

Modificaciones a la técnica microhistológica de Peña Neira para especies forrajeras del Chaco Semiárido Argentino

Modifications to the Peña Neira's microhistology technique for semiarid grazing species

A. Catán¹, C. A. M. Degano¹ y L. Larcher¹

Recibido en mayo de 2002, aceptado en julio de 2003.

RESUMEN

La microhistología es una forma de taxonomía basada en la identificación y cuantificación de tejidos epidérmicos vegetales. Se presenta una modificación a la técnica tradicional microhistológica de Peña Neira, con el propósito de simplificar y agilizar la tarea del laboratorio, permitiendo obtener preparados de calidad semejante a los obtenidos con la técnica tradicional. Se trabajó con hojas de especies propias del monte semiárido de la provincia de Santiago del Estero, que conforman la dieta de caprinos para elaborar la Colección de Referencia. La modificación propuesta, permitió la identificación de las especies.

Palabras Clave: dieta de herbívoros, caracteres epidérmicos

ABSTRACT

The microhistology is a kind of taxonomy based in the identification and quantification of vegetal epidermic tissues. A modification to the traditional microhistology technique by Peña Neira is presented here, with the purpose of simplify and to speed up the laboratory job letting to obtain microscopic slides of similar qualities to those obtained with the traditional technique. Leaves of native species, that conform the goats diet, from Santiago del Estero Monte were chosen to prepare the reference collection. The modification proposed, let the species identification.

Key words: herbivorous diet, epidermis characters

1. INTRODUCCIÓN

La microhistología o microtécnica es una forma de taxonomía basada en la identificación y cuantificación de los tejidos epidérmicos vegetales presentes en mezclas de plantas, heces, contenidos ruminales, estomacales o fistulares (Peña Neira, 1980). Para la aplicación de dicha metodología se requiere el conocimiento previo de las características epidérmicas de los tejidos vegetales al microscopio, tales como células epidérmicas, estomas, pelos y tricomas (Pelliza de Sbriller, 1993).

La microhistología fue diseñada para determinar la composición botánica de la dieta de herbívoros silvestres y domésticos. Esta información proporciona datos relevantes para el manejo de los sistemas ecológicos y de las relaciones entre sus componentes (Pelliza de Sbriller, 1993).

La preparación del material vegetal para la observación al microscopio varía considerablemente de acuerdo a los autores que trabajan con la técnica microhistológica, demandando en todos los

¹ Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (S) 1912, 4200, Santiago del Estero, Argentina

casos 5 días o más hasta poder realizar las observaciones microscópicas (Vavra y Holechek, 1980). La técnica microhistología propuesta por Peña Neira (1980) se basa en la colecta, secado, molido, digestión, clarificación, tamizado y montaje, con el correspondiente secado del material vegetal, para la observación al microscopio, en un proceso cuya duración varía entre 5 a 6 días hasta el último paso. Esta técnica, si bien logra su objetivo, tiene la desventaja de requerir un prolongado proceso de laboratorio, elevada manipulación del material y alto número de reactivos empleados. Ello motivó a que este laboratorio ensayara diversos métodos para realizar la técnica microhistológica de las especies propias de la región semiárida de Santiago del Estero (Argentina), buscando la manera más sencilla de realizar los preparados usando el menor tiempo.

El objetivo de este trabajo es presentar las modificaciones introducidas al procedimiento de preparación de la técnica microhistológica usado por Peña Neira (1980).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron especies vegetales del monte semiárido de Santiago del Estero, previa identificación y reconocimiento de las mismas para conformar la colección de referencia. Se seleccionaron especies propias de la zona de estudio que integran la dieta de caprinos (Miñon et al, 1991). La Colección de Referencia es el conjunto de los preparados de plantas, a la que hay que recurrir para comparar el material a identificar en cualquiera de las muestras problema (Pelliza de Sbriller, 1993). Por lo tanto es importante que el tratamiento realizado a la Colección de Referencia sea comparable con el de las muestras dietarias.

