

# SOBRE LA FIJACION Y COLORACION DEL CONDRIOMA DE LAS CELULAS VEGETALES

Por RAFAEL ORTIZ-CAMPOS

De la Estación Experimental de Aula-Dei, Zaragoza, España

EN la presente nota, previa a otro trabajo en que con más extensión trataremos del condrioma animal y vegetal, queremos simplemente, hacer el esquema de una serie de técnicas aplicadas a poner en evidencia el aparato mitocondrial de las células meristemáticas de algunas especies vegetales, con una crítica sobre aquellas que nos parecen de una mayor utilidad y que basados en los resultados con ellas logrados, estimamos de uso más aconsejable por la seguridad que ofrecen, rapidez y al mismo tiempo simplismo que presentan y, finalmente, por su menor coste, comparado con las clásicas técnicas mitocondriales.

Creo, en primer lugar, si no necesario, por lo menos útil, justificarnos al hacer este pequeño trabajo y exponer, siquiera sea de una manera sucinta, el por qué del mismo. Cuando comenzamos la preparación de la tesis doctoral y siempre bajo la dirección y asesoramiento de mi entrañable maestro, el catedrático de la Facultad de Medicina Dr. Martínez Pérez, elegimos como tema para la misma «La histo-fisiología del condrioma». Empleamos a tal fin material animal perteneciente a ratones y cobayos de pocos días, observando las características morfológicas y de localización de los elementos mitocondriales en condiciones normales y las modificaciones de las mismas, tratando de ligar unas y otras, con las diferentes fases de actividad celular provocadas experimentalmente, mediante la inyección de sustancias estimulantes e inhibitoras. Fuimos ensayando, uno a uno, todos los procedimientos y técnicas, tanto de fijación como de coloración de los cuales encontramos reseña bibliográfi-

ca, habiendo obtenido con ellos resultados muy dispares, cuyas particularidades no es momento de exponer por ser objeto de otro trabajo.

Posteriormente, al crearse el Centro de Biología Experimental de Cogulla-da, hoy de Aula-Dei, bajo los auspicios del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, reincidimos en nuestras observaciones sobre el condrioma, en este caso, ya sobre material vegetal; pero cada vez con un mayor entusiasmo, y convencidos plenamente del extraordinario papel que las formaciones mitocondriales desempeñan en las distintas funciones de la célula viva y afianzados en la idea de que el condrioma, ese pequeñísimo organito intracelular, cuya talla apenas sobrepasa algunas décimas de micra, no puede permanecer impasible ante toda la serie de fenómenos que la célula sufre en el transcurso de su vida, sea cuales sean las condiciones en que se la observe.

Han sido numerosos los trabajos consultados, pese a las grandes dificultades que por las actuales circunstancias hemos encontrado y figuran entre ellos: varios del Profesor Guilliermond, Dangeard, M. Mascré, J. Politis, Milovidov, Policard, Lewitsky, Mangenot, Emberger, Cowdry, M. Mirande, Nadson, Wassermann, etc. En todos ellos hemos observado una constancia casi absoluta en lo que se refiere a fijaciones y coloraciones empleadas. Entre los fijadores conceden preferencia, en general, a los líquidos de Regaud, Altmann y Meves, y en cuanto a coloraciones, la inmensa mayoría refieren sus observaciones a imágenes obtenidas con la hematoxilina de Regaud, férrica de Heidenhain y las coloraciones vitales, especialmente con Verde Jannus B. Sin embargo, muchos de los autores citados silencian, y otros, conceden una importancia muy secundaria, a pesar de citarla en sus trabajos, a la técnica de Kull, introducida por su autor como una modificación a la clásica técnica de Altmann y con la cual, nosotros, casi sin ninguna excepción, hemos obtenido unos formidables resultados y conseguido unas bellas preparaciones con imágenes mucho más vistosas y demostrativas que con los demás procedimientos, por cuyo motivo, a ella, casi de una manera exclusiva, nos referimos en esta nota, queriendo llamar la atención, no sólo sobre aquellos puntos o detalles de técnica que consideramos fundamentales y que, a nuestro juicio condicionan el éxito de la misma, sino también en los resultados tan completamente discordantes, obtenidos utilizando diversos tipos de fijadores. De todos nuestros ensayos y de las conclusiones a que llegamos, hacemos una exposición a continuación.

Al comenzar nuestras observaciones sobre especies vegetales, teníamos ante nosotros el problema de las técnicas a seguir; guiados por nuestra experiencia sobre materiales animales, nos pareció lo más lógico comenzar aplicando a este nuevo material aquellas que ya habíamos utilizado en aquellos.

Comenzamos por colocar semillas de *Vicia Faba* para su germinación en Jacobsen y macetas; en el primer caso mantenemos una temperatura constante de 24-26 grados y una atmósfera húmeda igualmente constante; en las macetas procuramos de la misma forma que la humedad varíe lo menos posible y lo dejamos a la temperatura del laboratorio. La misma marcha se ha seguido con otras especies, entre las que figuran garbanzo, guisante, trigo, maíz, etcétera, y los resultados logrados han sido prácticamente los mismos, operando de las dos formas, Jacobsen y macetas, de ahí que hagamos una descripción única.

Los meristemos radiculares, tomados apenas iniciada la germinación han sido llevados directamente al fijador, sin previo lavado en agua para evitar los fenómenos de imbibición e hinchamiento, que puedan, posteriormente, alterar los resultados (M. Mascré). Los fijadores, recientemente preparados en todos los casos, han variado no sólo de una especie a otra entre las varias ensayadas, sino para una misma y, en consecuencia, han sido muy diferentes las imágenes obtenidas.

Hemos concedido preferencia a aquellos fijadores en cuya composición química entran el bicromato potásico, sublimado y formol; también el ácido ósmico, pero éste en menor escala, dadas las dificultades con que hemos chocado para la obtención de un producto que nos merezca confianza. Entre los fijadores ensayados figuran: el líquido de Orth, Regaud, Zenker, Helly, Dubreuil, Champy, etc.

El tiempo de fijación ha oscilado, en líneas generales, entre seis y veinticuatro horas según el fijador empleado y la especie a tratar; sistemáticamente se ha hecho, tras la fijación, un meticuloso lavado en agua destilada frecuentemente renovada. En todos los casos se ha precedido a una inclusión rápida en parafina, sobre cuya técnica nos declaramos abiertos defensores, desechando esas inclusiones en que hay que abandonar las piezas varios días en los distintos deshidratantes; en nuestra inclusión hemos evitado, en lo posible, la permanencia prolongada en los alcoholes, y con ello, la retracción subsiguiente de las preparaciones. A continuación de la deshidratación hemos abandonado las piezas en un líquido aclarante, durante un tiempo variable entre una y veinticuatro horas, tras lo cual se había conseguido, sin ninguna excepción, una perfecta transparencia y diafanidad de los cortes.

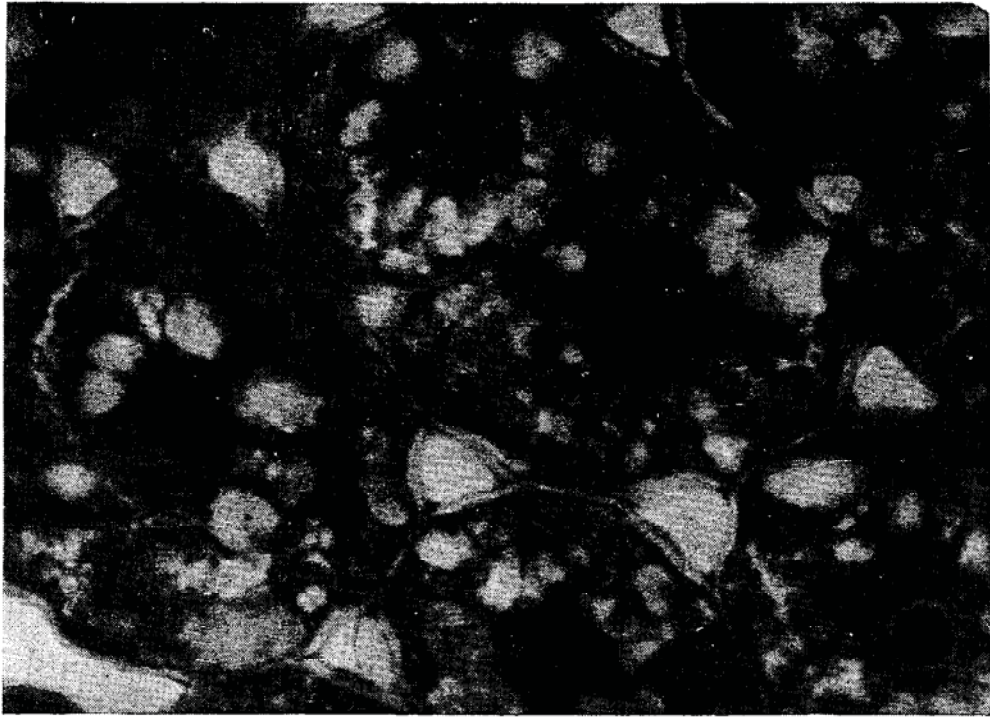
Aunque a las piezas han sido dadas diversas orientaciones, se ha concedido preferencia a los cortes transversales, por parecernos a la par, que más demostrativos, que reúnen mejores condiciones para visiones de conjunto e imágenes microfotográficas.

