

Nuevo soporte para obtención de cortes de material vegetal con micrótopo rotativo

María Inés Mercado*, Graciela Inés Ponessa

Fundación Miguel Lillo, Instituto de Morfología Vegetal, Área Botánica. Miguel Lillo 251, T4000JFE San Miguel de Tucumán, Tucumán, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: mimercado@lillo.org.ar

Resumen

Obtener cortes de material vegetal de 20-30 μm de espesor con un micrótopo rotativo se encuentra ligado a la inclusión de las muestras en bloques de resina o parafina, lo cual implica de disposición de tiempo e insumos. Otra limitante en el trabajo de anatomía vegetal es la realización de cortes de material fresco para ensayo de pruebas histoquímicas, ya que se debe contar con la destreza necesaria para realizar cortes a mano alzada o con equipamiento e insumos que en ocasiones presentan elevados costos como un crióstato. El objetivo de esta comunicación es presentar una técnica que utiliza un micrótopo rotativo con cuchilla descartable y un soporte de cera odontológica que permite obtener cortes, incluso seriados, de material fresco o fijado de diferentes órganos. Se discuten las limitaciones de la técnica.

New mounting support to obtain slices of plant material by using a rotary microtome

Summary

Obtaining sections of plant samples from different organs of 20-30 μm thick by using a rotary microtome is linked to the inclusion of the samples in blocks of resin or paraffin, technique which implies time and supplies. Another limitation in the work of plant anatomy is the realization of cuts from fresh material to perform histochemical tests. To obtain freehand cuts the operator must have the necessary skills or the laboratory must have equipment and supplies that sometimes represents high costs such as a cryostat. The objective of this communication is to present a technique that, using a rotary microtome with a disposable blade and dental wax support, allows obtaining cuts, even serial, of fresh or fixed material from different organs. The limitations of the technique are presented.

Introducción

Para muchos laboratorios clásicos de histología vegetal, la obtención de cortes de material vegetal para la realización de estudios anatómicos y pruebas histoquímicas nos plantea contar con una gran habilidad para realizar cortes a mano alzada o realizar técnicas laboriosas de fijación. Un completo set de técnicas tradicionales para la obtención de cortes y preparados histológicos a partir de diferentes materiales vegetales se encuentra disponible en la bibliografía de D'Ambrogio de Argüeso (1986), Ruzin (1999) y Zarlavsky (2014), entre otras.

En caso de necesitar cortes de material fresco o fijado sin inclusión en parafina, se debe contar con la pericia de realizar cortes a mano alzada o contar con instrumentos como vibrató-

mos o crióstatos, los cuales constituyen equipamientos costosos si el laboratorio no cuenta con ellos.

El vibratótopo permite la obtención de cortes de 50-200 μm de material fresco o previamente fijado. Para materiales muy pequeños o blandos como radículas embrionales se han ensayado con éxito técnicas de inclusión directa en agarosa (Ron y col., 2013). Atkinson y Wells (2017) diseñaron moldes 3D de ácido poliláctico para embeber material fresco o fijado de raíces en agarosa al 4-5 % (p/v) lo que permite moldear bloques que al solidificar pueden ser cortados en el vibratótopo. Esta técnica permite obtener secciones de espesor conocido entre un corte y otro, además, tiene la ventaja de que la muestra se encuentra en flotación evitando así la desecación de la misma.

Palabras clave: cera odontológica - cortes histológicos - material vegetal - micrótopo rotativo - técnica.

Key words: dental wax - histological sections - plant material - rotary microtome - technique.

Para el caso de contar con un crióstato, las muestras vegetales frescas o fijadas, son infiltradas en una serie de soluciones de diferentes gradientes de sacarosa como crioprotector para evitar la formación de cristales durante el posterior congelamiento o en compuestos especiales como *optimum cutting temperature* (conocido como OCT) y posteriormente congeladas directamente a temperaturas de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con CO_2 , N líquido o en el mismo crióstato. Las secciones de $10\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$ de espesor, se recogen en flotación para su posterior teñido y montaje (Weaver y Layne, 1965; Läuchli, 1966; Benes, 1973; Knapp y col., 2012).

Por otra parte, la mayoría de los laboratorios clásicos de histología vegetal cuentan con micrótomos rotativos para la obtención de cortes de $10\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ a partir de material infiltrado en parafina o resinas. Mediante esta técnica los tejidos vegetales son endurecidos al reemplazar el agua intracelular con parafina o resinas sintéticas a fin de obtener cortes muy finos. Sin embargo, el proceso incluye numerosos pasos de fijación, deshidratación, inclusión, corte, montaje, desparafinado y tinción (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Spence, 2001; Ruzin, 1999; Zarlavsky, 2014), los cuales requieren de mucho tiempo (semanas), esfuerzo y gasto de insumos que en ocasiones pueden ser perjudiciales para la salud y el medio ambiente. En muchos casos estos procesos pueden causar ablandamiento, deformaciones de los tejidos y lavado de los compuestos que se desean detectar.