Las especies elegidas fueron: *Celtis tala* (arbórea), *Lippia turbinata* (arbustiva) y *Wissadula densiflora* (herbácea latifoliada). De cada planta se separaron dos ejemplares, uno para herborizar y el otro para la obtención de las hojas a estudiar. El material extraído fue procesado con las dos técnicas (Tabla 1).

Un volumen de del material molido se colocó en 15 ml de hipoclorito de sodio durante 2 horas. El material digerido se volcó en un tamiz de 150 µm de malla y se lavó con agua a presión eliminando así el hipoclorito y todo fragmento de material que por su tamaño no pudiera ser identificable.

El material lavado se colocó en 5 ml de solución de hidrato de cloral acuoso al 5% durante 5 minutos para clarificar los fragmentos y se realizó el último lavado con agua a presión. Para mantener constante el volumen del material molido se trabajó siempre sobre el mismo recipiente. Pelliza de Sbriller (1983) indica que el material molido se debe tomar en exceso porque en el proceso de lavado se pierden grandes cantidades de fragmentos pequeños.

A diferencia de la técnica original, no se utilizó la solución de Hoyer como medio de montaje, tal como fuera sugerido por Peña Neira (1980), y se reemplazó por el medio gelatina-glicerina, descrito por Johansen (1940); que permite la observación luego de 2hs. de frío.

En cada portaobjetos se colocó un volumen de 6 mm³ de preparado con 2 ml de medio de montaje. Para mantener fijo el volumen de muestra se trabajó sobre una plancha metálica previamente perforada que es la misma que se utilizó en todos los portaobjetos y para todas las especies. El cubreobjetos empleado fue de 20x20, se aseguró que la densidad de partículas fuera uniforme en toda la superficie, para garantizar el reconocimiento de al menos 2 ó 3 fragmentos por campo microscópico, tal como lo precisa la técnica microhistológica y se garantizó la ausencia de burbujas en todo el extendido.

Las observaciones de las características epidérmicas para cada especie se realizaron con 100 aumentos por campo, entendiéndose por campo al área fija comprendida en una observación (Spark y Malechek, 1968).

Para la confección de la colección de referencia de las plantas del área de monte semiárido en estudio se utilizó la nomenclatura de Metcalfe y Chalk (1979). De cada especie se realizaron descripciones, dibujos utilizando cámara clara y fotografías al microscopio.

Tabla 1. Comparación de las etapas de preparación del material vegetal aplicando la técnica de Peña Neira y la modificación propuesta.

Etapas \ Técnicas	Peña Neira	Modificación
Recolección e identificación del material vegetal y muestras dietarias	Técnica Peña Neira (1980)	Modificación Propuesta
Secado	En estufa	Ídem
Molido	Molino Wiley malla de 1 mm	Molino Wiley malla de 1 mm
Homogeneización	Mezcla perfecta. Se utilizan 2 cm ³ para cada portaobjeto	Mezcla perfecta. Se utilizan 2 cm ³ para cada portaobjeto
Depuración	Hidróxido de cloro durante 1 minuto. En ocasiones inmersión en hidróxido de sodio al 50% por 4 minutos.	Hipoclorito al 60%, en agua, durante 2 horas
Tamizado	Con tamiz de 100 micrones. Lavado con agua corriente a presión eliminando el agente de la digestión.	Ídem
Clarificación	Solución aclaradora de Hertwig luego del montaje de la muestra sobre el portaobjetos, llevando el mismo posteriormente a la acción de la llama, cuidando que no hierva el aclarador	Dos minutos en hidrato de cloral (Johansen 1940) y posterior lavado con agua a presión.
Montaje	Utilizando una plantilla metálica, de manera de colocar idénticas cantidades de muestra en cada portaobjeto. Se utiliza como medio de montaje la solución de Hoyer, para cubrir totalmente la muestra, en el área del cubreobjeto. Se coloca el mismo y se lleva a la llama de alcohol hasta que hierva aproximadamente 2 segundos, enfriando con agua inmediatamente.	Utilizando una plantilla metálica, de manera de colocar idénticas cantidades de muestra en cada portaobjeto. Se utiliza como medio de montaje la solución de gelatina glicerina (Johansen 1940), en cantidad de 2 mm sobre la muestra y abarcando el área del cubreobjeto.
Etiquetado	De manera correcta	De manera correcta
Secado	En estufa a 50°C durante 6 días	Dos horas de frío de 5 °C