Hemos utilizado diversas técnicas de coloración, desde la clásica de Benda, pasando por la hematoxilina de Regaud y férrica de Heidenhain, como más aconsejadas por la inmensa mayoría de los autores (Guilliermond, Wassermann) hasta la modificación de Kull a la coloración con la fuchina de Altman, a cuyo empleo el material vegetal no se ha concedido la importancia que, en nuestro sentir, tiene por los buenos resultados que proporciona y en cuyos pormenores entraremos más adelante.

*Crítica de los resultados obtenidos y técnicas aplicadas.*— Podemos dividir nuestro trabajo en dos partes, siendo eminentemente prácticas las dos. 1.º Resultados obtenidos con el empleo de distintos fijadores en variadas especies y utilizando siempre como proceder de coloración la técnica de Kull. 2.º Actuando sobre material fijado con líquido de Helly, colorear con distintas técnicas.

1.º *Fijadores.*— a) Utilizamos en primer lugar la mezcla de ORTH, cuya composición ya dejamos apuntada; la fijación se prolongó durante treinta horas en la oscuridad y a la temperatura ambiente; posteriormente lavamos veinticuatro horas en agua corriente y, finalmente, se incluye en parafina, se-

gún técnica ordinaria. Los repetidos lotes ensayados con esta mezcla han dado imágenes vacuoladas del protoplasma que se reproduce en las microfotografías de las figuras 1, 2 y 3. La figura 1, corresponde al meristemo ter-



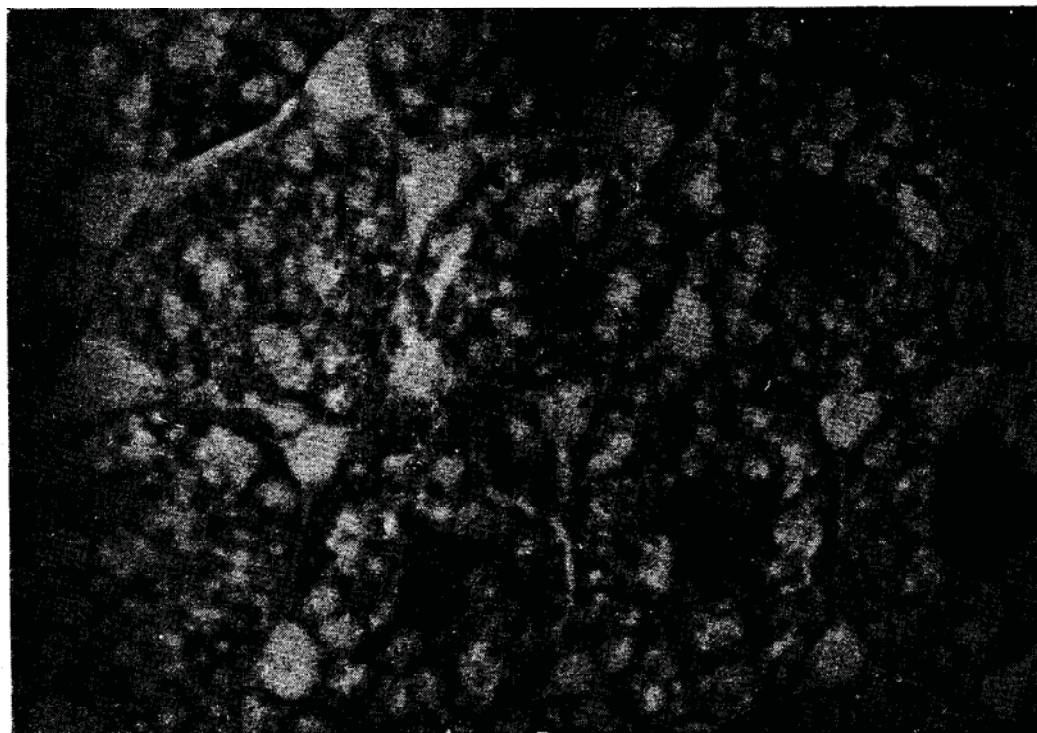
**Fig. 1.**—Reproduce meristemo terminal de «Vicia Faba» fijada por líquido de Orth y coloreado por Kull. Aparece imagen francamente vacuolada del protoplasma, con algún gránulo correspondiente a mitocondrias  
Obj. 2 mm. Ap 1: 32. Ocu. 12/B-Leitz

minal de Vicia, y en ella pueden apreciarse una serie de grandes células de forma más o menos ovoidea, donde aparecen perfectamente marcados los límites celulares por una membrana muy visible que, a veces, presenta un doble contorno. Destaca el núcleo en oscuro, festoneado, y con un refrigente nucleolo; se observan, igualmente, algunos grumos cromáticos. El protoplasma se presenta surcado por una serie de cavidades o vacuolas, de muy diversos tamaños y con cierta tendencia a confluir; dichas cavidades están limitadas por finas paredes que, tomando su origen en el núcleo, parten en sentido radiado hacia la periferia. Las referidas vacuolas, están limitadas por tabiques, generalmente finos, en cuyo seno se observan algunas pequeñas granulaciones, de contornos imprecisos y más gruesas en las inmediaciones del núcleo que en las zonas externas de la célula. Estos gránulos son la representación del condrioma, el cual adopta la disposición de mitocondrias, no habiendo podido observar ni un solo bastoncito y, en todo momento, es bien claro el desplazamiento de los elementos mitocondriales hacia las paredes de las vacuolas.

La microfotografía de la fig. 2, corresponde al meristemo del guisante tomado, como en el caso anterior, apenas iniciada la germinación, y habiéndose desarrollado ésta en igualdad de condiciones de humedad y tempera-



tura que en el caso anterior. La fijación y coloración han sido llevadas a cabo por idénticas técnicas, siendo en consecuencia análoga la imagen y, si cabe, más acusado el aspecto vacuolar del protoplasma, apareciendo los



**Fig. 2.—Meristemo de «Pisum Sativum»; fijación de Orth y coloración de Kull. Análogas características a la figura anterior; protoplasma vacuolado con el condrioma en los tabiques de las vacuolas.**

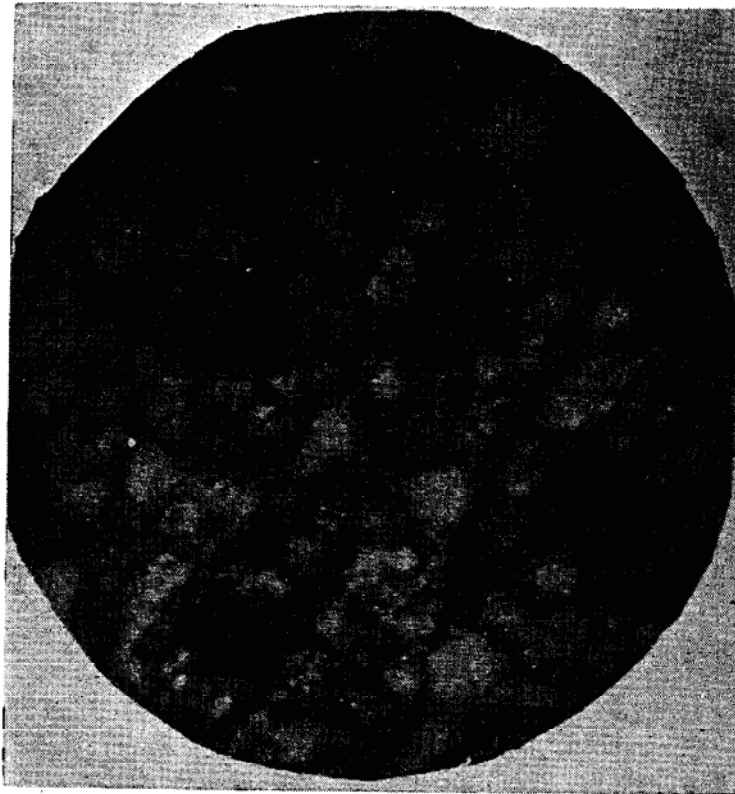
**Obj. 2 mm. Ap. 1: 32. Ocu. 8/B: Leitz.**

mismos tabiques donde residen los componentes del condrioma con semejantes características.

