REVISION DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA EL ESTUDIO
DE LAS ALGAS MARINAS MACROSCOPICAS *

Por M^{te} Elena Sánchez Rodríguez.**

INTRODUCCION

El estudio de las algas marinas presenta en la actualidad un gran desarrollo en diversos países del mundo, en donde numerosos investigadores se dedican al conocimiento de la ficología.

Lineo, en su obra "Species Plantarum" (1753), da a conocer las primeras especies de algas (14). Es, sin embargo, en los comienzos del Siglo XIX, cuando el francés Lamouroux (19) describe, en sus publicaciones (1809-1813), numerosos ejemplares de algas. Años más tarde, los suecos C. A. Agardh y su hijo J. G. Agardh (10) continúan estos estudios, considerándose al primero como uno de los fundadores de la clasificación de algas; el segundo, por su parte, se dedicó al estudio profundo de la ficología, publicando un gran número de obras (1848-1898). Casi en forma simultánea otros dos suecos, Kützing (1848) y Kjellman (1872), describen y aportan datos a estos estudios (19). En Inglaterra, W. H. Harvey hace una amplia descripción de las especies americanas en su libro "Phycología Boreale Americana" (1858), habiendo descrito con anterioridad especies de Inglaterra (19). En los Estados Unidos de América W. G. Farlow estudia intensamente las algas de América (1879-1881). Estos conocimientos se continúan hasta la actualidad, época en que se siguen desarrollando, aplicándose no solamente a la investigación, sino también a la economía (1, 13).

El estudio de las algas, como el de los vegetales en general, requiere un conocimiento estructural externo e interno. El primero puede efectuarse a simple vista, mientras que para el segundo es necesario un estudio microscópico observando cortes o preparaciones adecuadas preparadas por técnicas histológicas.

La microtécnica histológica puede considerarse que nació con la introducción de los fijadores aproximadamente en el año de 1830 cuando Jacobson (10) usó el ácido crómico para este fin. En 1849, Harting introduce la coloración por el carmín y Waldeyer obtiene, en 1863, la hematoxilina del palo de campeche (*Haematoxylon campechianum*). En este mismo año Benecke usa las anilinas para colorear. Estas técnicas quedan completas en 1870, cuando His introduce el microtomo (10). Las modificaciones que han sufrido estos métodos han sido notables y actualmente se usan distintos

* Compendio de la Tesis que para optar al título de Biólogo presentó la autora, en noviembre de 1959, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

** Laboratorio de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.

tipos de fijadores y colorantes. Por su parte, el microtomo ha tenido varios cambios durante su perfeccionamiento. Sin embargo, es hasta 1940, cuando D. A. Johansen dedica un amplio capítulo al estudio microtécnico de las algas en general, en su publicación "Plant Microtechnique" (8).

Tomando en cuenta la importancia que el autor antes mencionado concede al estudio microtécnico de las algas así como las investigaciones que actualmente se vienen desarrollando en el Laboratorio de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del I. P. N., sobre el estudio de las algas marinas, bajo la dirección de la Profa. Laura Huerta M. (7), se ha considerado necesario la revisión de las técnicas histológicas aplicadas a las algas marinas macroscópicas, en particular, así como la aplicación de nuevas hematoxilinas que faciliten el trabajo práctico de laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

El material biológico usado en este trabajo fué colectado en las playas de la Isla de Enmedio, Hotel Pensiones y Mocambo, Ver.; en Cozumel, Q. R.; Cuauhtemocztín, Tab.; Coatzacoalcos, Ver. y del litoral del norte del Pacífico Mexicano. Se estudiaron algas de las divisiones: CHLOROPHYTA, PHAEOPHYTA, CYANOPHYTA y RHODOPHYTA de acuerdo con la siguiente clasificación. (Ver Pagina 24 A y 25)