La alternativa más económica y ambientalmente saludable es realizar cortes a mano alzada, término utilizado originalmente para aquellas secciones obtenidas al cortar el material con una hoja de afeitar sosteniendo el mismo entre los dedos o utilizando como soporte médula de sauco, fragmentos de zanahoria, telgopor compactado (poliestireno) o carbowax 4000 (Johansen, 1940; D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Fink, 1986; Zarlavsky, 2014) e incluso, recubriendo el material fresco o fijado en polietilenglicol o agarosa 6 % para formar un bloque alrededor del material que facilite su manipulación (Fink, 1986; Zelko y col., 2012). A los fines prácticos, en el presente trabajo al hablar de cortes a mano alzada nos referiremos a aquellas secciones obtenidas utilizando una hoja de afeitar ya sea sosteniendo el material con la mano, en un soporte o con un micrótomo manual (Johansen, 1940; Cutler, 1978; O'Brien y McCully, 1981, Fink, 1986; Purvis y col., 1966; D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Yeung, 1998; Zarlavsky, 2014). Aunque es una técnica apropiada para una gran variedad de materiales más o menos rígidos, las secciones resultantes usualmente no son uniformes ni delgadas, genera grandes dificultades cuando el material es muy fino o succulento como por ejemplo la lámina de una hoja de textura membranacea, cuando presenta tejidos con diferentes durezas, con espacios intercelulares abundantes como tallos de Aráceas, o con tejidos blandos como en raíces herbáceas de pequeño diámetro, radículas embrionales, brotes jóvenes (Metusala, 2017) o material proveniente de plantas cultivadas *in vitro*

(Johansen, 1940; Zelko y col., 2012). El resultado depende en gran medida de la pericia del operario y la naturaleza del material, produciendo en muchos casos un bajo porcentaje de secciones útiles. Obtener un buen corte a mano alzada requiere contar con suficiente material, paciencia, práctica y habilidad (Berlyn y Miksche, 1976; Metusala, 2017).

El objetivo de este trabajo es ofrecer un método alternativo para obtener cortes de entre $25\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$ en un micrótomo rotativo a partir de material fresco o previamente fijado, utilizando un soporte de cera odontológica. Este método ha sido utilizado en numerosas ocasiones en nuestro laboratorio desde 2016 con diferentes muestras (tejidos y órganos) obteniendo muy buenos resultados (Pérez Grosso y col., 2016; Gómez y col., 2019; Lizarraga y col., 2017; Mercado y col., 2018; Moreno y col., 2018; Mercado y col., 2020; Pérez y col., 2020; Leal y col., 2021, entre otros). Se presentan resultados en los tejidos de diferentes órganos de plantas superiores y se discuten las limitaciones de la técnica.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Las muestras usadas fueron de material vegetal fresco, porciones de material fijado en FAA (ácido acético, formol, agua y alcohol 1:2:7:10) y material seco y rehidratado en agua destilada a temperatura ambiente durante 10 min. Los mismos correspondieron a diferentes órganos vegetativos y reproductivos, con distintos tamaños y consistencias. A modo ilustrativo se realizaron cortes de hojas de *Zea mays* L. (Poaceae) fijadas en FAA. Hojas de *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron. (Verbenaceae) secas y rehidratadas. Hojas frescas de *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae). Tallos de *Medicago sativa* L. (Fabaceae) fijados en FAA. Tallos secos y rehidratados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). Tallos frescos de *Fabiana punensis* S.C. Arroyo (Solanaceae). Raíces fijadas en FAA de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). Raíces, tallos, folíolos y raquis frescos de plántulas de *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) y ápices caulinares de *Ullucus tuberosus* Caldas (Basellaceae) obtenidos mediante diferentes técnicas de cultivo *in vitro*.

Flores secas y rehidratadas de *Artemisia mendozana* DC. var. *mendozana* (Asteraceae). Frutos frescos juvenes de *Prosopis alba* Griseb. (Fabaceae). Hojas y tallos frescos y fijados en FAA de *Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey (Geraniaceae).

La nomenclatura científica fue corroborada en la base de datos The Plant List (2013).

Instrumental

Hojas de afeitar tipo Gillette® o tijeras que permitan cortar porciones de aproximadamente $5\text{-}7\text{ mm}$ de long., ó $2\text{-}5\text{ mm}^2$ (superficie) (porciones de menor tamaño favorecen la obtención de mejores cortes) del material que se desea seccionar. Superficie para corte del material vegetal, en nuestro

laboratorio se utiliza un vidrio de 20 x 20 cm y 4 mm de espesor. Cajas de Petri (100 x 20 mm). Pinzas de acero inoxidable. Agujas histológicas, micrótopo rotativo y cuchillas: cuchilla afilada o cuchilla descartable, *HP35 Coated microtome blade 34 °/75 mm* Thermo Scientific o afines. Cera odontológica o articular en placas (140 mm de long. x 75 mm de lat. y 2 mm de espesor). La dureza de la cera se identifica con diferentes colores según la marca (marcas alternativas Vaircil®, Reus®, GC-Dental®), se expende en locales de insumos odontológicos. Vaircil presenta cera rosada de mayor dureza, en comparación con las otras, es difícil de moldear con el calor de las manos y quebradiza por lo que no es recomendable; la amarilla, de dureza intermedia, es la más utilizada en nuestro laboratorio por ser fácilmente maleable con las manos pero conservando una consistencia que permite su manipulación y la roja, blanda, si bien es más fácil de modelar tiende a pegarse con el material sobre todo en ambientes cálidos y húmedos (Figura 1 A).

