

## Modificación de la técnica microhistológica

Arellano, I.<sup>1</sup>; Pinto, R.<sup>1</sup>®; López, A.<sup>1</sup>; Guevara, F.<sup>1</sup>; Hernández, D.<sup>2</sup> y Ley, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chiapas. Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical. Facultad de Ciencias Agronómicas. Chiapas. México.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Chiapas. México.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Dieta seleccionada.  
Composición botánica.  
Diafanización.  
Montaje.  
Tejidos vegetales.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Selected diet.  
Botanical composition.  
Diaphanization.  
Mounting.  
Vegetable tissues.

### INFORMATION

Cronología del artículo.  
Recibido/Received: 21.11.2017  
Aceptado/Accepted: 09.01.2019  
On-line: 15.01.2019  
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:  
[pinto\\_ruiz@yahoo.com.mx](mailto:pinto_ruiz@yahoo.com.mx)

### INTRODUCCIÓN

El estudio de la composición botánica de la dieta de herbívoros domésticos permite identificar las especies que componen la dieta de los animales herbívoros con la finalidad de formular programas de suplementación en casos de deficiencias nutricionales (Holechek et al. 1982, p. 363) o para promover la disminución de emisiones de gases efecto invernadero (Brunes et al. 2017, p. 288). La dieta de herbívoros silvestres y domésticos puede ser conocida mediante diferentes técnicas, entre ellas el método microhistológico, el cual consiste en el análisis microscópico de los restos no digeridos de las plantas consumidas (Arias et al. 2015, p. 72). Para la aplicación de dicha metodología se requiere el conocimiento previo de las características epidérmicas de

### RESUMEN

La microhistología se basa en la identificación bajo microscopio de fragmentos epidérmicos vegetales, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar la composición de la dieta de herbívoros silvestres y domésticos. El objetivo del trabajo fue modificar la técnica microhistológica actualmente utilizada con la finalidad de optimizar su uso. Se trabajó con la especie *Guazuma ulmifolia* debido a los tricomas estrellados que caracteriza esta especie arborea forrajera. Las modificaciones de la técnica permitieron reducir el tiempo de preparación del material vegetal de seis días a 30 minutos, así como evitar el uso de sustancias de difícil acceso como el hidrato de cloral (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) y mejorar la calidad en las observaciones microscópicas.

### Modification of the microhistological technique

### SUMMARY

Microhistology is based on the identification under microscope of plant epidermal fragments, this technique has been widely used to study the composition of the diet of wild and domestic herbivores. The objective of the work was to modify the microhistological technique currently used in order to optimize its use. We worked with the species *Guazuma ulmifolia* due to the starry trichomes that characterize this arboreal forage species. The modifications of the technique allowed to reduce the time of preparation of the vegetal material from six days to 30 minutes, as well as to avoid the use of substances of difficult access such as chloral hydrate and to improve the quality in the microscopic observations.

los tejidos vegetales al microscopio, tales como células epidérmicas, estomas, pelos y tricomas (Pelliza 1993, p. 75). Sin embargo, en los métodos microhistológicos actuales, se hace necesario de ingredientes de uso controlado tal como el hidrato de cloral (regulado su uso por la legislación), además de que la preparación del material vegetal para la observación al microscopio puede tener un proceso cuya duración varía entre cinco a seis días de trabajo de laboratorio (Catán et al. 2003, p. 72). Por ello, es necesario hacer adecuaciones a la técnica que permitan prescindir de los reactivos controlados, mayor rapidez y una identificación clara y confiable de las características epidérmicas de las muestras. Por lo anterior, el objetivo del trabajo es presentar las modificaciones introducidas al procedimiento de la técnica

microhistológica usado por Peña (1980), Catán et al. (2003) y Cota y Bobadilla (2014).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La técnica fue montada e implementada en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas, la cual se encuentra localizada en el municipio de Villaflores, al oeste del estado de Chiapas, México. Se sitúa entre los 16°13'15" de LN y 93°16'07" LO, a una altitud de 610 ms.n.m. Se utilizó como especie de referencia follaje de la arbórea *Guazuma ulmifolia*, la cual presenta tricomas estrellados, característica que permite una pronta identificación en comparación a otras especies. El material extraído fue procesado con cuatro técnicas (Peña 1980, Catán et al. 2003, Cota y Bobadilla 2014 y la técnica modificada) con la finalidad de compararlas.

