

TECNICAS ARGENTICAS EN MATERIALES VEGETALES¹

POR CRISTINA G. DIZEO DE STRITTMATTER²

ABSTRACT

Silver impregnation technics which up to now were used in animal histology only were tested here in plant material. The experience was made with meristematic and adult tissues. The employed technics were: The nuclear technic in hot medium, the nucleous-plasmatic technic, the Achúcarro technic for tissue-culture and the Gomori-reticulum technic.

The results are the following: net coloration of nucleous and tonal differentiation of tissues going from pale-yellow to dark-brown.

Being the silver technics of easy and quick realization it is useful to incorporate them as one of the general plant histology procedures.

INTRODUCCION

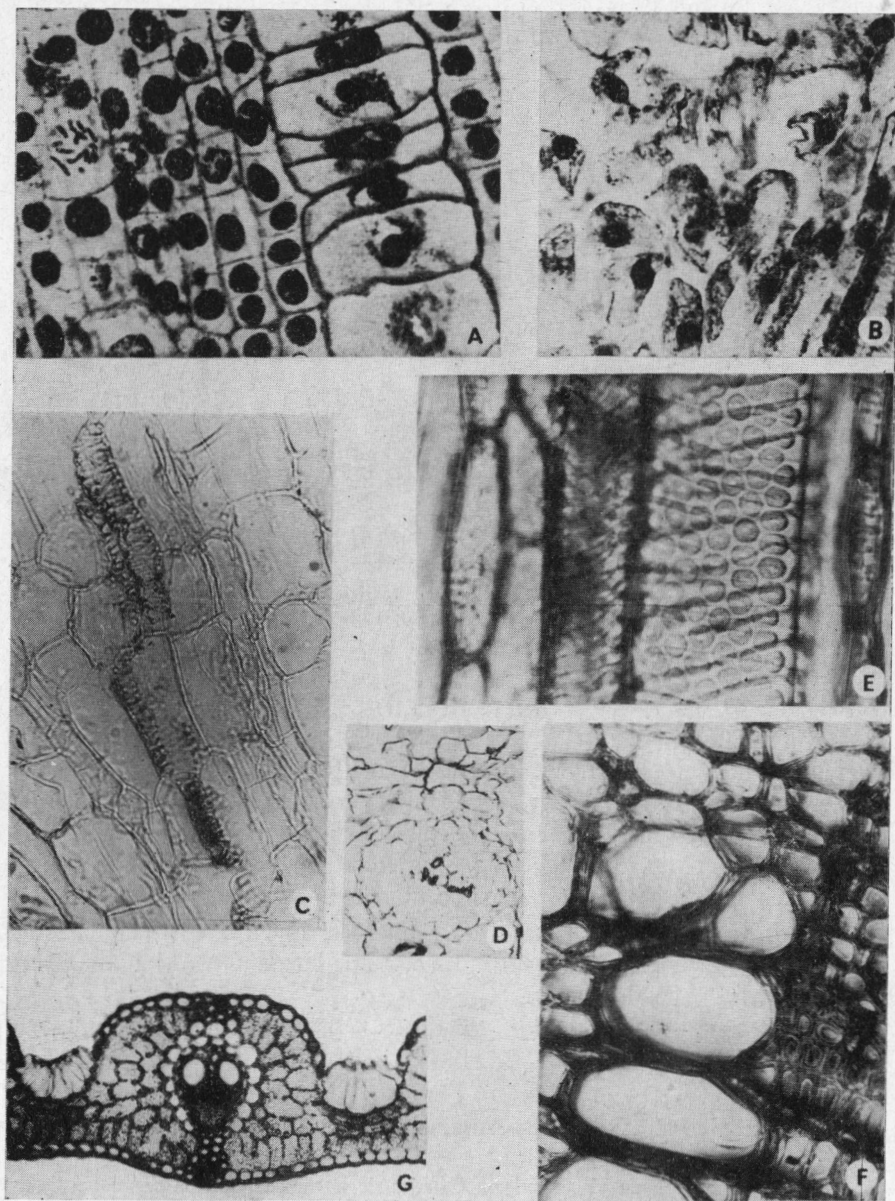
Hasta ahora se ha trabajado mucho con técnicas argentícas sólo en materiales animales, con las que se han obtenido resultados muy positivos. En razón de que son técnicas rápidas que evitan la decoloración del material con el transcurso del tiempo, debido a la precipitación del metal, se ha decidido probarlas en el tratamiento de materiales vegetales.

En consecuencia, se ensayaron las siguientes: Nuclear en caliente, Núcleo plasmática, Achúcarro para cultivo, Retículo de Gomori (Lám. 1), en materiales vegetales.

Las técnicas y los resultados obtenidos se describen a continuación:

¹ Comunicado en las XV Jornadas Argentinas de Botánica en Buenos Aires, Abril 1976.