Los cortes histológicos se obtuvieron montando muestras de aproximadamente 5-7 mm de long. o 2-5 mm² de superficie en soportes de cera odontológica de dureza intermedia, que posteriormente fueron seccionadas con micrótopo rotativo a 15, 20, 25 y 35 μ m de espesor.

Para estudios clásicos de anatomía, los cortes obtenidos a partir de material fresco o fijado en FAA, fueron observados directamente al microscopio óptico montados en agua destilada o bien, se decoloraron con hipoclorito de sodio al 50 %, lavados con agua destilada tres veces y teñidos con tinción doble sucesiva azul astra-safranina (Luque y col. 1996) o metacromática como azul de toluidina y violeta de cresyl para ser posteriormente montados en agua-glicerina (1:1) (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Zarlavsky, 2014).

Para estudios histoquímicos, los cortes de material fresco fueron sometidos a colorantes y reactivos productores de reacciones de coloración cuyas técnicas constan en la bibliografía clásica de histología vegetal como rojo de rutenio (1 % p/v) para sustancias pépticas, azul de toluidina para polisacáridos (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1981), sudan IV (solución acuosa a saturación) para lípidos, cloruro férrico (10 % p/v) para compuestos fenólicos (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Ruzin, 1999; Zarlavsky, 2014) y NP (2-aminoethyl-diphenylborinate, Sigma) 1 % en MeOH (Neu, 1956) para flavonoides y fenoles derivados del ácido caféico y clorogénico.

Diafanizados se realizaron según la técnica de Dizeo de Strittmater (1973).

Los cortes fueron realizados en un micrótopo rotativo tipo Minot Microm HM315 con cuchillas descartables de acero inoxidable.

Para las observaciones se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss Lab. A1 Axiolab con cámara adosada Axio-Cam ERc 5s Zeiss y el programa Axio Vision release 4.8.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot) con luz UV (filtro de excitación UV-1A: 365 nm, filtro de barrera 400 nm).

Resultados

Procedimiento

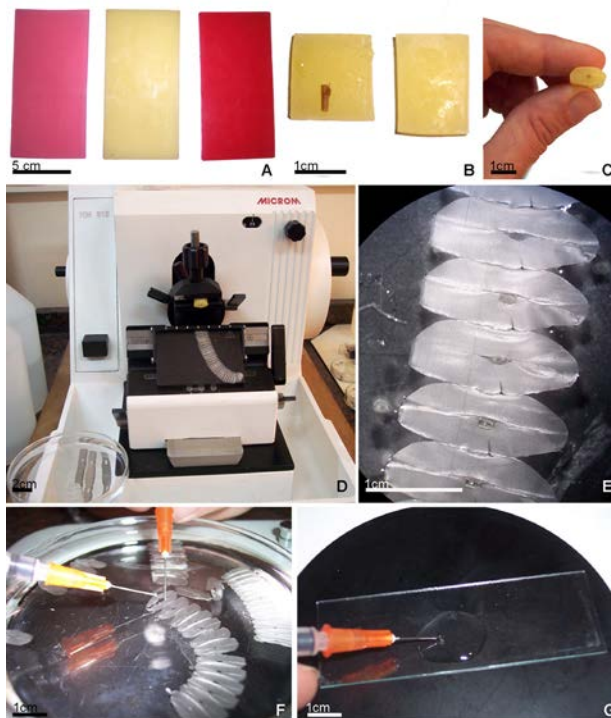
Para obtener las secciones se toma un fragmento del material vegetal fresco (tallos, hojas, raíces u otros órganos —fijado o seco y previamente rehidratado durante 10 min por inmersión en agua destilada—, de aproximadamente 5 a 7 mm de long. o 2 hasta 5 mm² (superficie) y se coloca con ayuda de pinzas entre dos fragmentos de cera de dureza intermedia, de 10 a 20 mm² cuidando que el material quede orientado según las necesidades para realizar los cortes correspondientes (Figura 1 B), se presionan los bordes de la cera y con el calor de las manos se cierra por los laterales y la base dejando solo visible la cara por la cual se procederá a cortar (Figura 1 C). Los cortes se realizan de forma inmediata para evitar que el material se deshidrate. Este “cubo” o “prisma rectangular” de cera —donde se encuentra el material— se sujeta a la prensa del micrótopo orientando el ángulo de corte, el espesor del corte se selecciona en el micrótopo, el cual se encuentra preparado con una cuchilla descartable de acero inoxidable de preferencia nueva (Figura 1 D). De acuerdo con la naturaleza del material se obtienen cortes buenos empleando diferente espesor de corte (Figura 2 A-D). No es aconsejable realizar cortes muy delgados, de menos de 20 μ m ya que el material se torna frágil y tiende a romperse, los diferentes tejidos pierden su cohesión al intentar desmontarlos de la cera de soporte. Se pueden obtener cortes más gruesos sin ningún inconveniente, pero el investigador deberá decidir si cumplen con las necesidades del análisis a realizar (Figura 2 A-D).

