

Técnica histológica para algas rojas calcáreas

Introducción

La histología es la disciplina que estudia todo lo relacionado con los tejidos, ya sean estos de animales o plantas (Gartner & Hiatt 2002). Actualmente existen muchos métodos histológicos que se utilizan para poder observar y describir las estructuras internas de diversos organismos.

Para el caso de las algas rojas coralinas (Rhodophyta: Corallinales, Sporolithales), no es posible identificar con certeza a los géneros/especies con base únicamente en su forma de crecimiento u otras características morfológicas externas. Por lo que para obtener una identificación precisa y confiable, se requiere realizar métodos histológicos que permitan examinar los caracteres vegetativos y reproductivos (Harvey & Woelkerling 2007).

Una técnica histológica comúnmente utilizada es la citada por Riosmena-Rodríguez *et al.* (1999). En ella se describe de manera resumida los pasos generales de descalcificación, tinción, deshidratación, inclusión, corte y montaje de los tejidos. Por otra parte, información al respecto de cuestiones particulares, no es presentada por dichos autores, motivo por el cual describimos a continuación el proceso estandarizado en siete pasos, utilizado por el grupo de Investigación en Botánica Marina de la Universidad del Mar.

1. Selección de muestra a procesar

- En un estereoscopio, se seleccionarán secciones del talo con estructuras reproductivas (protuberancias superficiales, Fig. 1).

2. Descalcificación (Fig. 2A)

- Colocar en un frasco de vidrio pequeño el

fragmento del talo seleccionado. Se deberá tener cuidado de colocar en los respectivos frascos, los datos del ejemplar.

- Posteriormente añadir ácido nítrico (HNO_3) al 1.8 M para algas coralinas no geniculados, o al 0.6 M para algas coralinas geniculados. Ambas concentraciones deberán cubrir por completo los tejidos. Dejar reposar durante una hora y realizar 12 recambios con el mismo lapso de tiempo. Se evidenciará que el tejido esta descalcificado cuando este se encuentre flotando.

3. Tinción (Fig. 2B)

- Retirar el ácido nítrico y colocar permanganato de potasio (KMnO_4) al 0.1% hasta cubrir por completo el tejido. Dejar reposar durante una hora y posteriormente realizar 6 recambios con el mismo lapso de tiempo. La concentración no varía para ambos grupos.

4. Deshidratación (Fig. 2C)

- Colocar en casetes de plásticos los tejidos, al igual que los datos de los ejemplares.
- Posteriormente se deberán colocar en el siguiente tren de alcoholes.

Alcohol etílico al 30% (30 minutos)

Alcohol etílico al 60% (30 minutos)

Alcohol etílico al 90% (30 minutos)

Alcohol etílico al 100% (30 minutos)

Alcohol etílico-butílico 1:1 (30 minutos)

Alcohol butílico al 100% (30 minutos)

- Finalmente las muestras se colocarán en un recipiente que contenga parafina al 100% a 60°C

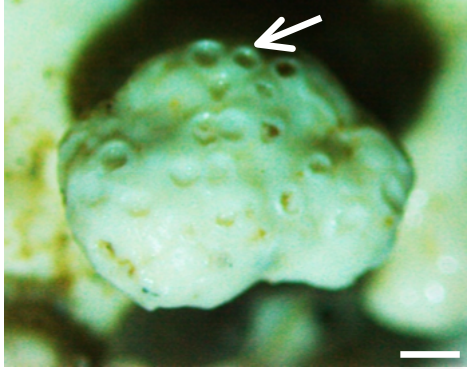


Figura 1. Rama de un rodolito con conceptáculos (flecha). La fotografía pertenece al rodolito con número de herbario de la Universidad del Mar PC XXI. La barra de escala representa 1mm.

(12 horas con dos recambios cada seis horas).

Lo anterior se puede realizar de manera automática en un Histoquinet, o de manera manual en cajas sucesivas de tinción.

5. Inclusión (Fig. 2D)

- Pasar y colocar las muestras, en un recipiente con parafina ya derretida a 60°C, (este traspaso debe ser muy rápido para poder evitar que los tejidos se solidifiquen).