² Técnica en Histología Vegetal de la Cátedra de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Miembro de la Carrera del Técnico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.



Lám. 1. — Aplicación de las técnicas argentícas a materiales vegetales: A, nuclear en caliente en ápice de raíz de *Zea mays*; B, núcleo plasmática, en ápice de tallo de *Vicia faba*; C-D, Achúcarro, en el cultivo de callo cotiledonar de *Diplotaxis tenuifolia*; E-G, retículo de Gomori: E, F, en cortes longitudinal y transversal de tallo de *Tilia mollkei*; G, en corte transversal de hoja de *Festuca arundinacea*.

MATERIALES ENSAYADOS (Tab. 1)

Se trabajó con la impregnación en masa en las técnicas nucleares (nuclear en caliente, núcleo plasmática y Achúcarro para cultivo) en:

- a) Apice de raíz de *Zea mays* (aproximadamente a 0,5 cm del ápice).
- b) Apice del tallo de *Vicia faba* (aproximadamente a 1,5 cm de longitud).
- c) Callo cotiledonar de *Diplotaxis tenuifolia*.

Se utilizó la técnica de retículo de Gomori en los siguientes materiales:

- d) Cortes transversales, de hojas de *Pinus pinotea*, de *Egeria densa*, *Festuca arundinacea*, *Camelia japonica* y corte transversal y longitudinal de tallo de *Tilia moltkei*.

TECNICAS (Tab. 1)

El fijador general aconsejado para las técnicas argentícas es formol al 10 % pero igualmente se comprobó que puede usarse FAA (formol, alcohol, ácido acético), fijador comúnmente utilizado para los tejidos vegetales.

Para la realización de estas técnicas, es necesario que el material de vidrio a utilizar sea limpiado minuciosamente. El lavado se puede hacer con una solución débil de ácido clorhídrico, seguido con agua destilada. No deben utilizarse elementos metálicos cuando los materiales están en las soluciones argentícas porque se corre el riesgo de precipitar la solución. Es conveniente el uso de elementos de vidrio, pipetas por ejemplo, y en el caso de elementos metálicos, éstos deben parafinarse previamente.

Toda solución argentíca se filtra antes de su uso y se mantiene tapada.

El material vegetal se lava cuidadosamente en agua destilada antes de comenzar la impregnación. Nótese que en cada técnica el lavado oscila de 30 minutos a 1 hora, tiempo que puede prolongarse si se desea. Esto es para eliminar todo resto de fijador.

Técnicas usadas:

1. — *Nuclear en caliente* (Impregnación en masa).

Reactivos

Solución de carbonato de plata amoniacal de Río Hortega (R. H.) mediana¹

¹ Existen otros 2 tipos de soluciones de R.H.: débil (50 cc; 150 cc; 500 cc de Nitrato de Plata, Carbonato de Sodio y agua destilada) y fuerte (100 cc; 300 cc; 1000 cc de Nitrato de Plata, Carbonato de Sodio y agua destilada) que también pueden ser ensayadas en otros materiales.

TABLA 1

Materiales.		Núcleo	Citoplasma y Contenidos	Cutícula	Cloroplastos	Pared Primaria	Pared Secundaria y Lignificada
Zea mays ápice de raíz (Nuclear en caliente)		negro	amarillo tostado	-	-	-	-
Vicia faba ápice de tallo (Nuclear en caliente)		negro	amarillo tostado	-	-	-	-
Callo dicotiledonar (A-chúcarro)		negro	tostado	-	-	-	-
Zea mays ápice de raíz (Núcleo plasmática)		marrón	amarillo claro con puntos marrones	-	-	-	-
Vicia faba ápice de tallo (Núcleo plasmática)		marrón	amarillo claro con puntos marrones	-	-	-	-
<u>Técnica de Retículo de Gomori</u>							
Hoja de Camelia japonica	vaciado	-	amarillo claro	negro	-	amarillo fuerte	amarillo fuerte a marrón oscuro
	sin vaciar	-	marrón	amarillo fuerte	-	amarillo fuerte	amarillo claro a fuerte
Hoja de Pinus pinotea	vaciado	-	-	negro	-	amarillo fuerte	amarillo claro a fuerte
	sin vaciar	-	amarillo	marrón	-	amarillo fuerte	amarillo fuerte a marrón
Hoja de Festuca arundinacea	vaciado	-	-	negro	-	amarillo fuerte	marrón
	sin vaciar	-	amarillo fuerte	marrón	amarillo claro	amarillo fuerte	marrón
Hoja de Egeria densa	vaciado	-	-	negro	-	amarillo fuerte	amarillo fuerte a marrón
	sin vaciar	-	amarillo fuerte	marrón	amarillo claro	amarillo	marrón
Tallo secundario de Tilia moltkei	sin vaciar	-	naranja a marrón	-	-	amarillo oro	amarillo oro

Piridina pura
Formol al 10 %
Amoníaco puro
Solución de carbonato de plata amoniacal de R. H. mediana
Nitrato de plata al 10 % en solución acuosa: 75 cc
Carbonato de sodio al 5 % en solución acuosa: 225 cc
Amoníaco suficiente para disolver el precipitado que se formó
Agua destilada: 300 cc

Conviene guardar la solución obtenida en frasco oscuro.
Esta solución debe ser filtrada antes de usar².