Las secciones obtenidas forman una cinta que puede ser recuperada con pinzas y colocada en cunas de agua destilada a temperatura ambiente, generalmente se utilizan cajas de petri que pueden ser numeradas en la secuencia de corte, permitiendo obtener cortes seriados (Figura 1 E). No se debe usar agua templada o caliente ya que disuelve la cera la cual se adhiere a los tejidos interfiriendo posteriormente con la coloración y el proceso de recuperación del corte.

De cada sección se aíslan manualmente los cortes individuales bajo lupa con ayuda de dos agujas hipodérmicas (Figura 1 F). Los cortes obtenidos se colocan sin adhesivo directamente sobre un porta objeto con una gota de agua que permite su deslizamiento por tensión superficial (Figura 1 G) o pueden ser almacenados en alcohol 70 °, por no más de 2 o 3 días (siempre y cuando no sea la intención detectar algún compuesto soluble en el medio de conservación).

Colocados los cortes sobre el porta objeto se cubren con el cubre objeto y se pueden observar directamente en el microscopio óptico o para un mejor reconocimiento de los tejidos se decoloran y se pueden realizar diferentes tinciones (Figura 2 E-H).

Los cortes también pueden destinarse a algún test histoquímico empleando el reactivo correspondiente, dependiendo

Figura 1.- Detalle de la técnica

A: Placas odontológicas de diferente dureza. **B-C:** Preparación de soporte con fragmento de tallo de “alfalfa” (*M. sativa*). **D:** Montado del soporte en el micrótomoto rotativo y corte. **E:** Tira de cortes obtenidos de forma seriada. **F:** Separación manual de los cortes con agujas histológicas. **G:** Aislamiento de cortes por flotación en porta objeto.

de la naturaleza química del compuesto que se desea identificar o del objetivo del trabajo a realizar (Figura 2 I-K).

Resultados obtenidos

En la figura 2 A-D, se observan cortes de lámina foliar de maíz previamente fijadas en FAA, realizados a 15, 20, 25 y 35 μm respectivamente, decolorados y teñidos con azul astra-safranina. En los cortes de 15 μm (Figura 2 A), se observa como se desprende un fragmento del corte.

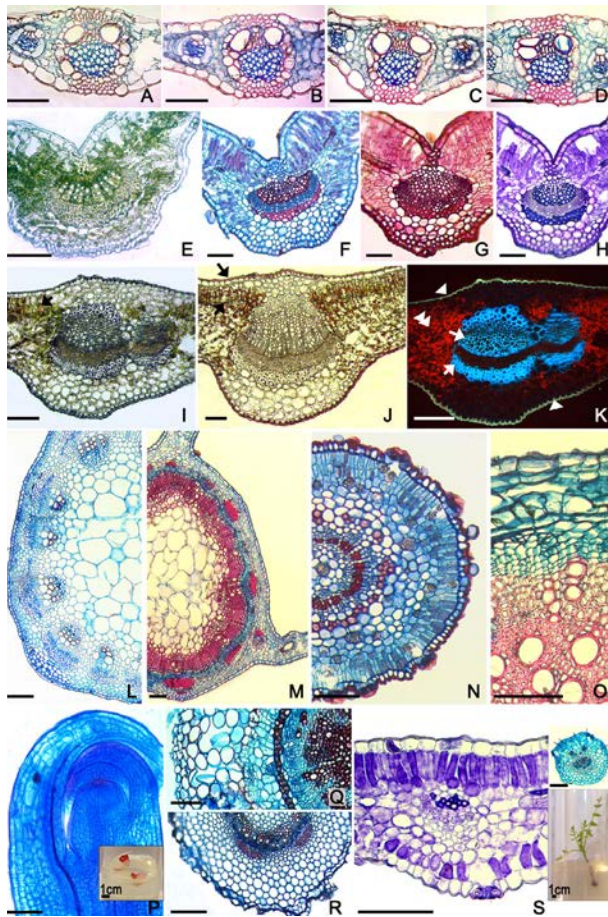
Como se mencionó con anterioridad, la técnica permite la realización de ensayos histoquímicos. En la figura 2 (E-K) se realizaron cortes de 25 μm de espesor en hojas de “poleo” (*L. integrifolia*) secas y rehidratadas y en hojas frescas de “arándano” (*V. myrtilus*). Se presenta para ambas muestras un control al natural (Figura 2 E e I) en el que se observa la coloración verde característica de las clorofilas. En el del arándano se destaca la presencia de idioblastos en el parénquima fundamental del nervio medio y en empalizada (Figura 2 I). Para el “poléo” se realizó decoloración y posterior tinción con azul astra-safranina la cual permite diferenciar claramente tejidos con paredes con estructura primaria (epidermis, parénquimas) coloreados de azul con respecto a tejidos con paredes con estructura secundarias coloreados de rojo intenso (fibras y vasos xilemáticos) (Figura 2 F).