Para cada una de las muestras:

- Del recipiente, tomar un casete y quitarle la tapa.
- En un pequeño molde de acero o de plástico vertir parafina a una temperatura de 60°C y

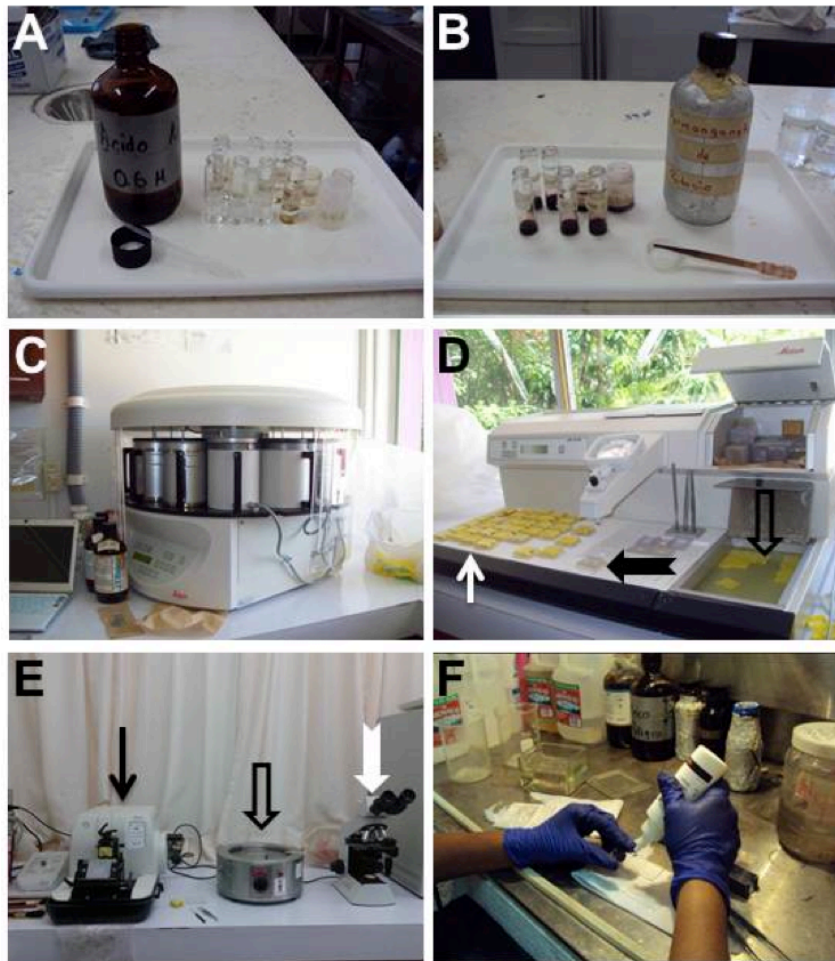


Figura 2. Histología de algas rojas coralinas. A) Descalcificación. B) Tinción C) Deshidratación de las muestras en un Histoquinet . D) Inclusión: Solidificación de las muestras (flecha), molde de plástico (flecha con muesca) y depósito de muestras con parafina derretida a 60°C (flecha sin relleno). E) Cortes: Micrótopo (flecha), recipiente de baño maría a 45 °C (flecha sin relleno) y microscopio para la observación y selección de laminillas (flecha con muesca). F) Montaje con resina sintética.

colocar rápidamente el tejido de forma vertical u horizontal. La posición dependerá del tipo de corte que se requiera obtener.

- Colocar el casete de forma que embone con el molde de acero o plástico.
- Verter nuevamente parafina hasta que cubra por completo el casete y finalmente dejar reposar hasta que la parafina se halla solidificado.

6. Cortes (Fig. 2E)

- Los bloques de parafina obtenidos, se colocan en un micrótopo y el grosor del corte de los tejidos se realiza a 6 micras.
- El tejido se coloca en un baño maría a una temperatura de 45°C, posteriormente en un porta objeto y utilizando una aguja de disección se coloca el tejido.
- Observar la laminilla en un microscopio y si el tejido presenta las estructuras que se necesitan para la determinación, conservarla y colocar los datos del ejemplar, de no ser así, desechar el tejido y volver a cortar.

7. Montaje (Fig. 2F)

- Con el fin de derretir la parafina, colocar las laminillas en una canastilla de tinción y dejarlas en un horno a 60 grados durante 24 horas.
- Posteriormente, los residuos de parafina que quedaron en las laminillas, se retiran una vez que las muestras son colocadas en una caja de tinción que contenga Citoseal o en caso de no contar con la sustancia, utilizar xileno.
- En seguida, tomar una laminilla, colocar 5 gotas de resina sintética líquida y cubrirlo con un cubre objetos (tratar de no dejar burbujas de aire). Repetir con el resto de las laminillas.
- Dejar secar las laminillas en una estufa a 60 °C durante 48 horas y finalmente limpiar y observar las laminillas en un microscopio.

A manera de resumen se presenta en el siguiente diagrama la técnica histológica antes descrita (Fig. 3).

Referencias

- Gartner, L.P. & J.L. Hiatt. 2002. Texto atlas de histología. 2a ed. McGraw-Hill Interamericana, 599 pp.
- Harvey, A.S. & W.J. Woelkerling. 2007. A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Ciencias Marinas* 33(4): 411-426.
- Riosmena-Rodríguez, R., W.J. Woelkerling & M.S. Foster. 1999. Taxonomic reassessment of rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales, Rhodophyta) in the Gulf of California, Mexico. *Phycologia* 38(5): 401-417.