Procedimiento:

1) Colocar el material previamente fijado en un vaso de precipitación con abundante agua destilada y algunas gotas de amoníaco puro durante 1 hora.

2) Lavarlo tres veces en abundante agua destilada.

3) Pasarlo a una solución de carbonato de plata amoniacal de R. H. mediana, adicionando 4 o 5 gotas de piridina por cada 10 cc de solución; calentar a 50° C hasta que el material se torne color *amarillo tostado*. La solución debe agitarse cada 2 ó 3 minutos.

4) Lavarlo en agua destilada:

5) Reducir el material en formol al 10 % con unas gotas de piridina. La reducción se pone en evidencia cuando el material se torna de un color que va de *marrón muy intenso a negro*.

A partir de este momento el material se encuentra en condiciones para hacer una inclusión del mismo o para ser cortado.

Los materiales ensayados *a*, *b* y *c* se trataron con: 20 minutos en carbonato de plata de R.H. y 30 minutos en formal al 10 %.

2. — *Achúcarro para cultivo* (Impregnación en masa).

Reactivos.

Alumbre de hierro al 4 % en solución acuosa.

Nitrato de plata al 2 % en solución acuosa.

Piridina pura.

Formol al 2 %.

Procedimiento:

1) Lavar el material previamente fijado, en un vaso de precipitación con abundante agua destilada y durante 30 minutos.

2) Colocarlo en un recipiente con alumbre de hierro al 4 % y dejarlo en el mismo durante 12 horas.

² En este trabajo se usó solamente la solución mediana.

- 3) Lavarlo con agua destilada.
- 4) Colocar en un recipiente con nitrato de plata al 2 % y dejar durante 2 horas, hasta que el material se torne de color *amarillo*.
- 5) Lavarlo con agua destilada.
- 6) Colocar en un vaso de precipitación con nitrato de plata al 2 %, con 3 o 4 gotas de piridina. Calentar a 37° C durante 2 horas, hasta que el material se torne de color de *caramelo claro a oscuro*.
- 7) Lavarlo con agua destilada y 2 o 3 gotas de piridina durante 5 minutos.
- 8) Lavarlo nuevamente con agua destilada durante 5 minutos.
- 9) Reducir en formol al 2 %: el material torna al color *marrón oscuro a negro*.

A partir de este momento el material se encuentra en condiciones para hacer una inclusión del mismo o para ser cortado.

El material ensayado (Callo cotiledonar de *Diplotaxis tenuifolia*) se trató con: 18 horas de alumbre de hierro al 4 %, 2 horas en nitrato de plata al 2 %; 3 ¼ horas en nitrato de plata al 2 % con gotas de piridina y 60 minutos en formol al 2 %.

3. — Núcleo plasmática (Impregnación en masa).

Reactivos.

Solución de carbonato de plata amoniacal de R.H. solución mediana (ver en técnica 1).

Alcohol 96°.

Formol al 1 %.

Procedimiento:

- 1) Lavar el material previamente fijado, en un vaso de precipitación con abundante agua destilada y durante 30 minutos.
- 2) Colocar en un recipiente con carbonato de plata amoniacal de R.H. (mediana), y dejarlo en el mismo durante 15 minutos o más, hasta que se torne de un ligero color *amarillo*.
- 3) Pasar los materiales por alcohol 96° durante 15 minutos.
- 4) Pasar el material a otro recipiente y reducirlo en formol al 1 %; se deja hasta que se torne de color *amarillo*.

A partir de este momento el material se encuentra en condiciones para hacer una inclusión del mismo o para ser cortado.

Los materiales ensayados *a*, *b* y *c* se trataron con: 65 minutos en carbonato de plata amoniacal de R.H. (mediana); 15 minutos en alcohol 96° y 45 minutos en formol al 1 %.

4. — Reticulo de Gomori (Impregnación en cortes).

Reactivos.

Hidróxido de plata amoniacal.

Permanganato de potasio al 0,5 % en solución acuosa.

Acido oxálico al 5 % en solución acuosa.

Alumbre de hierro al 2 % en solución acuosa.

Formol al 20 %.

Solución de hidróxido de plata amoniacal (esta solución se prepara cada vez que se utiliza).

