

EL MÉTODO DE ACHÚCARRO
(AL TANINO Y PLATA AMONICAL)
APLICADO AL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS
OLEÍFERAS DE LAS SEMILLAS

por

E. FERNÁNDEZ GALIANO

El proceder de Achúcarro al tanino y plata amoniacal constituye un recurso técnico que a su autor y a otros experimentadores ha dado excelentes resultados en el estudio de la neuroglia y del tejido conjuntivo; de modo que ha tomado carta de naturaleza en la técnica histológica animal, siendo hoy insubstituible para la revelación de determinados pormenores de estructura.

En la histología vegetal, en cambio, no ha sido empleado más que por Madrid Moreno que lo cita de pasada en uno de sus trabajos (1), en el que expone los interesantes resultados que ha obtenido con el empleo de los reactivos argénticos en las partes duras de los vegetales, cubiertas o pericarpios leñosos.

Nosotros hemos empleado el citado procedimiento para el estudio de las células del embrión, del albumen y del endospermo que contienen aceite como sustancia de reserva en determinadas semillas, habiendo conseguido resultados que nos parecen dignos de ser conocidos.

(1) Las impregnaciones de plata en histología vegetal (*Bol. de la R. Soc. esp. de Hist. Nat.*, t. XIII, 1813, p. 299).

Las semillas que hasta ahora llevamos ensayadas son las de ricino, almendro, nogal, lino, evónimo, avellana, pino y calabaza que, como es sabido, contienen aceites, y hemos comprobado que en las células de todas ellas se verifica la reacción próximamente de la misma manera; las partes utilizadas han sido: los cotiledones en las semillas de almendro, nogal, evónimo, ricino y pino; el albumen en las de ricino, lino, almendro, calabaza, avellana y evónimo, y el endospermo en las de pino.

Hemos comenzado por fijar trozos de semillas, no mayores de medio centímetro cúbico, en solución de formol al 12 por 100, en el cual líquido han permanecido durante tiempo variable, que siempre ha excedido de 24 horas. Nos parece que las mejores fijaciones se consiguen a los tres o cuatro días de permanencia en el líquido, lo cual no obsta, sin embargo, para que hayamos obtenido regulares preparaciones con semillas que han estado más tiempo en el fijador. Un número excesivo de días es perjudicial.

Después de bien lavados los bloques en agua destilada y hechas las secciones (que deben tener veinte o más milésimas de milímetro de espesor) con ayuda del microtomo de congelación, o con el microtomo de mano, son introducidos los cortes en la solución acuosa saturada de tanino y conservados allí durante media hora en la estufa a la temperatura de 55°. Hemos ensayado también, atendiendo a lo que aconseja Achúcarro, mantener los cortes en la solución de tanino en frío durante 24 horas: el resultado que se obtiene en ambos casos es sensiblemente el mismo, por lo cual, y en obsequio a la brevedad, hemos utilizado la estufa en el mayor número de casos.

Lavadas esmeradamente las secciones después de frías, las hemos pasado a un pocillo de porcelana conteniendo 20 c. c. de agua destilada a la que se han añadido diez gotas de la solución de plata Bielschowsky; en dicho líquido

se han removido los cortes sin cesar para que la impregnación se verificase de una manera regular hasta que han tomado un color pardo y en este momento se han llevado al agua para ser objeto de un buen lavado.

El final de este método consiste en sumergir los cortes en una solución de formol al 20 por 100 que obra como reductor y en donde se tienen durante diez minutos. Tratándose del material de que nos ocupamos, este tránsito puede evitarse, pues no hemos encontrado grandes diferencias entre los cortes que han pasado por el formol al 20 por 100 y los que, desde la plata, una vez lavados, han ido al portaobjetos.

No hay necesidad de decir que, tratándose de preparaciones impregnadas de tanino, el paso de los cortes de unos líquidos a otros se realiza con la ayuda de ganchos de vidrio, huyendo de emplear agujas o espátulas metálicas.