3. RESULTADOS

Las modificaciones introducidas en la técnica microhistológica, permitieron preparar el material vegetal en 5 horas. Al digerir el material en hipoclorito de sodio durante 2 horas, a diferencia de los 10 minutos sugeridos Peña Neira (1980), se evitó el uso posterior de la solución de Hertwig, y se acortó el tiempo de montaje y secado al reemplazar la solución de Hoyer por la gelatina glicerina, logrando con el método modificado la misma calidad en las observaciones microscópicas que al emplear la técnica de Peña Neira.

Las descripciones de los caracteres epidérmicos de las especies *Celtis tala*, *Lippia turbinata* y *Wissadula densiflora*, que se presentan a modo de ejemplo, así como las fotografías originales

que acompañan a las mismas, se obtuvieron a partir de los portaobjetos preparados con la técnica modificada, las que no muestran diferencias de calidad cuando se prepararon según Peña Neira.

▪ ***Wissadula densiflora*** (Figura 1 y 2)

Células epidérmicas con paredes anticlinales sinuosas. Estomas anomocíticos presentes sólo en la epidermis inferior. Se observa la presencia de tres tipos de pelos en ambas epidermis, recubriendo completamente la superficie foliar. Pelos no glandulares estrellados, multicelulares, solitarios; cada pelo posee entre 8 y 10 brazos, son sésiles. Pelos no glandulares, multicelulares, uniseriados, de forma cónica, constituido por 4-8 células. Pelos glandulares, multicelulares, solitarios, pie formado por una hilera de 2-3 células, cabeza bicelular, reservorio del producto glandular.

▪ ***Lippia turbinata*** (Figura 3)

Células epidérmicas poligonales, paredes anticlinales rectas o levemente onduladas. Aparato estomático del tipo anomocítico. Presenta tres tipos de pelos bien diferenciados, abundantes en las regiones areolares. Pelos no glandulares, unicelulares, conspicuos, solitarios, con cutícula con ornamentaciones papilosas, las células de la base de los pelos presentan cutícula estriada. Otros pelos no glandulares, unicelulares cónicos, cortísimos, solitarios con cutícula conspicua. Y pelos glandulares bicelulares.

▪ ***Celtis tala*** (Figura 4)

Células epidérmicas poligonales con cutícula estriada. Aparato estomático tipos anomocítico y anisocítico. Presenta dos tipos de pelos. Pelos de base estrellada, largos, con gruesas paredes cuticulares. Pelos glandulares, de pie corto formado por dos a tres células, cuerpo cónico. Drusas en toda la epidermis, pero más abundantes en las nervaduras.