Nitrato de plata al 10 % en solución acuosa: 5 cc.

Hidróxido de potasio al 10 % en solución acuosa: 1,25 cc.

Amoníaco suficiente para disolver el precipitado que se forma.

Agregar 4 gotas de nitrato de plata al 10 %.

De la solución obtenida se lleva al doble de su volumen con agua destilada.

Procedimiento:

- 1) Lavar los cortes con abundante agua destilada, durante 5 minutos.
- 2) Colocarlos en un recipiente con permanganato de potasio al 0,5 %, durante 1 minuto.
- 3) Poner en un vaso de precipitación ácido oxálico al 5 %, y pasar los cortes al mismo, dejándolos hasta que queden transparentes.
- 4) Lavarlos con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada.
- 5) Colocarlos en alumbre de hierro al 2 %, durante 1 minuto.
- 6) Lavar los cortes con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada.
- 7) Colocarlos en la solución de hidróxido de plata amoniacal, durante 2 minutos.
- 8) Lavar rápidamente en agua destilada.
- 9) Reducir con formol al 20 % durante 3 minutos.
- 10) Lavar con agua destilada.
- 11) Montar en gelatina glicerizada. Si se desea se puede montar con bálsamo de Canadá previa deshidratación.

En los materiales ensayados *d* no se variaron los tiempos indicados en la técnica precedente.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Con la impregnación Nuclear en caliente se obtiene una visión más nítida y concreta del núcleo, que con las técnicas corrientemente usadas (Hematoxilina), dado que el núcleo se ve negro y el resto se tiñe de color amarillo dorado.

Con la técnica Núcleo plasmática se visualiza el núcleo, pero la misma es más adecuada para el citoplasma, donde se pueden ver nítidamente los contenidos de color marrón oscuro.

En la técnica de Reticulo de Gomori no se deben sacar los contenidos

del material con hipoclorito de sodio porque se altera el resultado variando los colores obtenidos. Por ejemplo, en la hoja de *Camelia japonica* sin vaciar, las paredes lignificadas son de color amarillo claro y en la misma hoja tratada con hipoclorito de sodio, esas paredes son de color gris oscuro.

Así en el material meristemático (ápices) la impregnación en masa da muy buenos resultados, evitando la coloración posterior y facilita el manejo del material durante la inclusión, siendo éste más visible. La técnica de Achúcarro para cultivo, usada en callo cotiledonar de *Diplotaxis tenuifolia* no deteriora el material que es muy vulnerable.

En el caso de las estructuras de tejidos adultos como las hojas y los tallos, se observó que la coloración es rápida y da tonalidades diferenciales en la gama que va desde amarillo claro a marrón oscuro, permitiendo distinguir los diferentes tejidos de los órganos con facilidad.

Los resultados arriba mencionados se han resumido en la Tabla I en la que quedaron indicados los tonos y colores obtenidos en cada material tratado.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento al Ing. Agr. Julián Cámara Hernández su estímulo para la realización de la presente investigación y agradezco muy cordialmente a la Dra. Elena Ancíbor las oportunas sugerencias durante la realización del trabajo y la revisión del texto. Asimismo, deseo agradecer a la Secretaria de la Cátedra señora Vera S. de Miller la cuidadosa copia del trabajo para su publicación.

BIBLIOGRAFIA

- ACHÚCARRO, N. 1911. Nuevo método para el estudio de la neuroglia y el tejido conjuntivo. *Bol. Soc. Esp. Biol.* 1: 139-41.
- 1911. Las células amiboides de neuroglia teñidas con el método de la plata reducida. *Bol. Soc. Esp. Biol.* 1: 84-86.
- ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY. 1957. Manual of Histologic and special staining technics. p. 92.
- CONN, H. J. *et al.* 1960. Staining procedures. 2nd ed. Williams and Wilkins. p. 84, 127, 151, 243 (172-173).
- LANGERON, M. 1949. Précis de microscopie, Imprégnation a l'argent: 658-687.
- RAMÓN y CAJAL, S. 1913. Manual de Anatomía Patológica General (seguido de un resumen de microscopía aplicada a la Histología y Bacteriología Patológicas). 5ª Edición. Madrid. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, pág. 548-560, 1 vol.
- RÍO - HORTEGA, P. 1916. Nuevas reglas para la coloración constante de las formaciones correctivas por el método de Achúcarro. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 14: 181-88.
- 1962. The Microscopic Anatomy of Tumors of the Central and Peripheral Nervous System. pp. 18-26 Charles C. Thomas, Springfield, III.
- TUNTUNI, ARCHIE R. 1973. A Method for Impregnating Myelinated Axons in Adult Central Nervous System. *Stain technology*, vol. 48 nr 6, pág. 297-304.