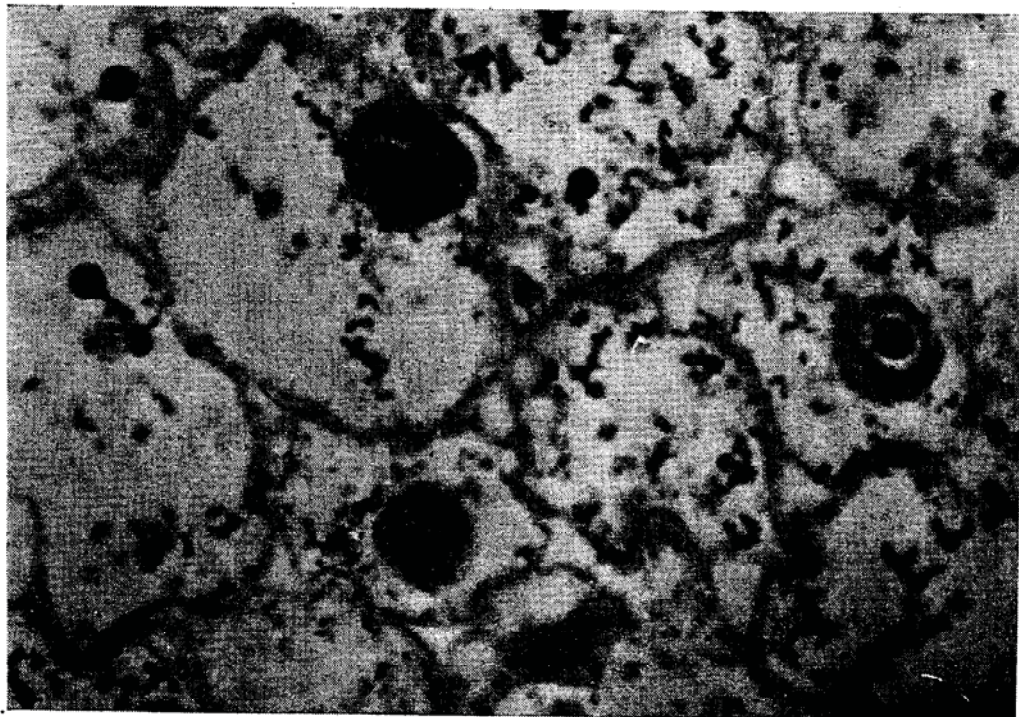
La fig. 3, reproduce un campo de peculiaridades muy parecidas, correspondiente a raicilla de garbanzo, y a la cual, se puede hacer extensivo cuanto hemos dicho para las dos imágenes anteriores.

b) Empleando la misma coloración, como ya hemos dicho anteriormente, fijamos en este caso el líquido de ZENKER; el tiempo de fijación ha oscilado entre seis y doce horas (han sido realizados diversos lotes), tras un prolongado lavado, los bloques han sido tratados por alcohol yodado, hiposulfito sódico y posterior inclusión.

La fig. 4, correspondiente a Vicia, pone de manifiesto los resultados obtenidos: se observan varias células de contornos irregulares, pero netos; llama la atención, especialmente en una de ellas, el desplazamiento que el núcleo ha sufrido hacia la membrana celular. En otras, el núcleo queda representado por un nucleolo intensamente teñido e incluso dividido, tomando uno de los fragmentos un aspecto piriforme. El protoplasma parece como si hubiese sufrido un proceso de lisis, quedando reducido a unas sombras imprecisas, mientras que el condrioma representado por mitocondrias independientes y algunos pequeños condriocentes arrosariados, originados por alineación de cuatro o más elementos, queda suspendido en esos espacios vacíos del protoplasma.



**Fig. 3.**—Raicilla de «Cicer Arietinum», tomada apenas iniciada la germinación. Fijación de Orth y coloración de Kull. Imagen semejante a las anteriores por su aspecto vacuoliforme, con finos gránulos intervacuolares.  
Obj. 2 mm. Ap. 1: 32. Ocu. 12/B: Leitz.



**Fig. 4.**—Meristemo terminal de Vicia. La fijación ha sido realizada en Zenker y la coloración por Kull. Desplazamiento del núcleo y lisis del protoplasma, con el condrioma disperso y aglutinado en la célula muy alterada.  
Obj. Ap. 4 mm. 45: 1. Ocu. 12/B: Leitz.



Las figs. 5 y 6, correspondientes al guisante y garbanzo, respectivamente, reproducen una morfología semejante, apareciendo el mismo aspecto de lisis del protoplasma, carácter que en la fig. 6 se presenta mucho más acusado en las células centrales que en las de la cutícula.

En todas nos llama la atención una manifiesta alteración en el ordenamiento de todos los componentes celulares, incluso el núcleo; pero de una manera especial la difusión del condrioma que presenta características muy distintas de las que tendremos ocasión de apreciar en otras imágenes. Queremos destacar que, empleando este mismo fijador en material animal, conseguimos bellas preparaciones, sin que en ningún caso se nos produjesen tan manifiestas alteraciones.

c) Habiendo obtenido magníficas preparaciones operando con material animal y siguiendo a Kull, quien asegura que el mejor fijador para su técnica de coloración, modificación a la de Altmann, es el líquido de Champy, hemos hecho actuar el referido fijador sobre meristemos radiculares de Vicia, durante un tiempo de veinticuatro horas y posterior cromado de las piezas con bicromato potásico al 3 % durante tres días, lavado cuidadoso y prolongado en agua y, finalmente, inclusión corriente.

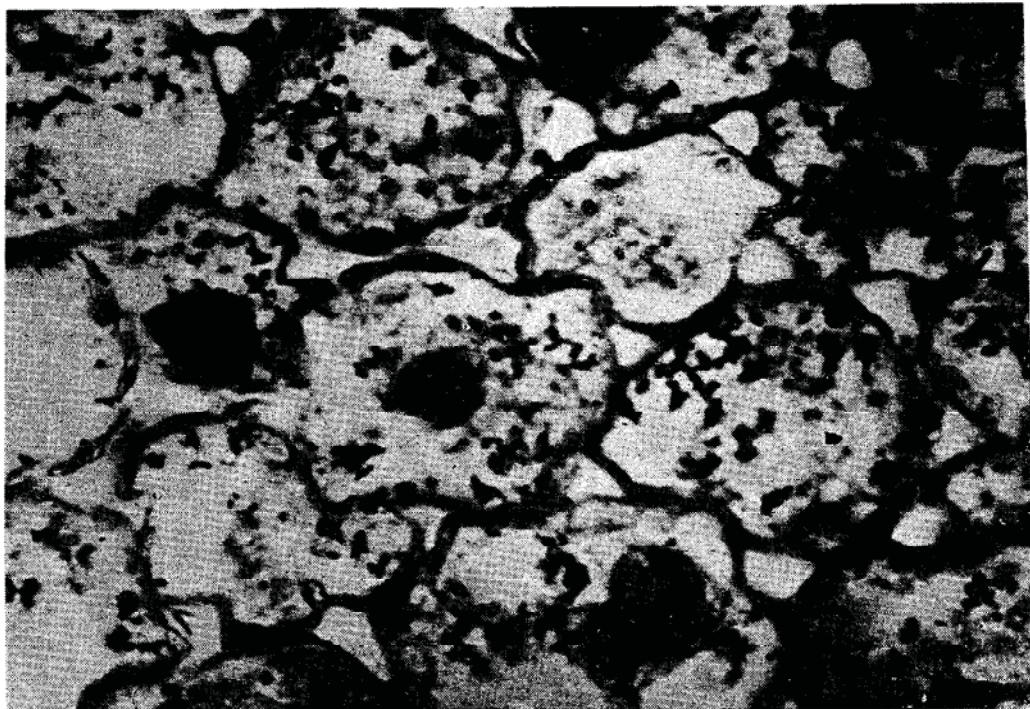
Los resultados obtenidos distan mucho de ser satisfactorios, como puede observarse en la microfotografía de la fig. 7; entre las variadas células que aparecen, destaca una en mitosis, que ocupa la porción central del campo; en general, se puede decir que el aspecto es muy parecido al de las figuras anteriores. La distribución del condrioma es muy irregular y siguen presentándose imágenes de lisis protoplásmica, si bien menos acentuada que cuando operábamos con Zenker. Son muy visibles algunos gruesos condriocotes francamente incurvados y angulosos.

La fig. 8 (garbanzo), reproduce un aspecto análogo, pudiéndose observar las mismas figuras en el condrioma, aunque aquí predominen los granos sueltos (mitocondrias).