CUADRO DE CLASIFICACION

Div.	Orden	Fam.	Género	Especie
CHLOROPHYTA	<u>ULVALES</u>	{ <u>ULVACEAE</u>	{	<u>Enteromorpha intestinalis</u> (Linnaeus) Link.
				<u>Ulva fasciata</u> Delile
	<u>CLADOPHORALES</u>	{ <u>CLADOPHORACEAE</u>	{	<u>Cladophora prolifera</u> (Roth) Kützling.
				<u>Caulerpa racemosa</u> (Forsk) Weber-van Bosse, var. - <u>uvifera</u> (Turner) Weber-van Bosse.
		{ <u>CAULERPACEAE</u>	{	<u>Codium dichotomum</u> (Hudson) Setchell.
	<u>SIPHONALES</u>	{ <u>CODIACEAE</u>	{	<u>Ripocephalus Phoenix</u> (Ellis y Solander) Kützling.
				<u>Udotea flabellum</u> (Ellis y Solander) Howe
				<u>Halimeda tuna</u> (Ellis y Solander) Lamouroux.
		{ <u>VALONIACEAE</u>	{	<u>Dictyosphaeria cavernosa</u> (Forsskal) Børgesen.
		{ <u>DASYCLADACEAE</u>	{	<u>Cymopolia barbata</u> (Linnaeus) Lamouroux.

Div.	Orden	Familia	Género	Especie
PHAEOPHYTA	<u>ECTOCARPALES</u>	<u>ECTOCARPACEAE</u>	<u>Pyraliella littoralis</u> + (Linnaeus) Lamouroux	
			<u>Ectocarpus tomentosoides</u> Farlow.	
	<u>CHORDARIALES</u>	<u>SWOELIACEAE</u>	<u>Hydroclathrus clathratus</u> (Bory) Howe.	
		<u>ELACHISTACEAE</u>	<u>Elachistea fuscolola</u> + (Vellay) Areschoug.	
	<u>DICTYOTALES</u>	<u>DICTYOTACEAE</u>	<u>Zonaria variegata</u> (Lamouroux) C. Agardh.	
			<u>Padina gymnospora</u> (Kützling) Vickers.	
			<u>Dictyota dichotoma</u> (Hudson) Lamouroux.	
			<u>Dictyopteris delicatula</u> Lamouroux.	
	<u>FUCALES</u>	<u>SARGASSACEAE</u>	<u>Turbinaria tricolorata</u> Barton.	
			<u>Sargassum</u> sp.	
CYANOPHYTA	<u>NOSTOCOCALES</u>	<u>OSCILLATORIAEAE</u>	<u>Phormidium</u> sp.	
	<u>NEMALIONALES</u>	<u>HELMINTHOCOCIACEAE</u>	<u>Liagora</u> sp.	
		<u>CHAETANGIACEAE</u>	<u>Galaxaura</u> sp.	
	<u>CRYPTOMENIALES</u>	<u>CORALLINACEAE</u>	<u>Melobesia</u> sp.	
			<u>Lithophyllum</u> sp.	
			<u>Ampyrea fragilissima</u> Lamouroux.	
			<u>Corallina cubensis</u> (Mont) Kützling.	
	<u>CERAMIALES</u>	<u>CERAMIAEAE</u>	<u>Spyridia aculeata</u> (Schimp) Kützling.	
			<u>Ceranium rubrum</u> + (Hudson) C. Agardh.	
			<u>Acanthophora spicifera</u> (Vahl) Børgesen.	
<u>Bryothamnion triquetrum</u> (Gmel) Howe.				
<u>RHODOMELALES</u>	<u>RHODOMELACEAE</u>	<u>Laurencia</u> sp.		
		<u>Chondria dasyphylla</u> (Woodw) C. Agardh.		
		<u>Polysiphonia acuminata</u> Garner.		
		<u>Dyggia simplex</u> (Wulfen) C. Agardh.		
		<u>Amansia multifida</u> Lamouroux.		
		<u>Gracilaria foliifera</u> (Forsskal) Børgesen.		
<u>RHODYMENIALES</u>	<u>SPHAEROCOCACEAE</u>	<u>Hypnea musciformis</u> (Wulfen) Lamouroux		
		<u>Champia parvula</u>		
		<u>CHAMPIACEAE</u>		

Referencias bibliográficas para la clasificación (2,5,6,15,16,17,18).