**Jesús Marino Antonio-Sánchez*,
Susana Sánchez-Palestino & Edgar Francisco
Rosas-Alquicira**

Universidad del Mar, campus Puerto Ángel,
Ciudad Universitaria s/n, Oaxaca, México).

* j_masbm@hotmail.com

Recibido: 13 de noviembre de 2014

Aceptado: 10 de enero de 2015

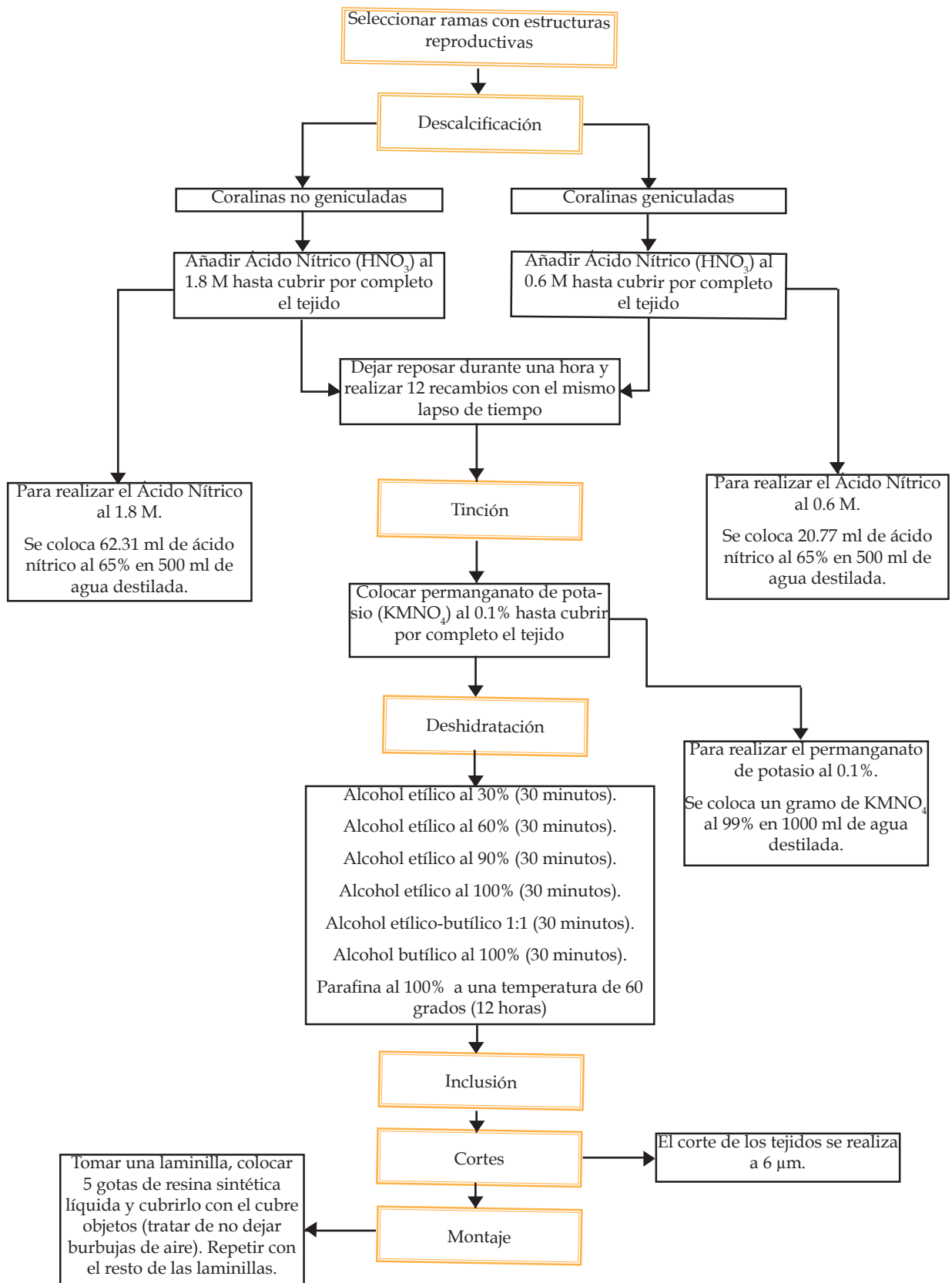


Figura 3. Diagrama de flujo en donde se muestran los pasos a seguir para la obtención de laminillas permanentes de algas rojas calcáreas.