Para *L. integrifolia* se ensayó coloración simple con rojo de rutenio para la identificación de pectinas (Figura 2 G) y con azul de toluidina colorante metacromático que permite la identificación de tejidos con paredes de estructura primaria con coloración violeta, tejidos con paredes de estructura secundarias azul y en caso de estar presentes polisacáridos los cuales se colorean en azul (Figura 2 H). En tanto, para *V. myrtilus* se realizó un test de coloración con sudan IV para lípidos presentes en cutículas y cuerpos oleosos dentro de las células del mesófilo (Figura 2 J) y con el reactivo NP para la detección de flavonoides y fenoles, observando derivados cafeoilquínicos y feruolquínicos, los cuales presentan fluorescencia verdosa-blanquecina y azulada respectivamente en las paredes secundarias de los vasos xilemáticos y fibras; flavonoides, flavonas y flavanonas con fluorescencia blanco-amarillenta a nivel de la cutícula y las clorofilas que exhiben autofluorescencia característica rojiza (Figura 2 K).

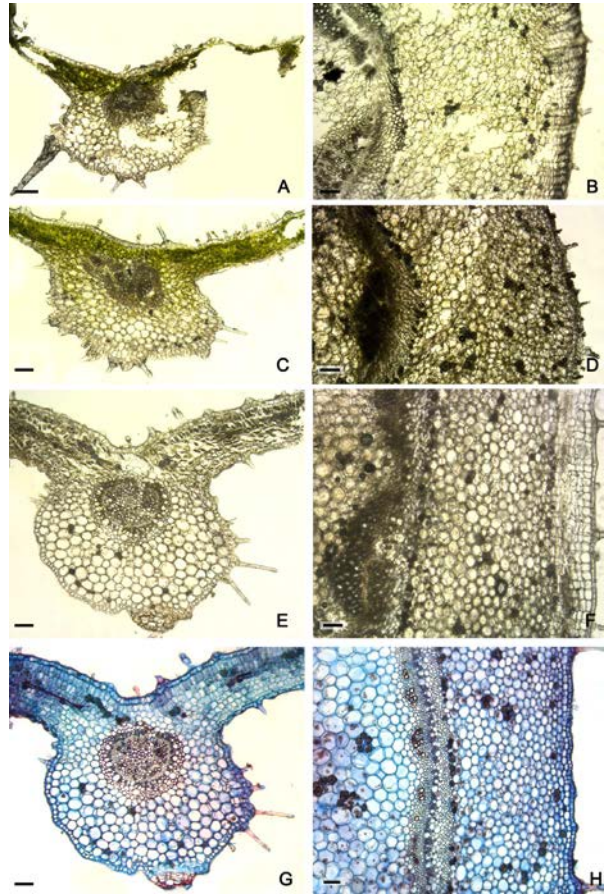
La técnica suele funcionar muy bien con materiales de diferente textura como hojas (Figura 2 A-K), tallos (Figura 2 L-N) y raíces (Figura 2 O) e incluso con muestras blandas provenientes de cultivos in vitro, ya sea frescas, secas y rehidratadas o previamente fijadas en FAA (Figura 2 P-S).

Una limitación de la falta de infiltración, es que algunos materiales frescos tienden a romperse si el tejido es muy carnoso o demasiado blando, como en el caso de plantas crasas, o tejidos suculentos. Se muestran cortes de hojas y tallos de *Pelargonium* sp.; considerada como semisuculenta con abundante parénquima reservante de agua; realizados a partir de material fresco a 25 μm (Figura 3 A y B), donde se observa la ruptura de los tejidos y a 40 μm de espesor (Figura 3 C y D) en los cuales los tejidos se observan íntegros pero gruesos. Se ensayó también la realización de cortes a 30 μm de espesor en material previamente fijado en FAA durante 24 hs, los cortes fueron observados directamente en MO (Figura 3 E-F) y posteriormente decolorados y teñidos con azul astra-safranina (Figura 3 G-H), en este caso se observa una buena calidad de cortes en cuanto a su espesor, sin ruptura de tejidos. Se observa así que en el caso de tejidos blandos puede ayudar aumentar el espesor del corte perdiendo un poco de calidad de observación; o realizar un paso previo de fijación en FAA de entre 24 y 48 horas —dependiendo de la consistencia del material— lo cual endurece los tejidos y favorece la obtención de buenos cortes, aunque al mismo tiempo limita ciertas técnicas histoquímicas.

Algo similar ocurre en materiales que presenta cámaras de aire como un aerénquima, o en el caso de órganos secos o flores que entre sus diferentes componentes presentan aire. En estos casos los tejidos se disgregan por colapso o al desprenderse sus partes cuando se intenta levantar de la cuna de agua. En el caso de órganos con cámaras de aire entre sus componentes como flores y frutos secos, se podría optar por trabajar con cada componente por separado, pétalos, sépalos, entre otros o utilizar como soporte agarosa al 3-5 %, tal como lo sugieren Atkinson y Wells (2017) para este tipo de materiales.