+ Material colectado en la Bahía de Fundy, Canadá.

Todas las colectas obtenidas para el desarrollo de este trabajo fueron tratadas por: 1º—Fijación, 2º—Inclusión y 3º—Tinción.

1º—*Fijación*. Este primer paso fué necesario en todos los casos. Las fijaciones fueron hechas algunas veces en formol al 6%, que es el método más simple; pero en este trabajo fué más empleada la fijación en una solución de ácido acético-ácido crómico al 1%, recomendada por Johansen (8). Esta fijación se llevó a cabo en agua de mar, siendo suficiente diez minutos, ya que en un tiempo mayor se puede destruir el material. Luego se lava el material con agua de mar hasta la eliminación total del fijador. Después se va sustituyendo el agua de mar por agua destilada y alcohol en forma gradual. Se deja que el material permanezca una hora como mínimo en cada solución. Y una vez que se llega a alcohol etílico al 50% puede guardarse el material en esa solución.

Se emplearon además, métodos de fijación especiales, como el de coralíneas, que además de fijar el contenido celular, las descalcifica, permitiendo con ello una inclusión satisfactoria. Posteriormente se lavó el material con agua corriente para eliminar el fijador y se llevó de una manera gradual hasta alcohol etílico de 50%.

2º—*Inclusión*. Para algunos ejemplares bastó con hacer cortes por congelación o preparaciones "in toto", sin que fuera indispensable la inclusión. Las preparaciones "in toto" se pueden hacer en casos en que el material es pequeño y además sensible a la hidratación y deshidratación. Este fenómeno es debido a que, los carbohidratos componentes de las cápsulas de secreción forman coloides hidrófilos que se hinchan con el exceso de agua y se contraen cuando la pierden, deformándose el material con estos cambios. Se tomaron porciones pequeñas pero completas del alga las cuales después de fijarse y lavarse en agua corriente se tiñeron.

Para incluir, el método fué el siguiente: se deshidrató el material empleándose alcohol etílico de 5, 10, 20, 30, 40 y 50%, procediéndose a la siguiente deshidratación con alcohol butílico terciario, de 50, 70, 85, 95 y 100.

El material se mantuvo en cada solución un tiempo de dos horas como mínimo. Se hicieron tres cambios de alcohol butílico terciario absoluto con dos horas cada uno. Al último alcohol butílico se le agrega, posteriormente, una cantidad igual de vaselina Q. P., lográndose la transparentación del material. La primera inclusión, se hizo de la siguiente manera: se llevó la parafina hasta su punto de fusión; una vez fundida, se enfría hasta el punto de solidificación y sobre ella se coloca el material listo para la inclusión y junto con unas gotas de la solución alcohol butílico-vaselina. Se deja en la estufa para que se funda lentamente y en ese estado el material se impregna poco a poco de parafina..

Los tiempos aproximados que permanecieron los trozos en cada parafina fueron los siguientes:

Parafina No. 1, con P.F. 53-55° C., dos horas.

Parafina No. 2, con P.F. 53-55° C., doce horas.

Parafina No. 3, con P.F. 56-58° C., dos horas.

La inclusión definitiva se hace en parafina con P.F. 56-58° C. Se hicieron bloquitos de 1.5 cm. por lado.

3º—*Tinción*. Fué la más variada, usándose diversos colorantes. Se hicieron cortes de diez hasta cien micras, los cuales se montaron en porta-objetos con albúmina de Mayer y se desparafinaron con xilol y se hidrataron con alcohol etílico de 100, 96, 85, 75, 50 y 30%, de 5 a 10 minutos en cada uno, en seguida se pasó a agua destilada.

Una vez obtenida la hidratación adecuada se hizo la tinción con alguno de los siguientes colorantes:

Azul de algodón (al 1% en lactofenol).

Safranina (solución acuosa al 1%).

Café de Bismarck (al 1% en solución alcohólica al 70%).

Carmín acético (solución saturada de carmín en acético al 40%).

Hematoxilina de Mayer.

Hematoxilina de Delafield.

Hematoxilina de Heidenhain.

Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina de Ehrlich.

Hematoxilina-lugol de Papamiltiades.