Para la modificación, el trabajo se dividió en diferentes etapas de preparación del material vegetal. Primeramente, las muestras de *Guazuma ulmifolia* fueron secadas, molidas y homogenizadas de acuerdo a las recomendaciones propuestas por González y Améndola (2010, p. 121). Posteriormente, las muestras fueron diafanadas, para lo cual el volumen del material molido fue colocado en matraces Micro Kjeldahl de 100 mL, a este se le agregaron 5 mL de Hidróxido de sodio al 40%, 10 mL de alcohol al 96% y cinco perlas de ebullición; los matraces fueron colocados en un Micro Digestor a 100°C por cinco minutos. Después de la ebullición del material, se enjuagó en un tamiz de 100 mesh con agua corriente y se escurrió por cinco minutos, inmediatamente el material fue colocado en un recipiente con tapadera de rosca agregándole 20 mL de hipoclorito de sodio de uso doméstico sin jabón, y se agitó por cinco minutos, al finalizar este proceso, se realizó el último lavado con agua a presión.

La siguiente etapa consistió en el montaje, utilizando como medio de montaje gelatina glicerizada, propuesto por Johansen (1940, p. 523). Para la preparación de 250 cm<sup>3</sup> de este medio de montaje, se usaron 15 g de grenetina sin sabor, la cual se preparó disolviéndola en 90 cm<sup>3</sup> de agua a una temperatura aproximada de 35°C. Posteriormente se agregó 105 cm<sup>3</sup> de glicerina y 1,5 g de fenol para inmediatamente después filtrar la mezcla con ayuda de un algodón localizado en un embudo. Previo a realizar el montaje con gelatina glicerizada, la mezcla se colocó en baño maría a una temperatura de 35°C a 37°C.

En cada portaobjetos se colocó un volumen de 6 mm<sup>3</sup> de la muestra 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. El cubreobjetos empleado fue de 20x20 mm, se aseguró que la densidad de partículas fuera uniforme en toda la superficie, para garantizar el reconocimiento de, al menos, 2 o 3 fragmentos por campo microscópico, tal como lo precisa la técnica microhistológica y se garantizó la ausencia de burbujas en todo el extendido. Posteriormente, se llevó a cabo el etiquetado y secado de las muestras, lo anterior se realizó después

de realizado el montaje, se sellaron las preparaciones, utilizando para ello esmalte transparente para uñas con el objeto de asegurar una mejor conservación del patrón. El patrón de la epidermis obtenido, se etiquetó indicando el nombre científico de la especie vegetal, lugar y fecha de recolección, las muestras se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron las observaciones de las características epidérmicas para cada especie, utilizando 100 aumentos por campo, entendiéndose por campo al área fija comprendida en una observación (Sparks y Malechek 1968, p. 264). La comparación entre las técnicas reportadas y la modificación fue descriptiva.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las etapas de secado y molido así como la homogenización de las muestras fueron similares a lo reportado por Peña (1980), Catán et al. (2003) y Cota y Bobadilla (2014). En la etapa que corresponde a la diafanización, las modificaciones introducidas en esta técnica microhistológica, permitieron evitar el uso de hidróxido de cloro durante un minuto, inmersión de hidróxido de sodio al 50% por 4 minutos y clarificación con solución Hertwig propuesto por Peña (1980), así también obviar el uso de hipoclorito de sodio al 60% en agua durante dos horas y clarificación por dos minutos en hidrato de cloral (reactivo de uso controlado y prohibido), propuesto por Catán et al. (2003), se evitó el uso alcohol al 96% por 20 minutos a 400°C, así mismo no se utilizó hipoclorito de sodio al 60%. Sobre la etapa que correspondió al montaje, las modificaciones propuestas únicamente fueron diferentes a Cota y Bobadilla (2014), autores que indican que el montaje se realiza esparciendo 6 mm<sup>3</sup> del material molido sobre un portaobjetos, al que se le adicionaron 2 mL del medio de montaje (gelatina glicerizada). El etiquetado se realizó de igual forma para cada una de las cuatro modificaciones. Por otro lado, el tiempo y forma de secado propuesto por Peña (1980) indica que se debe secar en estufa a 50°C por 6 días, mientras que Catán et al. (2003) señala que el secado debe realizarse por dos horas a 5°C, mientras que el tiempo de secado en el presente trabajo fue de 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el tiempo de preparación del material fue diferente para cada modificación de la técnica microhistológica de seis días para Peña (1980), cinco horas para Catán et al. (2003) y dos horas para Cota y Bobadilla (2014).