Figura 2.- Ensayo de cortes en diferentes materiales vegetales

A-D: Cortes de diferentes espesores en lámina foliar de "maíz" (*Z. mays*) fijadas en FAA, decoloradas y teñidas con azul astra-safranina. A 15 µm (A), 20 µm (B), 25 µm (C) y 35 µm de espesor (D). **E-H:** Hojas de "poleo" (*L. integrifolia*) secas y rehidratadas, cortadas a 25 µm de espesor, control natural (E), decoloradas y teñidas con azul astra-safranina (F), coloración con rojo de rutenio para la identificación de pectinas (G) y azul de toluidina (H). **I-K:** Transporte de hojas frescas de "arándano" (*V. myrtilus*) realizados a 25 µm de espesor. Material fresco control sin tinción, se observan idioblastos en el parénquima fundamental del nervio medio y en empalizada (flechas) (I). Sudan IV para la detección de lípidos, tinción positiva en cutículas y cuerpos oleosos dentro de células del mesofilo (flechas) (J). Reacción con NP para detección de flavonoides y fenoles, observado en microscopio de fluorescencia. Derivados cafeoilquinicos (fluorescencia verdosa-blanquecina) y feruolquinicos (fluorescencia azulada) en las paredes secundarias de los vasos xilemáticos y fibras (flechas); flavonoides, flavonas y flavanonas (fluorescencia blanco-amarillenta) a nivel de la cutícula (cabeza de flecha) y clorofilas exhiben autofluorescencia rojiza (doble punta de flecha) (K). **L-S:** Ensayo de corte en tallos y raíces de diferentes estructuras y texturas a 25 µm de espesor, decolorados y teñidos con azul astra-safranina. Tallos previamente fijados en FAA de "alfalfa" (*M. sativa*) (L). Tallos secos y rehidratados de "carqueja" (*B. trimera*) (M). Tallos frescos de *F. punensis* (N). Raíces previamente fijadas en FAA de *T. minuta* (O). **P-S:** Cortes de material obtenido mediante diferentes técnicas de cultivo in vitro. Ápices caulinares de brotes frescos de "ulluco" (*U. tuberosus*). En inserto muestra original (P). Plántulas de "pus-pus" (*Z. punctata*) obtenidas mediante germinación de semillas *in vitro*. Raíces (Q), tallos (R) y folíolos (S) cortados a 25 µm de espesor, decolorados y teñidos con azul de toluidina. En S, inserto superior raquis teñido con azul astra-safranina e inserto inferior muestra original. Escalas: 100 µm.

Figura 3.- Limitaciones de la técnica

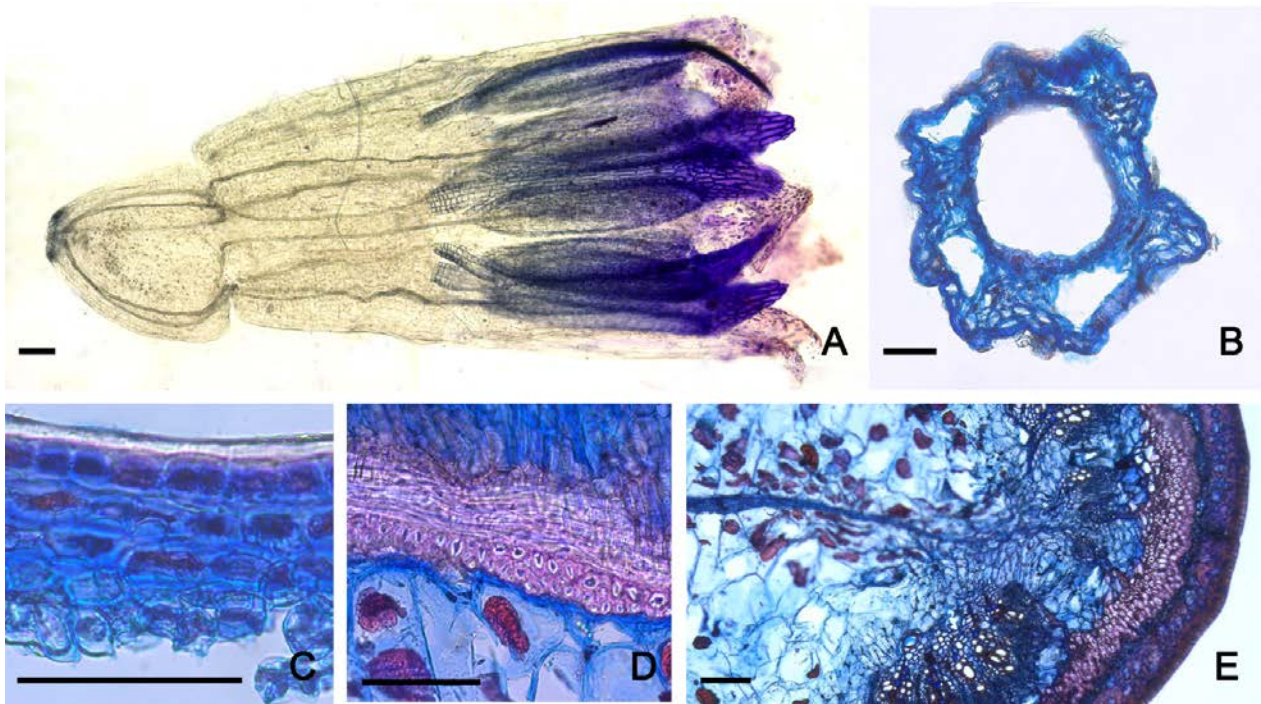
A-H: Hojas y tallos frescos de "malvón" (*Pelargonium x hortorum*) cortados a 25 µm (A-B) y 40 µm (C-D). E-H. Hojas y tallos de "malvón" fijados en FAA, cortados a 30 µm, observados directamente en MO (E-F) decolorados y teñidos con azul astra-safranina (G-H). Escalas: 100 µm.