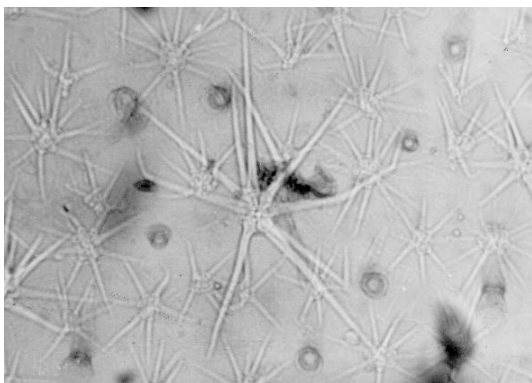


Figura 1. Epidermis de *Wissadula densiflora*

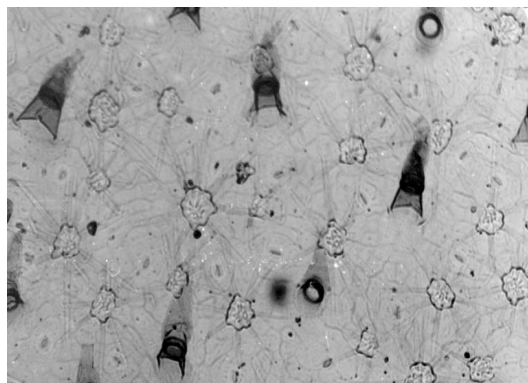


Figura 2. Epidermis de *Wissadula densiflora*

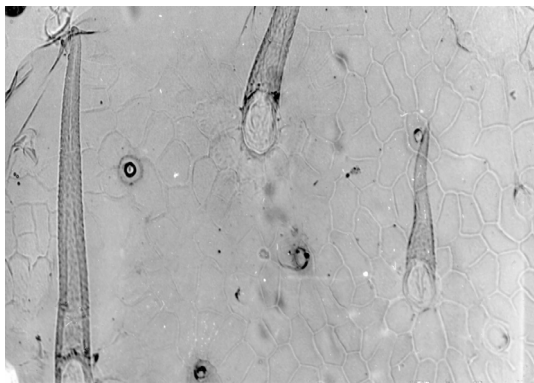


Figura 3. Epidermis de *Lippia turbinata*

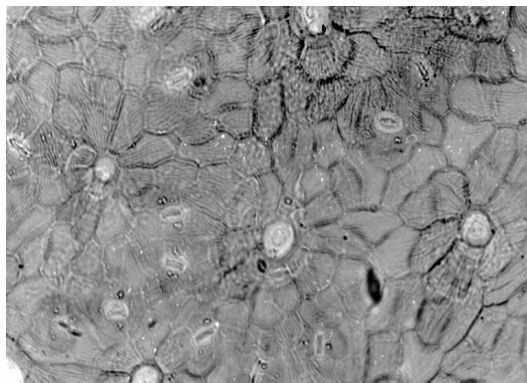


Figura 4. Epidermis de *Celtis tala*

4. CONCLUSIONES

La modificación propuesta en este artículo, a la técnica microhistológica de Peña Neira (1980) permite describir en detalle las características de las epidermis de las especies forrajeras elegidas para este trabajo. El método modificado resulta simple, debido al menor manipuleo y a la marcada reducción del tiempo empleado en la preparación del material vegetal, de 6 días a 5 horas, así como más económico por la menor cantidad de reactivos empleada.

REFERENCIAS

- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw- Hill Book Company. London
- Metcalfé, C. F. y L. Chalk. 1979. Anatomy of the Dicotyledons. Second Edition. Volume I. Clarendon Press. Oxford. 276 p.
- Miñon D. P: A. Fumagalli y A. Auslender. 1991. Hábitos alimentarios de vacunos y caprinos en un bosque de la región chaqueña semiárida. Revista Argentina de Producción Animal 11(3): 275-283.
- Pelliza de Sbriller, A. 1993. Acerca de la microhistología. Comunicación técnica N°32. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. S.C. de Bariloche. Río Negro. Argentina. 75 p.
- Peña Neira J. M. 1980. Serie técnico científica. Vol 1. N°6. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México. 82 p.
- Sparks, D. R. and Malechek, J. C. 1968. Estimating percentage dry weight in diets using a microscope technique. Journal of Range Management 21(4): 264-265.
- Vavra, M. y J. L. Holechek. 1980. Factors influencing microhistological analysis of herbivore diets. Journal of Range Management 33 (5): 371-374