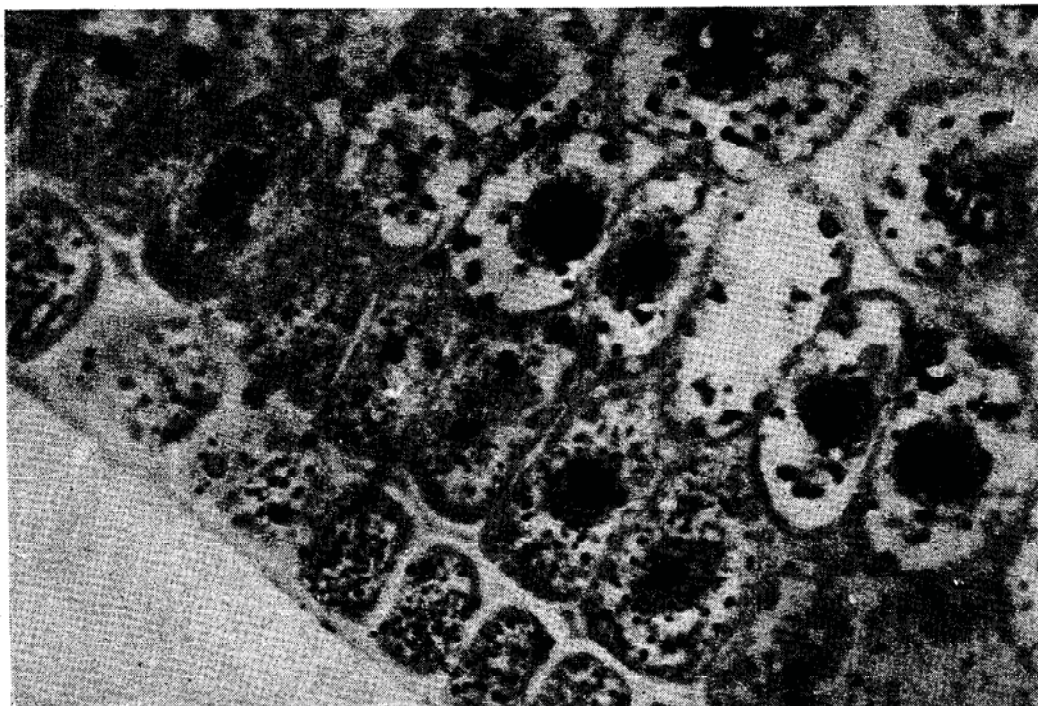
d) Otro de los fijadores que hemos empleado con preferencia y con el cual hemos obtenido los más satisfactorios resultados, ha sido el líquido de HELLY, de fórmula muy parecida al Zenker, sustituyendo el ácido acético por formol, teniendo un especial cuidado en que la adición del formol se haga en el crítico momento de utilizar el fijador, de lo contrario se forma un precipitado pardusco y las imágenes son siempre muy borrosas.

Las piezas han permanecido en fijador tiempos comprendidos entre seis y doce horas, sin pasar nunca de este último límite y debiendo señalar que los mejores resultados han sido conseguidos para fijaciones de seis-ocho horas en estufa a 37°. Tras la fijación se ha hecho un lavado en agua destilada, renovada frecuentemente y, finalmente, tratamiento con alcoholes yodados, hiposulfito al 0,25 % e inclusión. En todos los casos se ha obtenido una perfecta fijación de las estructuras celulares con un mínimo de alteración en las mismas.

La fig. 9, de Vicia, con características lo más parecidas posibles a las de las figuras anteriores, reproduce una serie de células, en general, de gran talla y contornos menos sinuosos que las vistas hasta ahora; su forma es más o menos ovoide, y en ellas, especialmente, en las situadas en la parte superior del campo, se observan los núcleos en oscuro con algunos pequeños grumos de cromatina, destacando perfectamente el nucleolo; el protoplasma, en la

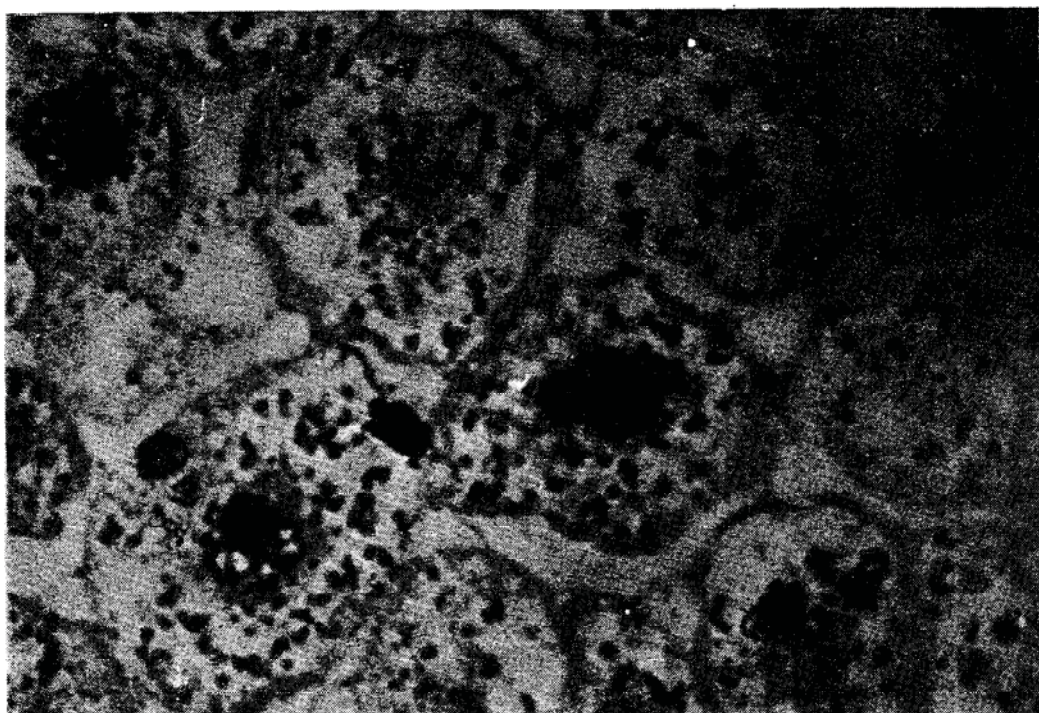


**Fig. 5.**—*Pisum*, cuyo meristemo ha sido fijado en Zenker y teñido por Kull. Conglutinación cromática, apareciendo los núcleos como una gran mancha. Los protoplasmas con fenómenos de lisis, análogos a la figura 4.  
Obj. 6L. 45: 1. Ocu. 12/B: Leitz.



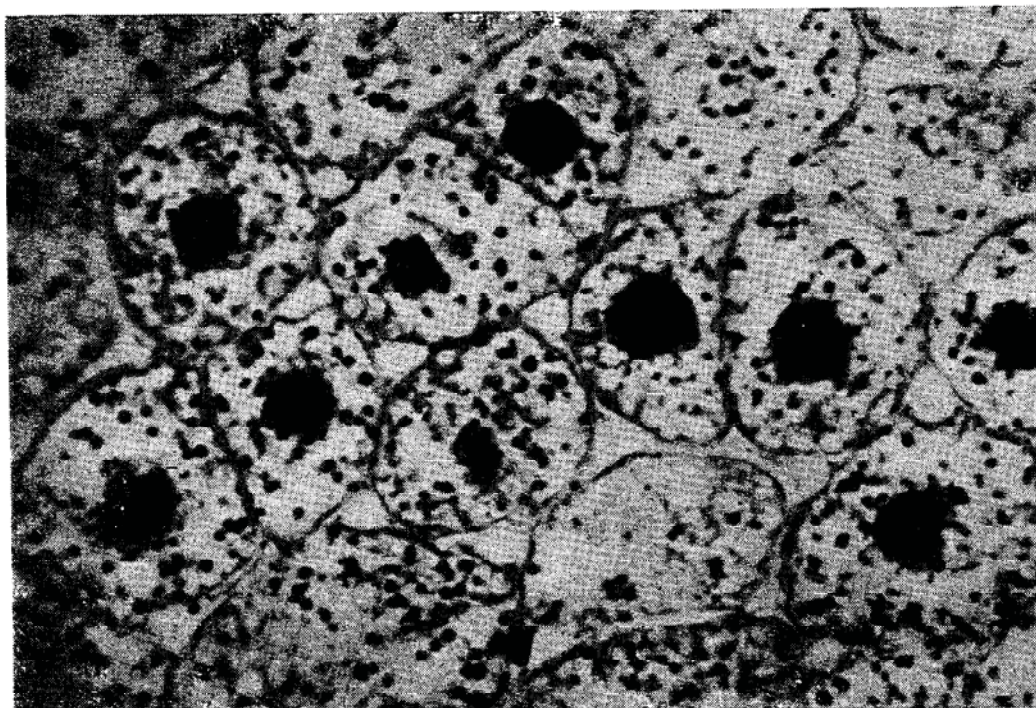
**Fig. 6.**—*Cicer Arietinum*, fijado y coloreado como la figura anterior. Aparece la misma imagen vacuolada y de lisis protoplásmica, que es muy patente, especialmente en las células centrales y apenas en las cuticulares.  
Obj. 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 8/B: Leitz.





**Fig. 7. —** Corresponde a raicilla de «Vicia», fijada por Champy y realizada la coloración según Kull. Gruesos condriotes incurvados y angulosos y el protoplasma, con el aspecto de haber sufrido fenómenos de lisis. En el centro del campo destaca una mitosis.