En la figura 4 A y B se presenta el diafanizado de una flor tubulosa de *Artemisia* sp. y un corte realizado a 30 µm de espesor entre el ovario y tubo corolino respectivamente. Para un fruto de *Prosopis* sp., se decidió trabajar con vainas frescas inmaduras (previo a la lignificación total que dificultaría la obtención de buenos cortes) y se realizaron cortes gruesos de 40 µm de espesor, decoloración y posterior tinción con azul astra-safranina (Figura 4 E). En tanto que detalles del epicarpio y endocarpio se obtuvieron realizando cortes de 30 µm (Figura 4 C y D).

Conclusión

La técnica de corte con micrótopo rotativo que emplea como soporte cera odontológica implica ciertas ventajas frente a la técnica de corte a mano alzada: (1) facilita obtener cortes uniformes, con un espesor recomendable de 20-40 µm; (2) permite obtener cortes seriados; (3) logra

Figura 4.- Limitaciones de la técnica



A-B: *Artemisia* sp., flor tubulosa previamente fijada en FAA. Aspecto del diafanizado para observar las partes de la flor (A). Corte transversal a 30 µm de espesor entre el ovario y tubo corolino, decolorado y teñido con azul astra-safranina (B). **C-E:** Fruto fresco inmaduro de “algarrobo blanco” (*P. alba*), cortado a 40 µm de espesor, decolorado y teñido con azul astra-safranina. Detalle de sección a 30 µm de espesor de epicarpio (C), endocarpio (D) y aspecto general completo (E). Escalas: 100 µm.

buenos cortes de materiales muy pequeños como raíces embrionales, láminas membranáceas o material de plantas de cultivo *in vitro*; (4) mejora los cortes en materiales con tejidos de diferente dureza, tales como tallos con fibras perivasculares. La única desventaja observada fue la limitación dada por el tipo de material cuando es de consistencia seca, muy blanda, crasa, o con cámaras de aire, en los cuales los cortes suelen desgarrarse, aunque se puede mejorar con el empleo de material previamente fijado o al aumentar el espesor del corte.

Bibliografía

- Atkinson, J.A.; Wells, D.M. (2017). “An Updated Protocol for High Throughput Plant Tissue Sectioning”. *Frontiers in Plant Science* 8: 1721. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01721>.
- Benes, K. (1973). “On the media improving freeze-sectioning of plant material”. *Biologia Plantarum* 15: 50-56. <https://doi.org/10.1007/BF02922513>.
- Berlyn, G.P.; Miksche J.P. (1976). “Botanical microtechnique and cytochemistry”. Iowa State University Press, Ames, Iowa: 326.
- Cutler, D.F. (1978). *Applied plant anatomy*. Longman, London: 103.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas de histología vegetal*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires: 83.
- Dizeo de Strittmater, C. (1973). Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15: 126-129.
- Fink, S. (1986). “A new integrated concept for the improved preparation of sections of fresh or frozen tissue for light microscope histochemistry”. *Histochemistry* 86: 43-52. <https://doi.org/10.1007/BF00492344>.
- Gómez, A.A.; Mercado, M.I.; Belizán, M.M.E.; Ponessa, G.; Vattuone, M.A.; Sampietro, D.A. (2019). “*In situ* histochemical localization of alkaloids in leaves and pods of *Prosopis ruscifolia*”. *Flora* 256: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.04.008>.
- Heslop-Harrison, J.; Heslop-Harrison, Y. (1981). “The pollen-stigma interaction in the grasses. 2. Pollen-tube penetration and the stigma response in secale”. *Acta Botanica Neerlandica* 30: 289-307. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1981.tb00410.x>.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York: 523.
- Knapp, E.; Flores, R.; Scheiblin, D.; Modla, S.; Czymbek, K.; Yusibov, V. (2012). “A cryohistological protocol for preparation of large plant tissue sections for screening intracellular fluorescent protein expression”. *BioTechniques* 52 (1): 31-37. <https://doi.org/10.2144/00013778>.
- Läuchli, A. (1966). “Cryostat technique for fresh plant tissues and its application in enzyme histochemistry”. *Planta* 70(1): 13-25. <https://www.jstor.org/stable/23366257>.
- Leal, M.; Zampini, C.; Mercado, M.I.; Moreno, A.; Simirgiotis, M.; Borquez, J.; Ponessa, G.I.; Isla, M.I. (2021). *Flourensia fiebrigii* S.F. Blake: “A medicinal plant from the Argentinean highlands with potential use as anti-rheumatic and anti-inflammatory”. *Journal of Ethnopharmacology* 264: 113-296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113296>.