La reacción obtenida con este procedimiento en las células oleíferas es constante, dependiendo, como es natural, la mayor o menor intensidad y limpieza de la misma de las condiciones de tiempo de fijación, mejor o peor estado de la solución argéntica, etc.

Las células que resultan mejor impregnadas aparecen al microscopio (en enfoque superficial) con el aspecto que reproducen el dibujo y la fotografía (1) que acompañan este trabajo, tomados de una preparación de semilla de almendra: en ellos se ve que la plata se ha depositado sobre la célula dibujando una red o retículo, cuyas mallas, bastante estrechas, son absolutamente hialinas. En general, las mallas de la red afectan forma

(1) Esta fotografía ha sido ejecutada por el alumno de Medicina Sr. Fornells. Damos las gracias a dicho señor, así como al Dr. C. Calleja que ha puesto a nuestra disposición el laboratorio de Microfotografía de esta Facultad de Medicina.

exagonal, con ángulos redondeados, no faltando ocasiones en que en ciertos puntos la regularidad del retículo se interrumpe, formando nudos u originando unas cuantas mallas más estrechas que las demás o no rigurosamente exagonales.

El grosor y aun el aspecto de los hilos del retículo parece depender de la intensidad con que la impregnación se ha verificado: así, por ejemplo, en las partes más exteriores de los cortes, en que evidentemente la fijación se ha operado con más energía a causa de que han estado en más inmediato contacto con el líquido fijador, los hilos de la red muéstranse más recios y de contornos más firmes y acusados; en la células yacentes, por el contrario, en las partes profundas de la semilla el retículo se distingue bajo la forma de hilos más delgados y, en muchas ocasiones, de aspecto moniliforme. Parece existir también una cierta proporcionalidad entre el grosor de los hilos de la red y el tamaño de las células: son muy finos, por ejemplo, los de la semilla de lino, cuyas células alcanzan, asimismo, exiguas dimensiones, y bastante gruesos, en cambio, los pertenecientes a corpúsculos grandes, como son los de calabaza, ricino, etc.

Enfocando ahora la parte media de la célula desaparece el retículo, que vuelve a surgir cuando se continúa bajando el tubo del microscopio hasta enfocar la superficie inferior de la célula: resulta, pues, que el retículo se dibuja sobre una lámina que envuelve completamente el protoplasma por debajo de la membrana celulósica, como lo demuestran los siguientes hechos: 1.º, que, según hemos adelantado, el retículo sólo se destaca enfocando las superficies superior e inferior de la célula y nunca enfocando la parte media, en la que yacen las inclusiones (granos de aleurona, etc.); 2.º, que la membrana celulósica queda incolora o uniformemente teñida de un leve

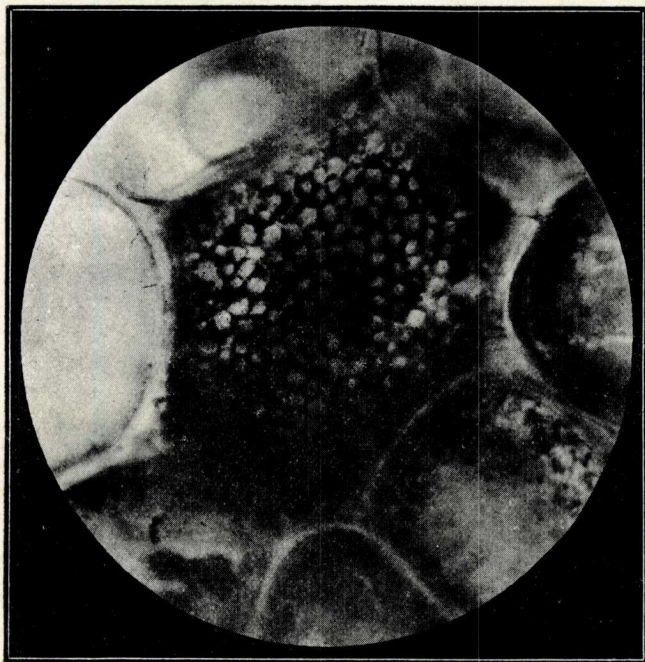
color amarillo, como se puede observar en ciertas células que, por accidentes de la manipulación, han perdido el contenido, quedando solamente como resto la membrana celulósica más o menos destrozada; 3.º, que en las células que aparecen seccionadas por la cuchilla del microtomo no se ve el retículo más que una vez, ya sea en la superficie de arriba, ya en la de abajo; 4.º, que en muchos casos queda la supradicha lámina o envoltura periprotoplásmica accidentalmente desgarrada, observándose entonces perfectamente la red en los jirones que resultan; 5.º, que aunque el protoplasma de algunas células quede algo plasmolizado o retraído en el interior de la membrana celulósica, el retículo se distingue en la superficie de aquél.