Hematoxilina sulfato de zinc de Papamiltiades.

Se usaron también colorantes de contraste en diferentes soluciones, tales como:

Azul de anilina (al 1% en solución acuosa o al 1% en alcohol etílico de 96%).

Eosina (al 1% en alcohol etílico de 96%).

Eritrosina (al 1% en alcohol etílico de 96% o al 1% en celosolve metílico-aceite de clavo).

Verde ácido (al 1% en alcohol etílico de 96% o al 0.5% en solución acuosa, o al 1% en celosolve metílico-aceite de clavo).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Un colorante con el que se obtienen buenos resultados es el azul de algodón, las estructuras pueden observarse perfectamente, además presenta la ventaja de ser una tinción rápida que no requiere el uso de cortes especiales, basta con hacerlos a mano con una navaja de rasurar o bien coger un fragmento "in toto" a los cuales se les pone unas gotas de azul, se montan con lactofenol y se observan en seguida. Esta técnica presenta el inconveniente de no servir para hacer preparaciones fijas, pues este tipo de colorante no seca y las preparaciones sólo pueden conservarse poco tiempo poniendo cemento Kronin alrededor. Hay que hacer notar que es una técnica recomendada para la observación rápida de las algas marinas cuando se puede evitar la manufactura de las preparaciones fijas, las cuales requieren un tiempo mayor para su elaboración.

La coloración por la safranina no es recomendable para las algas, el material se tiñe totalmente de rojo, no pudiéndose observar las estructuras de una manera precisa, y la aplicación de los colorantes de contraste no da buenos resultados. Una excepción es la preparación de los tricoginos, pero la observación de esta estructura con otras técnicas de tinción es mejor.

En cambio con el café de Bismarck los resultados son más satisfactorios. Esta técnica es recomendada por Johansen (8), en especial para las Feofíceas, pero en este trabajo se usó en Rodofíceas, tales como *Acanthophora* y *Bryothamnium* en donde las estructuras se determinan bastante bien, pero una tinción mejor por medio de este colorante se obtiene en *Amansia*, donde la coloración estructural es aún mejor que en los 2 casos anteriores. Se usó también en *Codium*, pero en este caso el resultado no es del todo satisfactorio. En las Feofíceas teñidas por este método, tales como *Padina*, *Dictyota* y *Dictyopteris*, además de observarse perfectamente las estructuras da una coloración semejante a la de su pigmentación original, sobre todo cuando hay contraste con verde ácido.

Los núcleos quedan bien teñidos con carmín acético; en el caso de *Ectocarpus* la constitución de los gamentagios se observa detalladamente. En *Chondria* la estructura central del talo puede apreciarse bien. En *Cladophora* se puede observar la estructura en general. Sin embargo, esta técnica de coloración tiene el inconveniente de que el material necesita hervirse primeramente en agua durante 3 minutos y después 1 ó 2 minutos en el colorante, destruyéndose con ello gran parte del material, sobre todo en las Rodofitas. Cuando el material se tiñe sin hervir se colorea tenuemente dificultándose la observación. Al montar este tipo de preparaciones con miel Karo hay contracción de las células del talo.

El colorante más indicado para la obtención de preparaciones fijas de algas marinas es la hematoxilina, la cual, puede prepararse por varias fórmulas, que varían en cuanto al tiempo requerido para la preparación del colorante, y el tiempo necesario para lograr la tinción.

Para ver las estructuras generales los resultados obtenidos con las diferentes hemaxotilinas, son los mismos para cualquiera de ellas. Pero esto no puede decirse de la coloración para determinar detalles intranucleares o intracelulares, para los cuales es preferible el uso de las hematoxilinas de Heidenhain, Harris o hematoxilina lugol de Papamiltiades.

