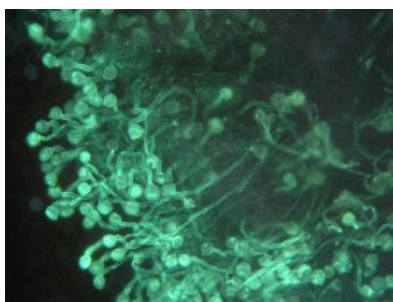
9. Transferir el material a un portaobjeto y teñir con 2 o 3 gotas de azul de anilina 0,1%. Es recomendable filtrar el colorante antes de utilizar.

10. Cubrir con un cubreobjeto y presionar levemente, para evitar que se formen burbujas.

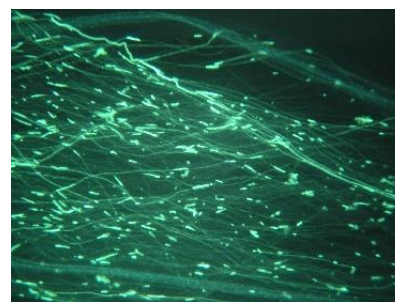
11. Retirar el exceso de colorante con un papel absorbente y observar con microscopio de epi-fluorescencia.



N. graveolens x C. longistila



N. Graveolens x petunia



N. ericoide x N. scoparia

Resultados:

Los tubos polínicos con tapones de calosa fluorescen amarillo brillante o amarillo verdoso. La cantidad y distribución de la calosa es variable, según las especies tratadas.



VIDEO



Crecimiento TP en Estigma
(Instituto de Floricultura – CIRN – INTA)

<https://youtu.be/V6NyFhYaoN0>



Bibliografía

Procedimiento de fijación del material a estudiar en el laboratorio

Zarlavsky, Gabriela E. (2014) Histología vegetal: Técnicas simples y complejas Sociedad Argentina de botánica.
<https://botanicaargentina.org.ar/libros-de-la-sab/histologia-vegetal-tecnicas-simples-y-complejas>

D'Ambrogio, Ana (1986) Manual de tecnicas en histologia vegetal.

Procedimiento para observar la viabilidad del grano de polen: Técnica de Alexander (1969). Modificada

Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain technology. Vol. 44 N° 3.

Shivanna, KR & VK. Sawhney. 2005. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press, Cambridge, 334 pp.

Harrington, J.F. 1970. Seed and pollen storage for conservation of plant gene resources. En Genetic Resources in Plants: Their Exploration and Conservation, Oxford and Edinburgh: Blackwell, 501-521 pp.

Germinación in vitro de granos de polen

Shivanna and Sawhney (2005). Pollen biotechnology for crop production and improvement. P.334.

Dickinson, D.B. (2005). Permeability and respiratory properties of germinating pollen. Physiol. Plant. 20: 118-127

Pfahler, P.L. (1967^a). In Vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. I. Calcium and boron effects. Can. J. Bot. 45: 839-845 en Shivanna and Sawhney (2005). Pollen biotechnology for crop production and improvement. P.334

Shuangshuang Liu (2021) The essential roles of sugar metabolism for pollen development and male fertility in plants.2021_ The Crop Journal. Volume 9, Issue 6, December 2021, Pages 1223-1236

Abhishek Naik (2015) In vitro Teasle Gourd Pollen Germination and Pollen Tube Development as Affected by Sucrose, Boric Acid, and Inorganic Salts.

<https://doi.org/10.1080/19315260.2015.1008665>

Scott, E.G. 1960. Effect of supra optimal boron levels on respiration and carbohydrate metabolism of *Helianthus annuus*. Plant Physiol. 35:653–657.

Stangoulis, J.C.R., R.J. Reid, P.H. Brown, and R.D. Graham. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. Planta 213:142–146

Feijo, J.A., R. Malho, and G. Obermeyer. 1995. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. Protoplasma 187:155–167

Biswas, K., S. Mondal, and S. Mandal. 2013. Role of some nutrients on in vitro pollen germination of *Solanum torvum* Swartz. Cibtech J. Bio-protocols 2(1):32–38

Receptividad estigmática

Shivanna K R, Rangaswamy N S. 1992. Pollen biology: A Laboratory Manual. Berlin: Springer-Verlag.



Galen C, Plowright R C. 1987. Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Canadian Journal of Botany* 65: 107-111.

ZEISLER M. 1938. Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beih Bot Centralblatt* 58: 308-318.

