

## NUEVA TECNICA DE DIAFANIZACION

POR CRISTINA G. DIZEO DE STRITTMATTER<sup>1</sup>

### INTRODUCCION

Se conocen numerosas técnicas de diafanización para el material vegetal. Muchas de ellas se basan en la acción del hidróxido de sodio (Al talib, K. H. y J. G. Torrey, 1961), del hidróxido de sodio e hidrato de cloral (Arnott, H. J., 1959), del hidrato de cloral y ácido láctico (Bisalputra, T., 1960), o del alcohol y lactofenol (Thoruaid Sorensen, 1953). También es utilizado el hipoclorito de sodio como reactivo diafanizante.

Todas estas técnicas, si bien logran en principio su objetivo, tienen como efecto secundario, además de requerir un prolongado proceso de laboratorio, la excesiva fragilidad del material resultante. Ello ha motivado una serie de pruebas en esta Cátedra en las que se han ensayado diversos métodos llegando a una nueva combinación de diafanizantes, con los cuales se lograron resultados más satisfactorios.

### TECNICA

Para la realización de la técnica que se expondrá se necesitan los siguientes reactivos:

- Hidróxido de sodio al 5 % en solución acuosa.
- Hipoclorito de sodio al 50 % en solución acuosa.
- Hidrato de cloral al 5 % en solución acuosa.
- Safranina a saturación en alcohol 80°.

#### *Los pasos a seguir*

Se toma el material fresco o previamente fijado<sup>2</sup> y se somete a los siguientes pasos:

<sup>1</sup> Técnica en Histología Vegetal de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires, Miembro de la Carrera del Técnico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

<sup>2</sup> No se han observado diferencias notables entre ambos tipos de materiales.

1) Se coloca en un vaso de precipitación, con alcohol 96° y se lleva a ebullición durante 10 minutos.

2) Se pasa a una solución de alcohol 96° e hidróxido de sodio al 5% en partes iguales y se lleva a ebullición durante 5 a 10 minutos, según la consistencia del material.

3) Se lava en un recipiente con abundante agua corriente, haciendo los cambios hasta que el agua quede totalmente limpia.

4) Se pasa el material lavado a agua destilada y se hacen dos cambios.

5) Se introduce el material en una solución de hipoclorito de sodio al 50% y se deja hasta que se torne totalmente transparente. El tiempo necesario, desde pocos minutos hasta una hora, depende del material, y por lo tanto requiere cuidado personal permanente<sup>1</sup>.

6) Se pasa a agua destilada y se hacen cinco cambios de 3 minutos cada uno.

7) Se coloca finalmente el material en hidrato de cloral al 5% para quitarle opacidad, bastando habitualmente 5-10 minutos. Sin embargo puede permanecer en esta solución todo el tiempo que sea necesario hasta poder realizar su observación directa o su montaje definitivo.

### Coloración

Si se desea observar con nitidez la vascularización del material diafanizado, se lo puede colorear de la manera siguiente:

1) Alcohol 70° durante 10 minutos.

2) Solución saturada de safranina en alcohol 80°, dejándose hasta que se observe el xilema completamente teñido de rojo; puede demorar unos 15 a 20 minutos.

El montaje en Bálsamo del Canadá para obtener un preparado definitivo requiere los siguientes pasos:

3) Alcohol 96° 5 a 10 minutos.

4) Alcohol 70° durante 5 a 10 minutos.

5) Xilol, dos cambios de 5 minutos cada uno.

6) Montaje en una gota de Bálsamo del Canadá natural.

Si se desea hacer un preparado semidefinitivo montado en gelatina glicerinada, se sigue la técnica de coloración hasta el paso n° 2 inclusive y luego se continúa de la manera siguiente:

3) Alcohol 80° durante 5 a 10 minutos.

4) Alcohol 70° durante 5 a 10 minutos.

<sup>1</sup> El proceso de diafanización puede interrumpirse conservando la pieza en alcohol 70°, previo pasaje por agua destilada, donde puede permanecer todo el tiempo necesario hasta poder continuar el proceso de diafanización.

- 5) Alcohol 50° durante 5 a 10 minutos.
- 6) Agua destilada durante 3 a 5 minutos.
- 7) Montaje en una gota de gelatina glicerinada.

La tinción indicada precedentemente da por resultados que: el sistema vascular se tiñe de rojo intenso y las epidermis y parénquimas toman color rosado.

#### MATERIALES ENSAYADOS

Se ha trabajado con éxito en numerosos materiales de hoja, flor, plántulas y tallos delgados. Para ilustrar la técnica se ha elegido los tiempos empleados en dos materiales de consistencia diferente.

A. Hoja de *Combretum fruticosum*, coriácea gruesa y rica en substancias coloreantes.

B. Flor de *Spiraea cantoniensis*, muy tenue y frágil.

*Ejemplo de los tiempos utilizados en:*

##### A. *Combretum fruticosum*

Pasos	
1)	10 minutos
2)	7 minutos
3)	10 minutos
4)	21 minutos
5)	30 minutos
6)	15 minutos
7)	10 minutos
Total	84 minutos

##### B. *Spiraea cantoniensis*

Pasos	
1)	3 minutos
2)	3 minutos
3)	5 minutos
4)	2 minutos
5)	10 minutos
6)	15 minutos
7)	5 minutos
Total	43 minutos

Conviene recalcar nuevamente que los tiempos arriba indicados deben variarse de acuerdo a la consistencia, naturaleza y tamaño del material que se desea diafanizar.

#### CONCLUSIONES

De acuerdo con lo expuesto en la introducción, la dificultad con que por lo general se tropieza manipulando el material diafanizado por los métodos corrientes, es su extremada fragilidad y el tiempo que insume la técnica.

La variante introducida, cuyo proceso hemos descripto precedentemente, soluciona ambos problemas: reduce considerablemente el tiempo a emplear y se obtiene un material de mayor consistencia y por ello de más fácil manejo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Deseo agradecer muy cordialmente al Ing. Agr. Osvaldo Boelcke y a la Dra. Elena Ancibor por la revisión del texto y oportunas sugerencias.

## BIBLIOGRAFIA

- AL TALIB, K. H. and J. G. TORREY, 1961. Sclereid distribution in the leaves of *Pseudotsuga* under natural and experimental conditions. *Am. J. Bot.* 48: 71-79.
- MORLEY, T., 1949. Staining of plant materials cleared in NaOH. *Stain Tech.* 24: 231-235.
- ARNOT, H. J., 1959. Leaf clearings. *Turtox News* 37: 192-194.
- BRADY, E. R., D. K. WEMPLE and N. R. LERSTEN, 1965. Floras vasculature as a potential taxonomic character in *Dalea* (Leguminosae). *Proc. Iowa Acad. Sci.* 71: 46-51.
- BISALPUTRA, T., 1960. Anatomical and morphological studies in the Chenopodiaceae. I. Inflorescence of *Atriplex* and *Bassia*. *Austral. J. Bot.* 8: 226-242.
- 1961. Anatomical and morphological studies in the Chenopodiaceae. II. Vascularization on the seedling. *Austral. J. Bot.* 9: 1-19.
- THORUVALD SORENSEN, 1953. A revision of the greenland species of *Puccinellia* Parl. Reprinted from *Meddelelser on Grönland* 136 (3): 10.