Las modificaciones introducidas en la técnica microhistológica, propuestas en esta investigación permitieron preparar el material vegetal en 30 minutos. Por otro lado, las fotografías que se obtuvieron a partir de los portaobjetos preparados con la técnica modificada, muestran mayor calidad en las observaciones microscópicas en comparación a la fotografía obtenida con la técnica propuesta por Peña (1980), mejorando así la identificación de los fragmentos de las especies vegetales (**Figuras 1 y 2**). Así también, la modificación propuesta permitió describir en detalle las características de los tricomas estrellados de la especie forrajera elegida para este trabajo por lo que se considera que esta modificación permitirá describir en detalle las características de la epidermis de las diferentes espe-



Figura 1. Tricomas estrellados pluricelulares de *Guazuma ulmifolia* obtenida mediante la técnica Peña (1980) (izquierda) y la obtenida mediante la modificación propuesta (derecha) (Multicellular starred trichomes of *Guazuma Ulmifolia* obtained with the technique of Peña (1980) (left) and obtained with the modification proposed (right).

cies vegetales consumidas por los animales. El método modificado resulta simple, debido al menor manipuleo y a la marcada reducción del tiempo empleado en la preparación del material vegetal, así como más económico por la menor cantidad de reactivos empleados.

Las observaciones de la estructura de la epidermis de las especies vegetales consumidas por los animales permiten predecir el comportamiento productivo y además controlar el aprovechamiento de los recursos vegetales (Castellardo et al. 2007), por ello, es necesario que la información obtenida por las técnicas microhistológicas permitan mejorar la identificación y caracterización de la epidermis de las plantas. Espunya et al. (2014, p. 261) mencionan que la veracidad de las técnicas microhistológicas depende en gran medida de la integridad de los restos vegetales como resultado del proceso de la digestión, así como el factor humano, ya que en el entrenamiento y la excesiva subjetividad suponen una limitación adicional a las ya descritas por parte de la robustez de los resultados. Al respecto, Vavra y Holechek (1980, p. 372) señalan que es importante seguir los procedimientos de la técnica respetando tiempos y cantidades a emplear; con la intención de reducir los factores que pueden llegar a modificar los resultados obtenidos.

## CONCLUSIÓN

Las modificaciones propuestas en el presente trabajo facilitan el procesamiento del material vegetal, disminuyendo los tiempos de la técnica; además de mejorar el reconocimiento de caracteres microhistológicos, como la forma, dimensión y distribución de las células, estomas y tricomas presentes en los restos de epidermis foliares y de prescindir de reactivos de uso controlado.

## BIBLIOGRAFÍA

Arias, N, Feijoo, S, Quinteros, P, & Bava, J 2015, Composición botánica de la dieta del guanaco (*Lama guanicoe*) en la Reserva Corazón de la

Isla, Tierra del Fuego (Argentina): utilización estacional de *Nothofagus* spp., *Bosque (Valdivia)*, vol.36, no.1, pp.71-79.

Brunes LC & Couto VRM 2017. Balanço de gases de efeito estufa em sistemas de produção de bovinos de corte. *Archivos de Zootecnia*, 66 (254): 287-299.

Castellardo, G, Squella, N, Ullrich, R, León, C, & Raggi, S 2007, Algunas Técnicas Microhistológicas utilizadas en la determinación de la composición botánica de dietas de herbívoros. *Agricultura Técnica*, vol. 67, no. 1, pp. 86-93.

Catán, A, Degano, C & Larcher, L 2003, Modificaciones a la técnica microhistológica de Peña Neira para especies forrajeras del Chaco Semiárido Argentino, *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, no. 10, pp. 71-75.

Cota, U & Bobadilla, H 2014, Modificaciones a la técnica de microhistología vegetal. *Congreso Mundial de Ganadería Tropical. Tamaulipas. México*. pp. 133-138.

Espunya, M, Rivera, L & Bartolomé, J 2014, Estudio comparativo de los componentes vegetales presentes en heces de herbívoros, mediante técnicas microhistológicas y moleculares, *53ª Reunión Científica de la SEEP*, pp. 255-262.

González, E & Améndola, M. 2010, Técnica microhistológica para la determinación de la composición botánica de la dieta de herbívoros. *Universidad Autónoma Chapingo. México*, pp. 121.

Holechek, J, Vavra, M & Pieper, R 1982, Methods for determining the nutritive quality of ruminant diets: a review, *Journal Anim Sci*, vol. 54, no. 2, pp. 363-372.

Johansen, D 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company. London, pp. 523.

Pelliza, A 1993, Acerca de la microhistología, Comunicación técnica no. 32. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. *Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. S.C. de Bariloche. Río Negro. Argentina*. Pp. 75.

Peña, J 1980, Serie técnico científica, *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México*. vol.1, no.6, pp. 82.

Sparks, D & Malechek, J 1968. Estimating percentage dry weight in diets using a microscopic technique. *J. Range Manage*, vol. 2, no.4, pp. 264-265.

Vavra, M & Holechek, J 1980, Factors Influencing Microhistological Analysis of Herbivore Diets, *Journal of Range Management*, vol. 33, no. 5, pp. 371-374.