**Obj. Ap. 6 L. 45: 1. Ocu. 8/B: Leitz.**

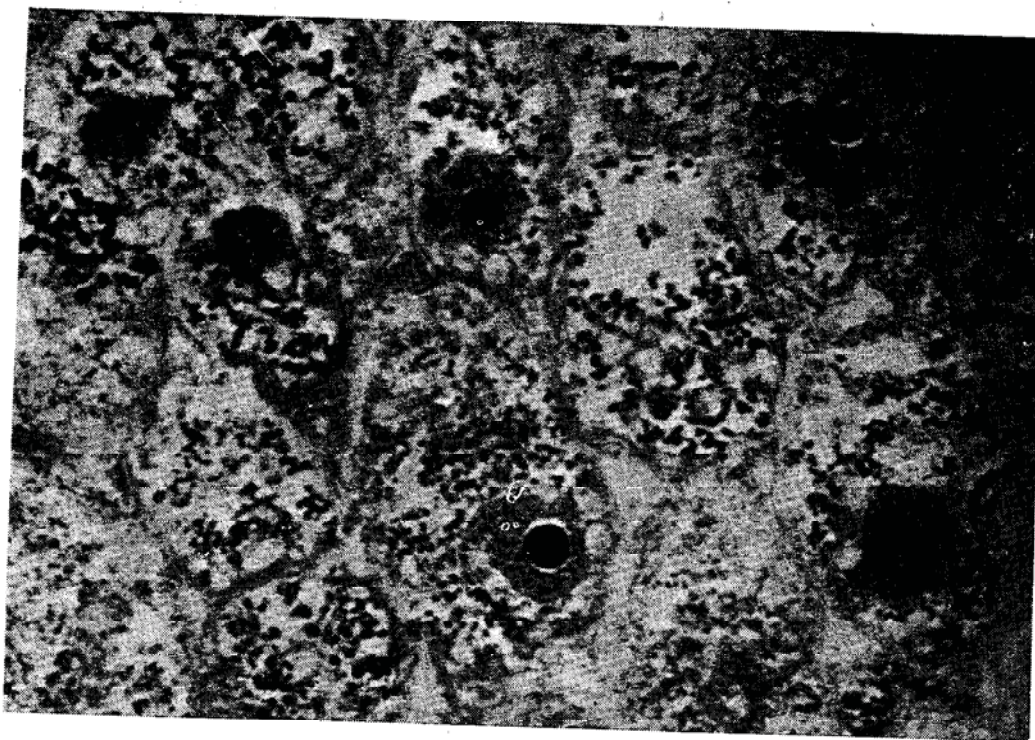


**Fig. 8. —** Imagen predominante de granulaciones gruesas (mitocondrias), en un protoplasma con características parecidas a la figura anterior y una marcada conglutinación de la materia cromática del núcleo. Sección transversal de raicilla de «Cicer Arietinum».

**Obj. 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 10, B: Leitz.**



microfotografía en gris pálido, tiene un aspecto finamente grumoso y alberga un rico aparato mitocondrial, formado por gránulos sueltos, en general, de pequeña talla, y algunos condriocentos de formas caprichosas, y en muchas ocasiones de aspecto arrosariado.



**Fig. 9.**—Corte transversal de «Vicia». Fijación de Helly y coloración de Kull. Protoplasmas en buen estado de conservación y con un aspecto grumoso, donde destacan abundantes granulaciones y angulosos condriocentos. Gran refringencia de los nucleolos.

Obj. 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 8/B: Leitz.

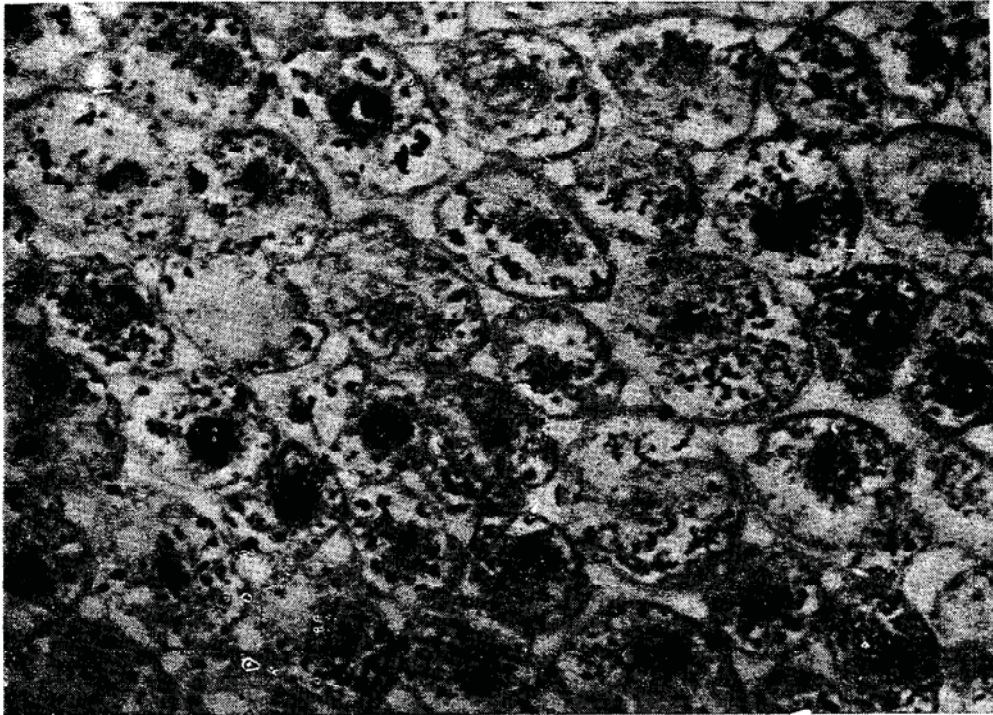
Las figs. 10 y 11, reproducen en garbanzo y guisante, campos muy parecidos, sobre los cuales se puede repetir todo lo dicho anteriormente.

Es necesario llamar la atención sobre la diferencia tan marcada existente entre las figs. 4 y 9. La 9, reproduce una preparación realizada sobre fijador Helly, en tanto que la 4 lo hace sobre Zenker. Si recordamos la composición química de uno y otro líquido (solución de Müller en los dos casos, acético en el Zenker y formol en el Helly), se aprecia una gran analogía, y la única diferencia estriba en el segundo componente; efectivamente, en el Helly se ha sustituido el ácido acético por el formol. Esta circunstancia nos obliga a interpretar que la diferencia de estructura, encontrada en las preparaciones con uno y otro fijador, sea debida a alteraciones provocadas, en el caso del Zenker, por el acético y que podrían ser del orden de coagulaciones proteicas del protoplasma, con separación de las distintas fases del coloide citoplasmático, como ya hizo notar M. Mascré.

En la preparación del fijador de Helly, hemos obtenido mejores resultados, utilizando formol neutro con carbonato de magnesia.

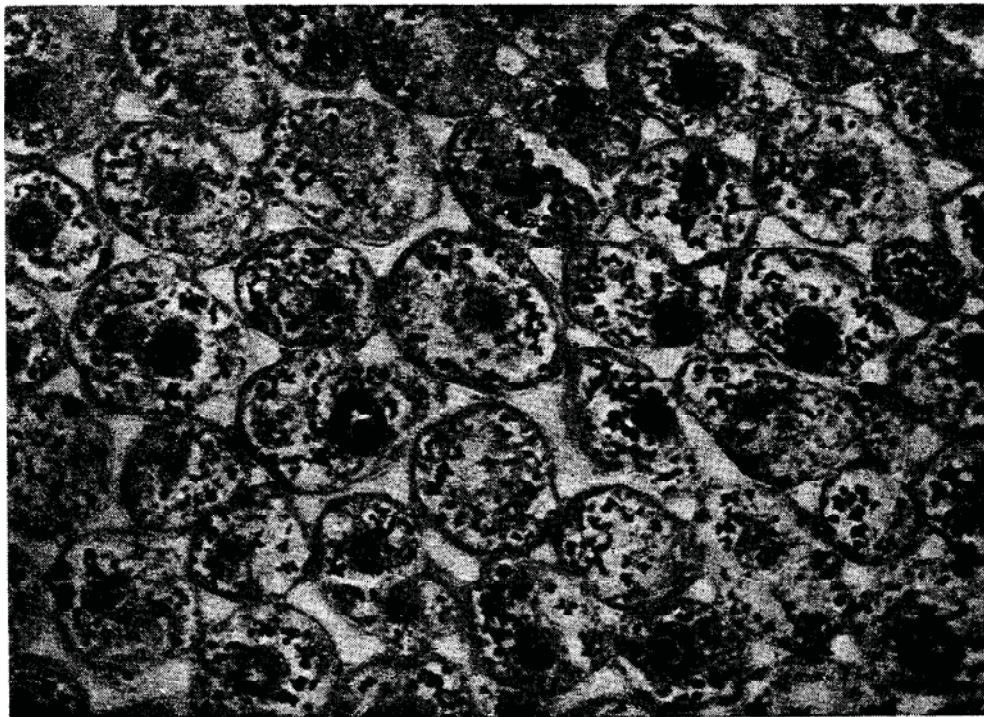
e) Finalmente, también hemos obtenido excelentes resultados, utilizando la mezcla fijadora de Held (bicromato potásico, formol y acético). Romeis aconseja el posterior tratamiento con alumbre de hierro, tratamiento que





**Fig. 10.** «Cicer Arietinum». Fijación y coloración como en la figura anterior. La imagen es muy parecida a la figura 9, y todas las diferenciaciones presentan características análogas.

**Obj. Ap. 6L. 45: 1. Ocu. 8/B: Leitz.**



**Fig. 11.** – La fijación con el líquido de Helly y coloración de Kull, ha sido realizada sobre raicilla de «Pisum Sativum». Puede apreciarse un rico aparato mitocondrial, representado por abundantes granulaciones y tortuosos bastoncitos.