Fig. 1.- Corte transversal de un cistocarpo de *Gracilaria folifera*. Hematoxilina Lugol verde-ácido montado en miel caro

Las hematoxilinas de Mayer, Delafield y Heidenhain, usadas también en la técnica histológica animal, pueden considerarse como las clásicas

dentro de la histología vegetal. La tinción lograda con ellas es muy buena en particular con la de Heidenhain pero, en cualquiera de los tres casos se requiere un tiempo considerable ya sea para su preparación o bien para la coloración. La de Mayer es un tipo de hematoxilina que tiñe las estructuras de las algas entre 5 y 20 minutos como máximo, sin embargo aunque su preparación no requiere mucho tiempo, si presenta el inconveniente de que puede descomponerse fácilmente precipitándose, para evitar esto es necesario guardarla en un refrigerador, o bien agregarle unos cristales de timol. Con la hematoxilina de Delafield el mismo material se tiñe en

Fig. 2.- Preparación "in toto" de *Spyridia aculeata*, teñida con hematoxilina lugol, eosina, montada en miel Karo.

un tiempo aproximado de 3 a 15 minutos, pero para poder usarla es necesario haberla preparado 2 meses antes por lo menos. Por lo que se refiere a la hematoxilina de Heidenhain, aparte de necesitar un tiempo largo para la oxidación después de preparada la solución, es necesario el uso de un mordiente antes de la coloración así como el uso de un diferenciador. Las dos primeras han sido recomendadas para la observación de filamentos de algas y hongos y la segunda es excelente para teñir núcleos y estructuras cromáticas; sin embargo, estos mismos resultados pueden obtenerse con la hematoxilina de Harris, que actualmente se usa con gran aceptación en la técnica botánica; asimismo estos resultados se obtienen con la hematoxilina-lugol y hematoxilina sulfato de zinc, experimentados por Papaniatiades en la técnica histológica humana, los cuales son posiblemente usados por primera vez en el estudio de las algas marinas.

Fig. 3.- Corte longitudinal de *Cymopolia barbata* teñida con hematoxilina de Ehrlich naranjado G., montado en bálsamo de Canadá.

La hematoxilina de Ehrlich, es fácil de preparar y la coloración en el caso de las algas marinas se lleva a cabo en un tiempo de 5 a 10 minutos; Johansen la recomienda en especial para teñir material "in toto" sin embargo las regiones terminales lo hacen poco; al dejar el material un tiempo mayor hay sobre coloración general y la diferenciación es lenta (10 minutos como mínimo), decolorándose el material de una manera dispareja, semejante a la anterior pero en sentido inverso a ésta. Por lo que se refiere a las preparaciones fijas los resultados obtenidos son semejantes a los anteriores.

La hematoxilina de Harris; presenta la ventaja de que al prepararla se oxida y madura, pudiéndose aplicar inmediatamente. Para colorear se requiere un tiempo de 20 minutos o menos; en el caso de las preparaciones "in toto" este tiempo varía entre 10 y 15 minutos; en el caso de *Ulva* y *Enteromorpha* se requieren los 15 minutos; pero para *Spyridia*, *Ceramium* y *Polysiphonia* el tiempo es menor, esto indica que en las Rodofíceas la tinción del material "in toto" es más rápida que en las Clorofíceas. En las Feofíceas como en *Ectocarpus*, la coloración se logra en un tiempo menor de 10 minutos. Se puede indicar este tipo de hematoxilina como la adecuada para la tinción de las Clorofíceas, Feofíceas, Cianofíceas y Rodofíceas.

Fig. 4 Corte transversal de *Padina gymnospora* teñido con hematoxilina de Harris, eritrosina, montado en bálsamo de Canadá.

Las hematoxilinas con lugol o con sulfato de zinc son colorantes de técnica rápida; la preparación de ellas no requiere un tiempo mayor de 30 minutos y pueden usarse inmediatamente después de hechas, es decir, no necesitan madurarse, la coloración es rápida, aproximadamente de 3 minutos y el viraje de rojo a azul en agua de la llave es de 1 a 2 minutos, o sea, que se necesita un tiempo aproximado de 5 minutos para teñir las estructuras, sobre todo con la hematoxilina lugol, con la que se pueden apreciar detalles nucleares y citoplasmáticos. En las preparaciones "in toto" los cistocarpos se tiñen con bastante detalle como en el caso de *Poly-siphonia* y *Ectocarpus*; las tetraesporas también se observan claramente en el género *Spyridia*. La hematoxilina sulfato de zinc, cuando se usa en cortes por congelación que no han sido descalcificados, como en *Udotea*, reacciona, posiblemente por las sales de calcio, obteniéndose entonces una sobretinción que es difícil de eliminar, para estos casos debe tenerse siempre la precaución de decalcificar bien el material.