Verosímilmente, la lámina periprotoplásmica sobre la cual se diseña el retículo no es otra cosa que la fina película albuminoide que, como es sabido, circunda inmediatamente el protoplasma de las células vegetales; quizá la citada rejilla constituye un refuerzo para la membrana albuminoide.

Además de todo esto, hemos hecho preparaciones por el método de Achúcarro, las cuales han sido después teñidas por el rojo Sudán III que, según es sabido, constituye un magnífico reactivo de las grasas, y en ellas hemos podido observar cómo por debajo del retículo aparece el protoplasma teñido de rojo anaranjado, lo que confirma la antigua opinión de que la grasa está emulsionada con el protoplasma en las células de que hablamos.

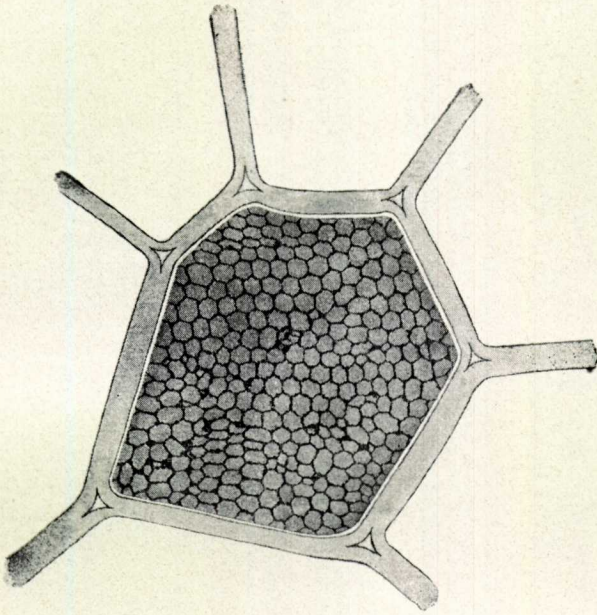
La precipitación de la plata no se opera sobre la grasa: así lo demuestra el hecho de la incolorabilidad del protoplasma emulsionado con la substancia oleaginosa, así como también la circunstancia de que las gotas de grasa que accidentalmente quedan fuera de las células se muestran invariablemente incoloras.

E. Fernández Galiano



Célula del albumen de una almendra (método de Achúcarro).
Microfotografía.

E. Fernández Galiano



Célula del albumen de almendra (enfoque superficial).
El protoplasma aparece un poco retraído y despegado
de la membrana celulósica.

Hemos ensayado diversos medios de montaje para estas preparaciones, lo que nos ha permitido observar que en los cortes montados en bálsamo del Canadá el retículo comienza a deteriorarse y deshacerse al cabo de algunos días, particularmente en la región central de las secciones. Este inconveniente se atenúa en los cortes montados en glicerina y desaparece casi por completo en los montados en gelatina-glicerina, los cuales exhiben la citada red con gran claridad varias semanas después de terminada la preparación.

Laboratorio de Histología. Facultad de Ciencias.