**Obj. Ap. 6L. 45: 1. Ocu. 6/B: Leitz.**



nosotros habíamos seguido en material animal con éxito; pero que hemos suprimido en nuestras observaciones sobre vegetales, por haber obtenido siempre imágenes borrosas, las cuales tenían perfecta claridad sin alumbre.

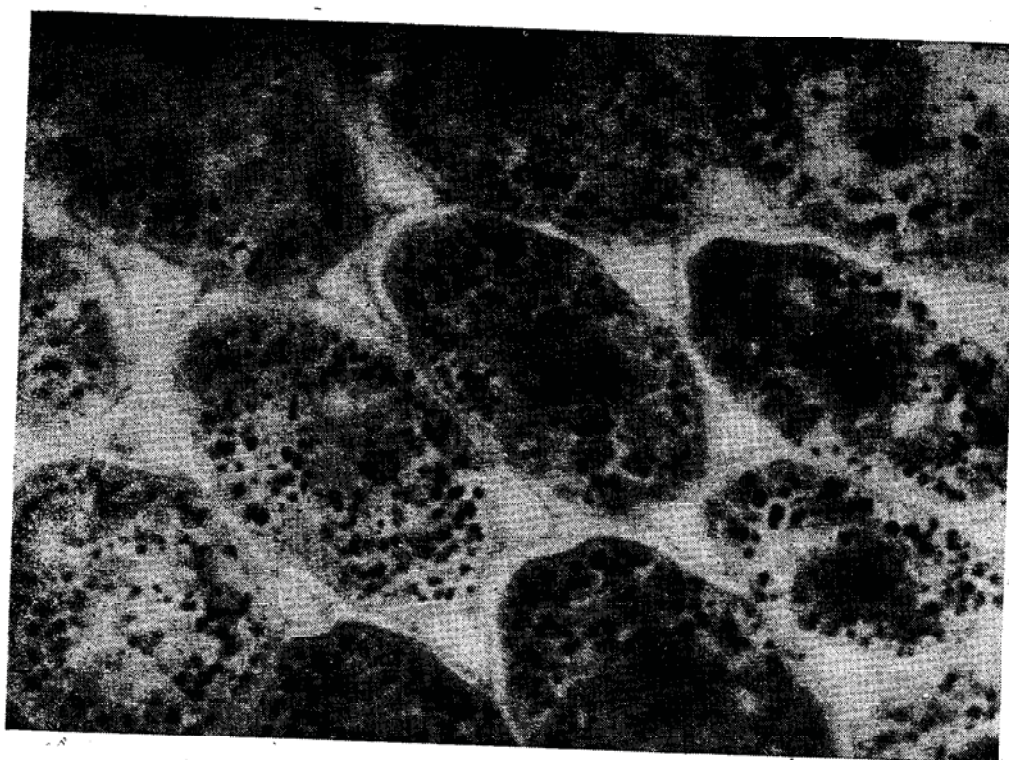


Fig. 12.—Imagen de características análogas a la figura 11, correspondiente a «Vicia», habiéndose realizado la coloración por la técnica de Kull y la fijación según Held.

Obj. 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 8/B. Leitz.

Debe observarse que, a pesar de la existencia del acético, en este fijador, se han logrado buenas preparaciones, lo cual atribuimos a la adición del formol que, de igual modo que en Helly, aconsejamos sea neutro con carbonato de magnesia, las diferencias en las imágenes han sido notables.

Las figs. 12, en Vicia, y 13, en garbanzo, ponen de manifiesto las características de las imágenes obtenidas, y para cuya descripción nos remitimos a lo dicho, respecto al fijador de Helly.

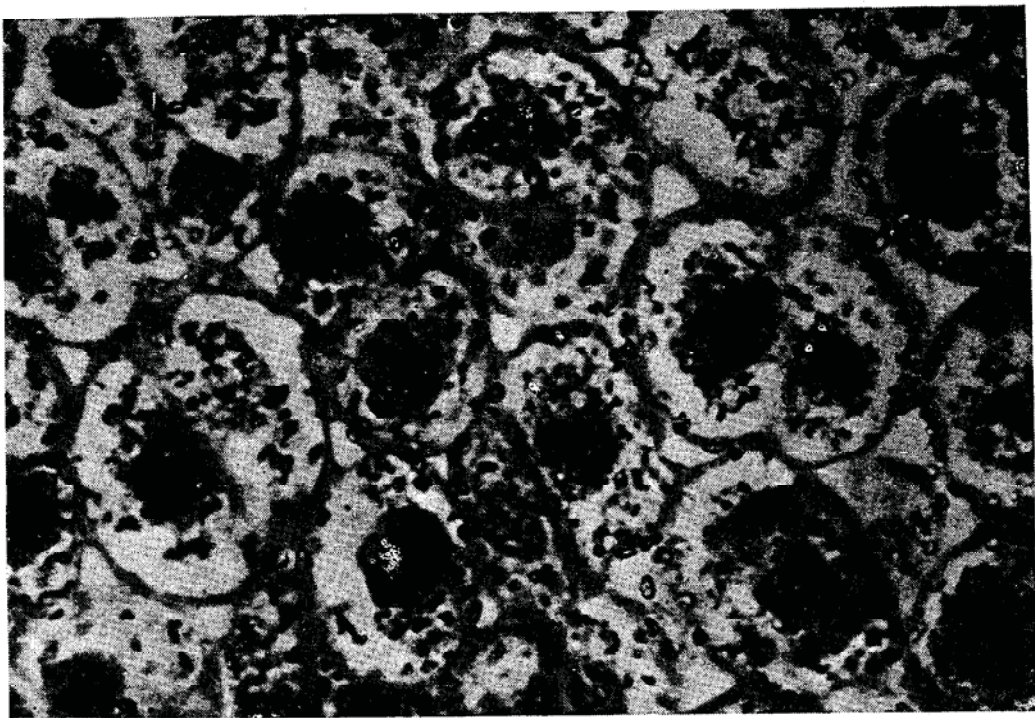
2.<sup>a</sup> *Coloraciones.*—Ensayada ya toda una serie de distintos fijadores, y conseguidos los mejores resultados con el líquido de Helly; para nuestros ensayos sobre técnicas de coloración, usamos como base los meristemos radicales de varias especies, tratados por el citado fijador.

En conjunto podemos decir, que, aunque hemos concedido nuestra preferencia a la coloración de Kull, élllo no ha sido obstáculo para que hayamos ensayado otras, a fin de que sea posible hacer una comparación.

a) Primeramente, y en honor a su clasicismo, hemos utilizado la técnica de Benda; verdadero descubridor del aparato mitocondrial. Es proceder que llega a dar bellas preparaciones, pero reúne algunos inconvenientes que pretendemos resumir de la forma siguiente: se trata de una técnica muy lenta; lo demuestra el hecho de que los cortes tengan que ser sometidos, durante un tiempo de cuarenta y ocho horas, a la acción de alumbre y sulfalizarinato,



antes de actuar el colorante de Benda. En nuestro modo de pensar, sostenemos que las preparaciones deben ser realizadas con la máxima rapidez posible, siempre, naturalmente, que esa velocidad no vaya en menoscabo del resul-



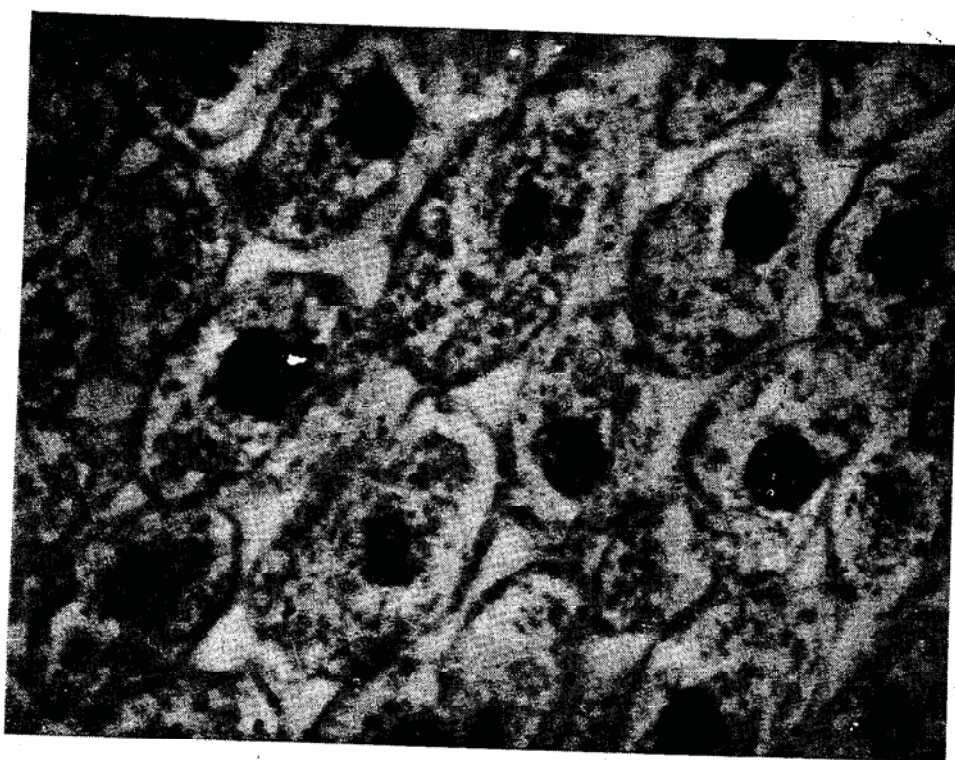
**Fig. 13.**—«Cicer Arietinum», habiendo seguido las técnicas de fijación y coloración que en la figura 12. Se pueden repetir las peculiaridades de la figura anterior, y destacan varias células en mitosis.  
Obj. 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 8/B: Leitz.