Ferreira, J. A., Ledo, C. A., Souza, F. V., Conceicao, J. Q., Rossi, M. L., & Souza, E. H. (2021). Stigma structure and receptivity in papaya (*Carica papaya* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, DOI 10.1590/0001-3765202120190605

Procesamiento de epidermis: Técnica de peeling

Zarlavsky, Gabriela E. (2014) *Histología vegetal: Técnicas simples y complejas* Sociedad Argentina de botánica. <https://botanicaargentina.org.ar/producto/histologia-vegetal-tecnicas-simples-y-complejas-gabriela-e-zarlavsky>

Wu, H.; Jiang, L.; Li, J.; Lu, M.; An, H. (2023) Polyploid Induction and Identification of *Rosa roxburghii* f. *eseiosa*. *Plants* 2023, 12, 2194. <https://doi.org/10.3390/plants12112194>

Bibliografía complementaria

Kimberly L.H. Investigating Polyploidy: Using Marigold Stomates & Fingernail Polish. Source: The American Biology Teacher, 64(5):364-368. National Association of Biology Teachers. DOI: [http://dx.doi.org/10.1662/0002-7685\(2002\)064\[0364:IPUMSF\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1662/0002-7685(2002)064[0364:IPUMSF]2.0.CO;2)

Técnica de inclusión de tejidos en Parafina para Microscopía óptica.

Zarlavsky, Gabriela E. (2014) *Histología vegetal: Técnicas simples y complejas* Sociedad Argentina de botánica. <https://botanicaargentina.org.ar/producto/histologia-vegetal-tecnicas-simples-y-complejas-gabriela-e-zarlavsky>

Susana A. Suárez ... [et al.]. *Técnicas de histología vegetal: un abordaje para su utilización en microscopía óptica - 1a ed.* - Río Cuarto: UniRío Editora, 2022. Libro digital, PDF - (Vinculación y educación) <https://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2022/11/978-987-688-506-5.pdf>

Viabilidad de grano de polen por fluorescencia

Zarlavsky, Gabriela E. (2014) *Histología vegetal: Técnicas simples y complejas* Sociedad Argentina de botánica. <https://botanicaargentina.org.ar/producto/histologia-vegetal-tecnicas-simples-y-complejas-gabriela-e-zarlavsky>

Greissl, R. (1989). Vitality analysis of monadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. In *scientific and technical information*, vol IX N° 5, pp 180-184.

Ascari, L. (2020). Quantitative methods in microscopy to assess pollen viability in different plant taxa. *Plant Reproduction* 33:205–219 <https://doi.org/10.1007/s00497-020-00398-6>

Diacetato de carboxifluoresceína (FDA)

<https://www.cidsamexico.com/productos/cfse-5-and-6-carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester/>

Yoduro de propidio (PI) (https://hmn.wiki/es/Propidium_iodide)



Bibliografía complementaria

Shivanna and Sawhney (2005). Pollen biotechnology for crop production and improvement. P.334

Harrington, J.F. (1970). Seed and pollen storage for conservation of plant gene resources. In Genetic Resources in Plants: Their Exploration and Conservation, pp. 501-521. Oxford and Edinburgh: Blackwell.

Crecimiento de tubo polínico en estilo por fluorescencia

Martin, F. W. (1959) Staining and observing pollen tubes by means of fluorescens. Stain Tech. 34: 125-128.

Wheeler, M.J.; Franklin - Tong V.E. and Franklin, F.C.H. (2001). The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. New Phytologist 151: 565-584.

Zarlavsky, Gabriela E. (2014) Histología vegetal: Técnicas simples y complejas Sociedad Argentina de botánica. <https://botanicaargentina.org.ar/producto/histologia-vegetal-tecnicas-simples-y-complejas-gabriela-e-zarlavsky>

Trabajos realizados en el Instituto de Floricultura

Procedimiento para observar la viabilidad del grano de polen: Técnica de Alexander (1969). Modificada

- Tesis doctoral Desarrollo de germoplasma nativo de *Lippia integrifolia* (Gris.) Hier. Una especie de importancia aromática y medicinal. Lic. en Biología Jesica Iannicelli (2016) info:eu-repo/semantics/openAccess <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Germinación in vitro de granos de polen

- CALIBRACHOA POLLEN VIABILITY OVER TIME AT VARYING STORAGE TEMPERATURES. (2013) Cardone, S., Bernardo, L., Facciuto, G., Coviella, A. and Soto, M.S. Acta Hort. 1000, 445-450. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.1000.62 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1000.62>
- Requerimientos para la germinación in vitro de granos de polen en Calibrachoa. (2010) Coviella M A., Cardone Susana, Bernardo Liliana, Soto Silvina. V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. XII Jornadas Nacionales de Floricultura.

Receptividad estigmática

- Estudios de la receptividad estigmática en el género *Calibrachoa*. (2010) Milicia V, Coviella, M.A, Soto S. V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. XII Jornadas Nacionales de Floricultura.

Procesamiento de epidermis: Técnica de peeling

- Tesis doctoral Desarrollo de germoplasma nativo de *Lippia integrifolia* (Gris.) Hier. Una especie de importancia aromática y medicinal. Lic. en Biología Jesica Iannicelli (2016) info: eu-repo/semantics/openAccess <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>





Técnica de inclusión de tejidos en Parafina para Microscopía óptica.