Fig. 5.- Corte transversal de *Lithophyllum* sp.
teñido con hematoxilina de Harris,
verde-ácido montado en bálsamo de Canadá

Fig. 6.- Corte longitudinal de *Laurencia* sp.
teñido con hematoxilina de Harris,
eritrosina, montado en bálsamo de Canadá.

Para los 3 tipos de hematoxilina antes mencionadas se usaron contrastes a base de naranjado G, azul de anilina, eosina, eritrosina o verde ácido, obteniéndose mejores resultados con la eritrosina y el verde ácido. Se pueden montar las preparaciones sin colorante de contraste y quedan perfectamente demostrativas, el uso de él es optativo para el técnico, pero no indispensable.

Antes de indicar los resultados de montaje, es necesario mencionar el problema que presenta la mayor parte de las algas marinas, por su poder higroscópico. Anteriormente se explicó la deshidratación previa a la inclusión, ahora se hablará de la hidratación y deshidratación posteriores a ella. El material, una vez desparafinado por medio del xilol, es fácil de hidratar a través de los alcoholes de diferente concentración; una vez teñidos es necesario volver a deshidratar para montar en bálsamo. El material no sufre modificaciones aparentes durante algunos de estos pasos, pero al llevarse a los alcoholes de alta concentración, tal como el de 96% y absoluto, comienza a contraerse aumentando más esta contracción al poner el xilol. Este fenómeno se hace más notable en las Ceramiales y Rodimoniales, y para disminuirla un poco es necesario evitar llevar el material hasta agua durante la hidratación, de tal modo que la coloración se efectúe después del alcohol de 50%; el exceso de colorante se quita con alcohol de 60% hecho con agua de carbonato de litio para obtener el vire y continuar deshidratando hasta llegar al bálsamo, este paso, si bien no evita la contracción del material si la disminuye. En este tipo de material es preferible desechar la deshidratación posterior a la tinción y montar en miel Karo.

Fig. 7.- Preparación "in toto" de *Ceramium rubrum* teñida con hematoxilina sulfato de zinc, eritrosina, montada en bálsamo de Canadá.

El montaje con bálsamo de Canadá es y ha sido el más usado. Un material montado en esta resina dura mucho tiempo, pero para este caso es necesaria la deshidratación total del material y con ello el uso de aclarantes como xilol, toluol o creosota e incluso aceite de clavo; dichos aclarantes contraen en gran parte las algas marinas; en las Sifonales esta acción es muy marcada, y también es muy aparente en las Ulvales y Cladoforales, dentro de las Clorofíceas. En las Feofíceas esta acción se observa en las Ectocarpales aunque en forma menor que en las anteriores; pero en el caso de las Rodofíceas, esta acción es muy clara en la mayoría de las especies representantes del grupo. Debido a esta razón el material de este tipo se montó en miel Karo, pues con este paso se evita la deshidratación y con ello la contracción (esta miel es una mezcla de dextrinas, maltosa y dextrosa, presentando la particularidad de secar sin cristalizarse por lo cual puede usarse perfectamente en el montaje de preparaciones fijas). En este caso el material una vez teñido se lava perfectamente y se monta. Hay que hacer notar que la miel debe ser fresca, pues cuando está muy concentrada el material se contrae. El aceite de clavo tiene una acción constrictora menor que el xilol o el toluol, se usa cuando el material está contrastado con colorantes disueltos en celosove metílico. Es recomendable usar la creosota en los cortes por congelación que se montan en bálsamo; para esto el material una vez teñido y deshidratado se pasa a la creosota, montándose directamente evitando así el uso del xilol; el material que se va a montar por este medio, cuando se pone en xilol, se enrolla dificultándose el ponerlo en el portaobjetos. Tales son los casos de *Udotea*, *Zonaria*, *Pardina*, *Turbinaria* e *Hypnea*; en cambio, cuando se usa la creosota el material queda extendido y con ello el montaje se facilita.