tado obtenido, puesto que los tratamientos prolongados por distintos reactivos, llevan siempre consigo alteraciones que se nos traducen en las distintas partes integrantes de la célula y, especialmente, en aquellas que presentan una mayor labilidad como el condrioma. Es, además, un proceder muy laborioso e inconstante en cuanto a su éxito, bien por la diferenciación en acético, que no siempre se consigue fácilmente, como por lo que se refiere a la deshidratación para el montaje, ya que la coloración violeta desaparece fácilmente al ser arrastrada por los alcoholes, siendo necesario actuar con gran rapidez y no siempre se consigue una buena coloración.

En la microfotografía de la fig. 14, reproducimos la imagen de una preparación fijada en Helly, y coloreada según Benda; destacan los núcleos y nucleolos y las diferenciaciones intraprotoplásmicas (condrioma) aparece dando al conjunto un aspecto turbio y granujiento, sin que se puedan discernir límites ni detalles de sus componentes. Algo análogo se puede observar en la fig. 15, correspondiente a guisante.

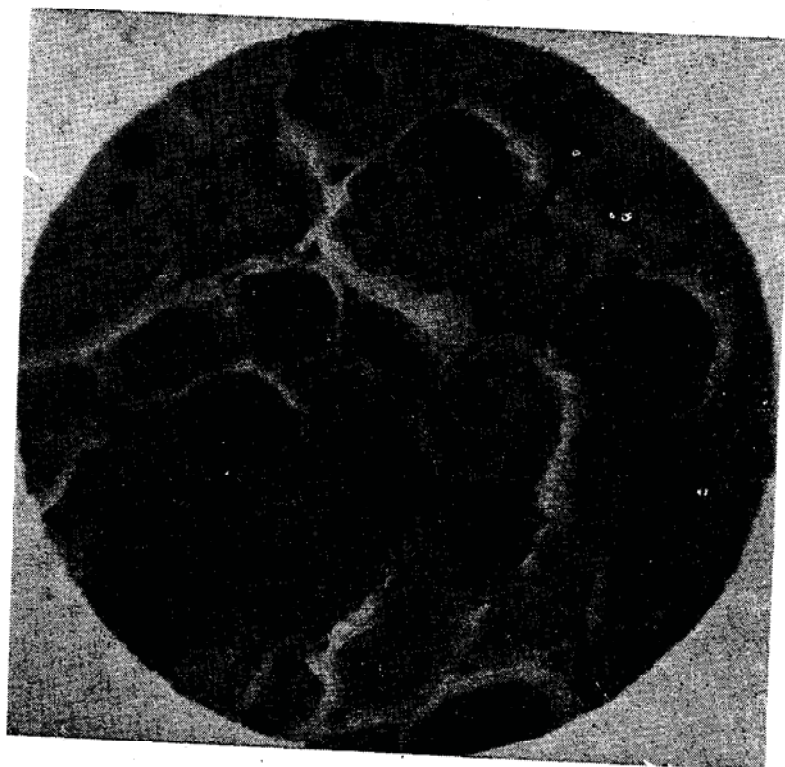
b) Otro de los procedimientos de coloración que hemos ensayado ha sido la hematoxilina férrica de Heidenhain. Esta técnica, recomendada por infinidad de autores y empleada desde los primeros tiempos de la historia del condrioma, reúne también algunos de los inconvenientes que hemos apuntado para el método de Benda, a pesar de dar en ocasiones buenas preparaciones.





**Fig. 14.** Imagen en meristemo terminal de «Vicia», fijado según Helly y coloreado según Benda. Las granulaciones mitocondriales, dispersas en el protoplasma, son numerosas y sus límites confusos, dando a la célula un aspecto grumoso.

Obj. Ap. 6L. 45: 1. Ocu. 8/B: Leitz.

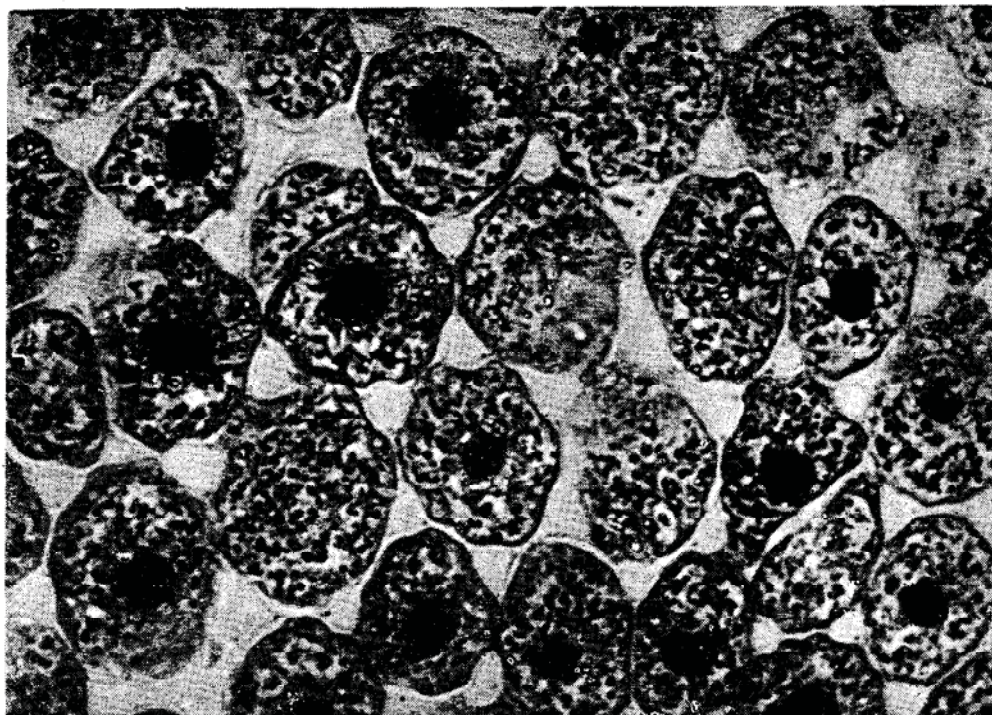


**Fig. 15.**—«Pisum Sativum». Fijación de Helly y coloración por Benda. Llama la atención la gran refrigerancia de los nucleolos, y sobre un protoplasma grisáceo, una granulación imprecisa que corresponde al condrioma.

Obj. Ap. 6L. 45: 1. Ocu. 6/B: Leitz.



Al igual que el Benda, se trata de una técnica muy lenta, veinticuatro horas en alumbre de hierro y de doce a veinticuatro en hematoxilina, son demasiadas horas de acción sobre las preparaciones, con los mismos riesgos que de-



**Fig. 16.**— «*Pisum Sativum*», fijado por Helly y coloreado por la hematoxilina férrica de Heidenhain. Falta de nitidez en los núcleos que aparecen como gruesas manchas oscuras, el condrioma se presenta con un aspecto de granos conglutinados extraordinariamente gruesos.

**Obj 2 mm. Ap. 1/32. Ocu. 8/B: Leitz.**

jamos apuntados ya. Requiere además tener de antemano preparada una solución bien madura de hematoxilina, lo cual necesita, por lo menos, un par de semanas; esto impide la realización de una preparación en un momento determinado. La diferenciación con alumbre, es más fácil que en el procedimiento de Benda, se consigue con más rapidez y seguridad y no hay riesgo ninguno de arrastrar la coloración en las maniobras de deshidratar, siendo necesario, únicamente, lavar abundantemente en agua muy frecuentemente renovada.

En la técnica de Heidenhain, el mayor defecto a nuestro juicio, es su inespecificidad, su falta de selectividad; efectivamente, tiñe con análogas características los núcleos, nucleolos y diferenciaciones protoplásmicas, e incluso las formaciones paraplásticas, muy abundantes en los elementos vegetales, siendo de esta forma muy difícil en ocasiones, la distinción del verdadero condrioma de otras formaciones. Hemos tenido ocasión de observar, además, figuras de conglutinación y apelotonamiento de los elementos mitocondriales, como se aprecia en la fig. 16, correspondiente a guisante.

c) En tercer lugar, y de ello ya hemos venido hablando a lo largo de nuestra exposición, hemos empleado con los mismos materiales y en igualdad de condiciones, la coloración con fuchina de Altmann, siguiendo a Kull, en su modificación a la técnica de aquél.