- *In vitro* propagation of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers of in vitro-cultured plants. Iannicelli, Jesica; Pérez de la Torre, Mariana; Coviella, Ma. Andrea. Revista de la Facultad de Agronomía; vol. 115, no. 1. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
- Tesis Doctoral Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento. Soto, María Silvina (2007)
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4146_Soto.pdf
- Tesis Doctoral Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* A.I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo. Facciuto, Gabriela R. (2007)
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4149_Facciuto.pdf

Viabilidad de grano de polen por fluorescencia

- A novel source of cytoplasmic male sterility in *Calibrachoa pubescens*. Noemí Colombo, Ma Andrea Coviella, Juan Carlos Hagiwara <https://doi.org/10.14295/oh.v23i3.1061>

Crecimiento de tubo polínico en estilo por fluorescencia

- BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Rhodophiala bifida* (Amaryllidaceae): ASPECTOS DE APLICACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO. FACCIUTO, G.1; COVIELLA, A.1 & BUGALLO, V. (2021) Revista FAVE - Ciencias Agrarias 20
- Mejoramiento de Plantas Nativas: Altas Temperaturas como herramienta para superar barreras Precigóticas en el complejo *Calibrachoa-Nierembergia*. Víctor José Milicia, M. A. Coviella, María Silvina Soto, y Angel Chiesa (2016). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences. Ex Agro-Ciencia. Volumen 32 N°2. <https://www.researchgate.net/publication/306960455>
- Relación Tubo Polínico/Pistilo En Cruzamientos interespecíficos en el Género *Nierembergia* (Solanaceae). Víctor José Milicia, M. A. Coviella, Gabriela Facciuto, María Silvina Soto. (2015). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences. Ex Agro-Ciencia. Volumen 31 N°1 Pag. 53-60
<https://www.researchgate.net/publication/283479754>
- Compatibility study in intergeneric crosses between *Nierembergia* and *Calibrachoa*. Soto, M.S., Coviella, A., Facciuto, G. and Milicia, V. (2013). Acta Hort. 1000, 487-491. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.1000.69. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1000.69>
- Estudios de la receptividad estigmática en el género *Calibrachoa*. Milicia V, Coviella, M.A, Soto S. (2010) V Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. XII Jornadas Nacionales de Floricultura
- Observaciones del crecimiento del tubo polínico en *Tabebuia* y *Nierembergia*: Una herramienta para el mejoramiento. Coviella, M.A, Soto, M.J. Pannunzio y G. Facciuto (2005) 7tas Jornadas Nacionales de Floricultura



Diccionario

Solución tampón: También conocida como solución amortiguadora o solución buffer. Este tipo de solución es una mezcla acuosa diseñada para mantener un pH relativamente constante, incluso cuando se añaden ácidos o bases adicionales. Esto se logra mediante la presencia de un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado, en la misma solución. La solución tampón puede neutralizar tanto los ácidos como las bases añadidas, lo que ayuda a mantener el pH estable.

<https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/solucion-tampon>

FAA: Es el fijador más utilizado para estudios morfológicos e histológicos en vegetales. Éste desnaturaliza las proteínas por precipitación y está compuesto por una mezcla balanceada de tres fijadores simples: formol, alcohol etílico y ácido acético.

Microlitro (μl): Un microlitro es una unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo μl o μL. Es una medida de volumen utilizada en análisis de laboratorio y experimentos científicos.

Safranina: Colorante catiónico que aporta color rojo a las estructuras histológicas. Es muy usada en histología vegetal donde tiñe de rojo los núcleos y la lignina de las paredes celulares secundarias, además de otras estructuras. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/s-colorante-safranina.php>

Fast Green: La tinción vegetal por excelencia se caracteriza por usar la safranina, que presenta afinidad por las paredes lignificadas (paredes secundarias), y un segundo colorante, el verde rápido, con afinidad por las paredes no lignificadas (paredes primarias).

<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-safranina-a-v.php>

Caja de coplin: Su diseño permite la manipulación de los portaobjetos. La tapa con la que cuenta reduce la evaporación del solvente y derrames del líquido durante el almacenaje.

Cápsulas para consumo humano: La cápsula puede ser dura o blanda dependiendo de la cantidad de glicerina en la gelatina. Las cápsulas duras se utilizan para portar los fármacos en polvos, aunque en ocasiones albergan otras formas galénicas como granulados, microcápsulas o comprimidos. Se consiguen en comercios de productos naturales o dietéticos o en laboratorios farmacéuticos.

Cámara húmeda: Es un sistema cerrado capaz de mantener una atmósfera saturada de humedad bajo condiciones estables de temperatura. Consiste en colocar en un recipiente (placa petri) un papel absorbente humedecido con agua destilada.