Fig. 8.- Preparación "in toto" de *Polysiphonia acuminata*, teñida con hematoxilina lugol, eosina, montada en miel Karo

Por último se harán algunas indicaciones referentes al material montado "in toto". Al hablar sobre este tipo de preparaciones se da a entender que se trata de una pequeña parte del material, es decir no es toda la planta en sí, aquí nos referimos exclusivamente a una porción pequeña de ella o a una rama que nos indicará la constitución general de toda la planta, que aunque grande en aspecto, está formada de pequeñas células o bien de formas difíciles de cortar, tal es el caso de *Cladophora*, *Ectocarpus*, *Elachistea*, *Pilayella*, *Spyridia*, *Ceramium* y *Polysiphonia*.

Fig. 9.- Preparación "in toto" de *Condria dasyphylla*, teñida con hematoxilina lugol, eosina, montada en miel Karo.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a través de las diversas técnicas empleadas para el estudio de los cuatro grupos de algas marinas macroscópicas usadas, se puede resumir y concluir lo siguiente:

1.—En las Cloroficeas la fijación con formol o ácido acético-ácido crómico da buenos resultados. La deshidratación previa a la inclusión es preferible en alcohol butílico terciario. Los cortes, tanto por inclusión como por congelación, deben ser gruesos y cuando el material es difícil de cortar por su tamaño, se recomiendan las preparaciones "in toto". Las estructuras se observan detalladamente con azul de algodón, cuando no se quieren hacer preparaciones fijas. Para la tinción de éstas el uso de cualquier tipo de hematoxilina ofrece buenos resultados; para la observación de estructuras en detalle es preferible el uso de hematoxilina Heidenhein, hematoxilina de Harris o hematoxilina lugol de Papamiltiades; el material calcáreo debe decalcificarse perfectamente antes de la coloración, los cortes por congelación que no están bien decalcificados es preferible no teñirlos

con hematoxilina sulfato de zinc. Para contrastar deben usarse preferentemente eritrosina verde ácido o naranjado G. El montaje puede hacerse en bálsamo de Canadá, usando como aclarante xilol, pero en los cortes por congelación es recomendable sustituir este último por creosota; para los géneros *Ulva*, *Enteromopha* y *Cladophora* es preferible el uso de miel Karo.

2.—Para las Feofíceas es preferible el uso de ácido acético-ácido crómico, como fijador. Para la deshidratación, el empleo de alcohol butílico terciario es el más adecuado. Los cortes de la familia de las Dictiotales requieren un grosor de 50 a 100 micras, pero en otros géneros es necesario hacer cortes de mayor tamaño; para los Ectocarpales se recomiendan las preparaciones "in toto". Se logra una buena tinción con café de Bismarck contrastando con verde ácido, o bien el uso de hematoxilinas cuando se requiere una coloración detallada. Para montar los cortes por congelación de *Padina* y *Zonaria* en bálsamo es mejor usar creosota como aclarante, la cual puede usarse también en las Ectocarpales; en otros casos el empleo de xilol no modifica las estructuras.

3.—Las Cianofíceas que presentan consistencia córnea se fijan bien con ácido acético-ácido crómico y como deshidrante el alcohol butílico terciario. La inclusión es lo más recomendable, siendo los cortes de 15 y 20 micras en los que mejor se observan las estructuras. La coloración preferentemente debe hacerse con hematoxilina de Heidenhain o Harris, empleándose como contraste eritrosina o naranjado G. El montaje en bálsamo de Canadá es el más indicado usándose como aclarante xilol.