Las características de este método de coloración, descrito ya por el autor en 1913, son de todos perfectamente conocidas y su descripción se encuentra en cualquier libro de técnica; nosotros, nos proponemos exclusivamente insistir en algunos detalles que la experiencia con el mismo nos ha enseñado, llamar la atención sobre aquellos puntos que consideramos fundamentales; finalmente, expresar nuestra extrañeza ante el hecho de que su empleo en material vegetal no guarde relación con los resultados que proporciona, a pesar de ser varios los autores que lo citan (Cowdry, Milovidov, Guilliermond).

Nosotros ya teníamos alguna experiencia sobre material animal, donde hemos obtenido magníficas preparaciones, sin ninguna discusión, mucho más vistosas que las obtenidas por los demás procedimientos; estos mismos resultados satisfactorios, los hemos obtenido en meristemas radiculares de las especies con que hemos trabajado.

Las fases de la técnica a que concedemos mayor interés son las siguientes: opinamos que tiene una transcendental importancia el calentamiento durante el tiempo de acción de la fuchina. Este tiempo varía según el material empleado y el fijador; nosotros, en Vicia, nunca hemos pasado de los 30-40 segundos, mientras se ha prolongado a 2-3 minutos en los demás materiales ensayados (garbanzo, guisante, etc.).

La fuchina debe prepararse inmediatamente antes de su uso y aunque así no sea, jamás se dejará envejecer, pues de hacerlo y aunque se debe filtrar, cristaliza en agujas y prismas que hacen inservible la preparación.

Muy importante es el lavado que sigue a la coloración con fuchina: se debe hacer en abundante cantidad de agua destilada, la cual se renueva varias veces, en los 4-5 minutos que se prolonga el mismo. Nunca se empezará el lavado antes de que la preparación esté completamente fría; nosotros hemos tenido ocasión de observar una marcada diferencia en las preparaciones en que no se han observado estas precauciones.

La coloración nuclear la hemos realizado, indistintamente, con una solución de tionina al 0'5 ‰, o de azul de toluidina a igual título; pero los resultados no han sido los mismos en ambos casos. La tionina, necesita actuar más tiempo (1-3 minutos), se obtiene una bonita tonalidad violada y el color es difícilmente arrastrado por los alcoholes de deshidratación; pero da frecuentemente un sombreado al protoplasma que puede obstaculizar la observación y, además, si la solución no es reciente, suelen formarse precipitados. Habiendo en cuenta estos inconvenientes, hemos empleado con preferencia el azul de toluidina; la coloración se consigue más rápidamente (escasamente un minuto), los contrastes son magníficos y la única precaución es lavar cuidadosamente y proceder con rapidez en la deshidratación, para evitar decolorar.

La fase más meticulosa del método es la diferenciación en una solución de aurantia al 0'5 ‰ en alcohol de 70°; es necesario ejercer una constante vigilancia al microscopio, previo lavado en agua para evitar que la diferenciación continúe en la platina y la desecación de la preparación. El tiempo que ha de actuar la solución de aurantia es muy variable y guarda relación con los tiempos de fuchina y toluidina; suele oscilar entre los 30 segundos y 2 minutos, habiéndose conseguido cuando sobre un fondo ligeramente amarillento destaca el condrioma en rojo o rojo azulado; el núcleo se presenta en azul violeta y el nucleolo en rojo vivo. Cuando la diferenciación se ha pro-



longado demasiado tiempo, el protoplasma toma una intensa coloración amarilla y apenas destaca el condrioma en rosa. Las imágenes son clarísimas, como puede verse en las microfotografías de las figs. 9, 10, 11, 12, 13 y en el

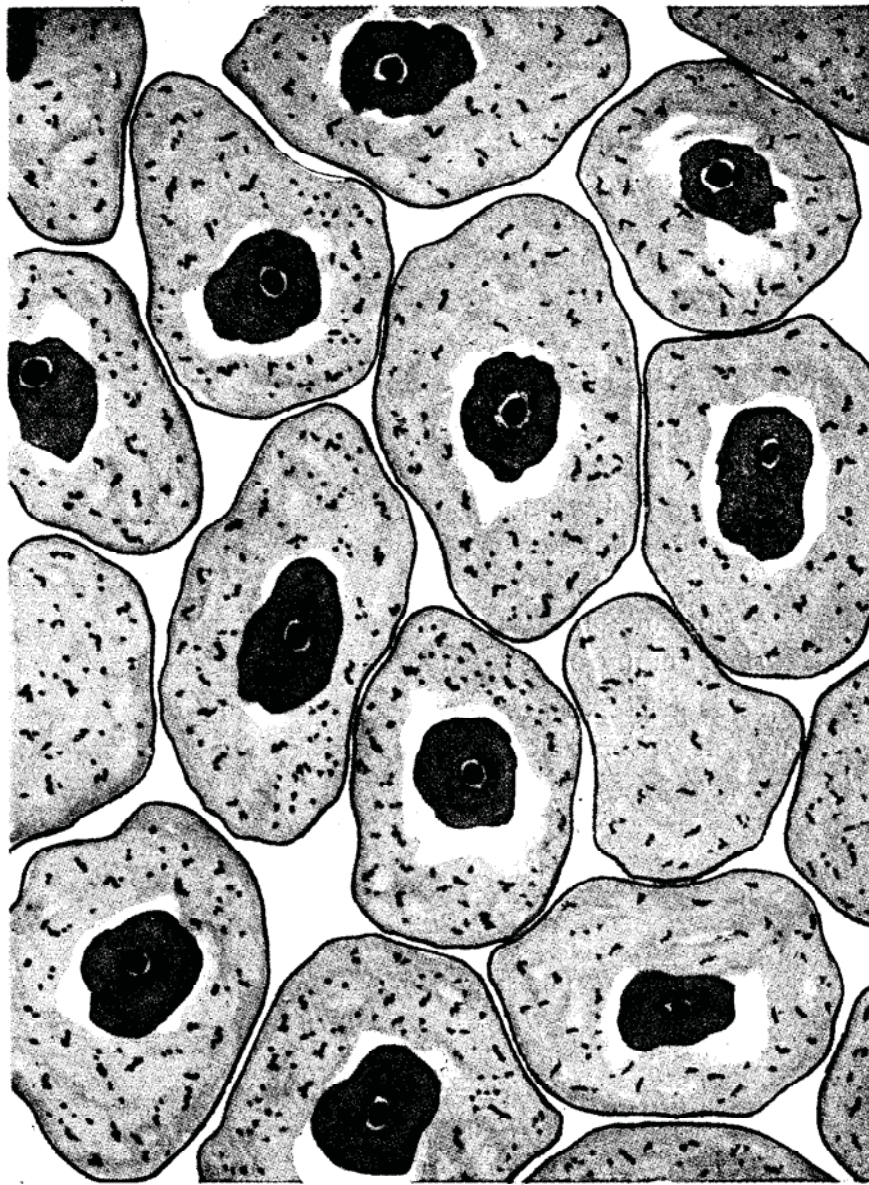


Fig. 17

dibujo donde se ha conseguido una nitidez y claridad de los elementos del condrioma, como no las hemos conseguido en ninguna otra técnica en contra de la afirmación de M. Mascré.

Las imágenes son igualmente claras en los demás fijadores, tenidas en cuenta las alteraciones que hemos señalado anteriormente.

**Conclusiones.** - Después de todo lo expuesto y a la vista de los resultados obtenidos, nos creemos en condiciones de sentar las siguientes conclusiones:

1.º A pesar de la semejanza que presenta el condrioma animal y vegetal, en cuanto se refiere a sus características morfológicas, es indudable la existencia de diferencias en su composición química, ya que fijadores ideales

para especies animales, con los cuales hemos logrado éxitos, tales como el Zenker y Campy, han dado resultados muy mediocres en nuestras experiencias con material vegetal.

2.º En cada especie vegetal es necesario hacer un tanteo en cuanto a tiempos de fijación y coloración, debido a la existencia de grandes diferencias de unas a otras; diferencias que, en general, no encontramos en las especies animales.

3.º De todos los fijadores empleados por nosotros, los resultados más satisfactorios los hemos logrado con el líquido de Helly, empleando formol neutro con carbonato de magnesia y preparando el fijador inmediatamente antes de su uso. Hemos hecho actuar el fijador un tiempo comprendido entre las seis y las doce horas y, especialmente, en estufa a 37º.

Igualmente nos ha dado excelentes preparaciones el líquido de Held, pero suprimiendo el tratamiento por alumbre de hierro y utilizando formol neutro.

4.º De las técnicas de coloración utilizadas con ninguna hemos conseguido resultados tan satisfactorios como con la de Kull, de la cual nos declaramos defensores por encontrarla una serie de ventajas sobre las demás: da una mayor vistosidad y belleza a las preparaciones; los contrastes son mucho más intensos; la selectividad es mayor y, finalmente, la rapidez, ya que permite, en quince o veinte minutos, obtener una preparación con una completa coloración y diferenciación de los elementos mitocondriales.

Estimamos que es la técnica de elección, habiendo visto coronadas con el éxito todas nuestras observaciones en las especies ensayadas.