- Lizarraga, E.; Mercado, M.I.; Gálvez, C.; Ruiz, A.I.; Ponessa, G.I.; Catalán, C.A.N. (2017). "Morpho anatomical characterization and essential oils of *Tagetes terniflora* and *Tagetes minuta* (Asteraceae) growing in Tucumán (Argentina)". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 52 (1): 55-68. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v52.n1.16908>.
- Luque, R.; Sousa, H.; Kraus, J. (1996). "Métodos de coloração de Roeser (1972) -modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8 GS ou 8 GX". *Acta Botanica Brasílica* 10: 199-212. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061996000200001>.
- Mercado, M.I.; Lizarraga, E.; Coll Araoz, V.; Catalán, C.A.; Font de Valdez, G.; Marcial, G. (2020). "Lippia integrifolia: are there morphological, anatomical and biochemical differences among chemotypes?" *Industrial Crops and Products* 153: 112-610. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112610>.
- Mercado, M.I.; Moreno, M.A.; Ruiz, A.I.; Rodríguez, I.F.; Zampini, C.I.; Isla, M.I.; Ponessa, G.I. (2018). "Morphoanatomical and histochemical characterization of *Larrea* species from Northwestern Argentina". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 28 (4): 393-401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.012>.
- Metusala, D. (2017). "An alternative simple method for preparing and preserving cross-section of leaves and roots in herbaceous plants: Case study in Orchidaceae". *AIP Conference Proceedings* 1862, 030113. <https://doi.org/10.1063/1.4991217>.
- Moreno, M.A.; Córdoba, S.; Zampini, I.C.; Mercado, M.I.; Ponessa, G.I.; Alberto, M.R.; Nader-Macias, M.E.F.; Sayago, J.; Burgos-Edward, A.; Schmeda-Hirschmann, G.; Isla, M.I. (2018). "*Tetraglochin cristatum* (Britton) Roth: a medicinal plant from the Argentinean highlands with potential use in vaginal candidiasis". *Journal of Ethnopharmacology* 216: 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.001>.
- Neu, R. (1957). "A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms". *Naturwissenschaften* 43: 147-156.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. (1981). *The study of plant structure: Principles and selected methods*. Termarcarphi Pty. Ltd., Melbourne: 344.
- Pérez Grosso, T.; Mercado, M.I.; Ponessa, G.I.; Conci, L.R.; Virla, E.G. (2016). "Characterization of feeding injuries caused by *Ceresa nigripictus* Remes Lenicov (Hemiptera: Membracidae) on alfalfa stems". *Neotropical Entomology* 45(2):211-216. <https://doi.org/10.1007/s13744-015-0357-7>.
- Pérez, M.J.; Rodríguez, I.F.; Zampini, I.C.; Cattaneo, F.; Mercado, M.I.; Ponessa, G.I.; Isla, M.I. (2020). "Potential application of *Prosopis nigra* fruits waste as non-conventional sources of functional ingredients to food formulations". *LWT - Food Science and Technology* 132: 109828. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109828>.
- Purvis, M.J.; Collier, D.C.; Walls, D. (1966). *Laboratory techniques in Botany*. Second edition. Butterworth Company Ltd., London: 439.
- Ron, M.; Dorrity, M.W.; de Lucas, M.; Toal, T.; Hernandez, R.I.; Little, S.A.; Maloof, J.N.; Kliebenstein, D.J.; Brady S.M. (2013). "Identification of novel loci regulating interspecific variation in root morphology and cellular development in tomato". *Plant Physiology* 162: 755-768. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217802>.
- Ruzin, S.E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York: 336.
- Spence, J. (2001). "Plant histology" en Hawes, C.; Satait-Jeune-maitre B. (eds) *Plant Cell Biology, A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford: 189-206.
- The Plant List (2013), Version 1.1. [en línea]; <http://www.theplantlist.org> [Consulta: diciembre de 2020].
- Weaver, G.M.; Layne, R.E.C. (1965). "Cryostat sectioning of woody plant materials". *Canadian Journal of Botany* 43(4): 478-481. <https://doi.org/10.1139/b65-051>.
- Yeung, E. (1998). "A beginner's guide to the study of plant structure" en Karcher S.J. (ed) *Tested studies for laboratory teaching*, Chapter 9. Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Calgary: 125-142.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología vegetal: Técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires: 198.
- Zelko, I.; Lux, A.; Sterckeman, T.; Martinka, M.; Kollárová, K.; Lišková, D. (2012). "An easy method for cutting and fluorescent staining of thin roots". *Annals of Botany* 110: 475-478. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs046>.