4.—La fijación de las Rodofíceas con ácido acético-ácido crómico debe ser controlada o en todo caso es preferible el uso de formol; para las Coralináceas es necesario el empleo de fijadores especiales o bien descalcificantes. La deshidratación con alcohol butílico terciario es la indicada. La inclusión es preferible. En algunos casos estando los cortes por congelación, como en algunas Rodomeláceas (*Acanthophora*, *Bryothamnion*, *Laurencia*) o *Hypnea*; en las Ceramiáceas las preparaciones "in toto" son las más recomendadas, así como para la *Polysiphonia*. La coloración con azul de algodón es la que da mejores resultados en las Helminthocladáceas, por ejemplo en *Liagora* las estructuras se aprecian con mayor detalle por medio de esta tinción, que a través de las preparaciones fijas. Las hematoxilinas en general tiñen bien las estructuras, pero se recomienda preferentemente el uso de hematoxilina lugol; el contraste con la eritrosina o eosina es lo más indicado. Para montar los ejemplares de este grupo se puede usar miel Karo; sobre todo en las preparaciones "in toto" el xilol no es recomendado como aclarante, aunque en el caso de las Criptomenciales y Coralináceas es el más indicado para montar en bálsamo; cuando se contrasta con colorantes disueltos en aceite de clavo-celosolve metílico, es preferible usar como aclarante aceite de clavo.

5.—Haciendo una referencia en particular a las hematoxilinas, hay que indicar que la hematoxilina lugol puede sustituir a los otros tipos de

hematoxilina, obteniéndose con ella no solamente una tinción general, sino incluso específica para materiales nucleares, teniendo como ventaja el poco tiempo que necesita para su preparación, así como para teñir, que como se ha indicado anteriormente se efectúa en un tiempo aproximado de 5 minutos (contando la coloración y el viraje).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ANONIMO. 1957. *Las Algas Marinas Tienen Gran Aplicación en la Industria Farmacéutica*. Rev. El Farmaceutici. Vol. 33 No. 9. New York. Pag. 31.
- 2.—BORGESEN, F. 1920. *The Marine Algae of the Danish West Indies*. Copehagen.
- 3.—BRONTE, J. G. and W. BEAMS. 1950. *The Microtomist's Vademecum*. London.
- 4.—CHAMBERLAIN, C. J. 1932. *Methods in Plant Histology*. The University of Chicago Press.
- 5.—DAWSON, E. Y. 1956. *How to know the Seaweeds*. WM. C. Brow Company Publishers. Dubuque, Iowa.
- 6.—FRITSH, F. E. 1935. *The Structure and Reproduction of Algae*. Cambridge University Press.
- 7.—Huerta, M. L. 1958. Contribución al conocimiento de las algas de los bajos de la Zona de Campeche, Cozumel e Isla de Mujeres. *Anales de la Escuela Nal. de Ciencias Biológicas*, IX (1-4). México, Pág. 115-123
- 8.—JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Co. New York.
- 9.—MCLEAN, R. C. and W. R. IVIMEY-COOK. 1952. *Textbook of Practical Botany*. Longmans, Green and Co. London.
- 10.—NORDENSKIÖLD, E. 1949. *Evolución Histórica de las Ciencias Biológicas*. Buenos Aires.
- 11.—PINDEL, J. P. 1957. *Acquisitions Récentes en Cytologie Vaginale Hormonale*. Masson Editeurs. Paris. Pag. 7.
- 12.—SASS, J. E. 1958. *Botanical Microtechnique*. The Iowa State College Press, Ames Iowa.
- 13.—SANCHEZ, R. MA. E. 1958. *Las Algas Marinas y su Importancia Económica*. Rev. Horizontes Económicos, Escuela Nacional de Economía I. P. N., Mex. Pag. 18-20.
- 14.—SINGER, CH. 1947. *Historia de la Biología*. Buenos Aires.
- 15.—SMITH, G. M. 1938. *Cryptogamic Botany*. Vol. I. McGraw-Hill Co. New York.
- 16.—SMITH, G. M. 1951. *Marine Algae of Monterrey Peninsula*. Stanford University Press. California.
- 17.—TAYLOR, W. R. 1942. *Caribbean Marine Algae of the Allan Hancock Expeditions, 1939*. The University of Southern California Press.
- 18.—TAYLOR, W. R. 1957. *Marine Algae of the Northeastern Coast of North America*. The University Michigan Press.
- 19.—TILDEN, J. E. 1935 *The Algae and Their Life Relations*. Minneapolis.