

G. P. SINI

CENNI di TECNICA MICROSCOPICA

applicata agli

ORGANISMI e TESSUTI VEGETALI

INDICE

1 – PECULIARITÀ DEI TESSUTI VEGETALI	2
2 - PRECAUZIONI	5
3 - REAGENTI	5
3.1 – FISSATIVI	5
3.1.1 – Formolo	6
3.1.2 – Acido acetico “glaciale” o “cristallizzabile”	6
3.1.3 – Alcool etilico	6
3.1.4 - Acido picrico	6
3.1.5 – Liquido di Duboscq – Brasil	7
3.1.6 – Picro-formolo di Bouin	7
3.1.7 – Alcool formolato acetico	7
3.2 – COLORANTI	7
3.2.1 – Coloranti singoli	8
3.2.2 - Colorazioni miste	9
4 - RISCHIARAMENTO O CHIARIFICAZIONE	11
5 - DISIDRATAZIONE	11
6 - MACERAZIONE E DISSOCIAZIONE	12
7 - LAVAGGIO	13
8 - LA SEZIONE	13
8.1 - SEZIONI A MANO	14
8.2 - IL MICROTOMO DI RANVIER	15
8.3 - MICROTOMI A LAMA GUIDATA	16
9 - INCLUSIONE	17
10 - MONTAGGIO	17
10.1 – LIQUIDI DI MONTAGGIO NON INDURENTI - LA LUTAZIONE	18
10.2 - LIQUIDI DI MONTAGGIO INDURENTI	19
10.3 - MONTAGGIO A SECCO	21
11 -- TECNICHE PER CASI PARTICOLARI	21
11.1 - PREPARATI “A FRESCO”	21
11.2 - MONTAGGI “IN TOTO”	23
12 - CATEGORIE SPECIALI DI OGGETTI	23
12.1 - EMBRIONI VEGETALI	23
12.2 - CROMOSOMI	23
12.3 - MITOCONDRI	24
12.4 - NUCLEOLI	24
13 - I PRINCIPALI GRUPPI VEGETALI	25
13.1 - ALGHE UNICELLULARI TERRESTRI	25
13.2 - ALGHE UNICELLULARI D’ACQUA DOLCE	25
13.3 - DIATOMEE (frustoli)	26
13.4 - ALGHE MARINE	27
13.5 - FUNGHI	27
13.5.1 -- Le Mucorali	28
13.5.2 -- I Saccaromiceti (lieviti)	28
13.5.3 -- Basidiomiceti maggiori	28
13.5.4 -- Uredinali	28
13.5.5 -- Esami in vivo	29
13.6 -- LICHENI	29

13.7 -- BRIOFITE (Muschi ed Epatiche)	30
13.7.1 -- Torba	30
13.8 -- FELCI	31
13.9 -- FANEROGAME (piante con fiori e semi)	32
13.9.1 -- Le sezioni	32
13.9.2 -- Il legno	34
13.9.3 -- Le epidermidi ed i peli	35
13.9.4 -- Le foglie	35
BIBLIOGRAFIA	37

1 – PECULIARITÀ dei TESSUTI VEGETALI

Le tecniche di preparazione dei tessuti ed organismi vegetali per l'osservazione al microscopio sono assai numerose. Esse infatti si devono adattare a condizioni assai varie:

- la natura dell'oggetto, la sua struttura (ad es. omogenea o fibrosa), la sua consistenza, le sue proprietà chimiche (deperibilità, comportamento di fronte ai reagenti, ecc.);
- le esigenze dell'osservatore (disponibilità di tempo, osservazione temporanea, conservazione a lungo termine, ecc.);
- disponibilità e pericolosità dei vari reagenti:
- disponibilità o meno di apparecchi speciali (pompa a vuoto, centrifuga, microtomo, stufetta termostatica, ecc.).

D'altra parte, questi problemi sono comuni anche a quasi tutti gli oggetti di origine animale e, poiché la tecnica microscopica è stata ben sviluppata nei confronti della biologia animale e della medicina, è utile rifarsi a queste scienze anche in campo botanico.

Gli organismi vegetali ed i loro tessuti presentano infatti una struttura cellulare che è comune agli animali: citoplasma, nucleo, cromosomi, ecc.

Ma con alcune differenze, che richiedono qualche ritocco alle tecniche usate in campo zoologico.

Le principali differenze esistenti fra la maggioranza dei tessuti e cellule animali e quelli vegetali sono:

- Parete cellulosica solo nei vegetali (a volte lignificata, suberificata, cutinizzata, ecc.). Questa parete si trova all'esterno della "membrana" a due strati fosfo-lipidici, che delimita TUTTE le cellule viventi rispetto all'ambiente. In molti testi si fa confusione fra le due strutture, parete e membrana, ben diverse dal punto di vista chimico e strutturale.

- Presenza, nelle cellule vegetali adulte, di grandi cavità del citoplasma (i vacuoli) ripiene di materiale acquoso non vivente, a volte di materiale di riserva (amido, olio, zuccheri, ecc., generalmente assenti nelle cellule animali).

La prima differenza dà ai tessuti vegetali una consistenza assai maggiore, non tanto per la rigidità della parete, ma per la capacità di essa di ammettere una pressione interna delle cellule ("turgore") impensabile nelle cellule animali. La pressione interna di una cellula vegetale è dovuta alla sua "pressione osmotica", dovuta a sua volta alla concentrazione delle soluzioni acquose del citoplasma e dei vacuoli, assai maggiore della concentrazione dell'acqua della pioggia o del terreno. Come è noto, se una membrana semipermeabile, come quella delle cellule, separa due soluzioni a diversa concentrazione, l'acqua tende a migrare verso la soluzione più concentrata, che nel caso nostro si trova all'interno delle cellule, aumentandone la pressione. Le cellule vegetali vive si comportano quindi come palloncini gonfiati.¹

¹ Con la cottura, la pressione del vapore all'interno delle cellule ne rompe la parete; la stessa cosa avviene col congelamento, per la formazione dei cristalli di ghiaccio. Il risultato è che le cellule vegetali in entrambi i casi

Il turgore consente quindi, spesso, ai tessuti vegetali di essere sezionati senza “includerli” in materiali più consistenti, come la paraffina; ne riparleremo.

Una seconda conseguenza, meno gradita, della parete cellulosica è che la penetrazione di molti reagenti viene rallentata o impedita.

La seconda differenza (la presenza di vacuoli nelle cellule vegetali) può richiedere trattamenti particolari per stabilizzare e colorare il contenuto dei vacuoli.

In compenso, nei tessuti vegetali esistono spesso strutture e materiali raramente presenti nei tessuti animali: la già citata cellulosa, lignina e simili, amido, cristalli di varia natura, come gli ossalati², cellule trasformate in solide fibre, ecc.

Tutti questi materiali appena citati godono di una proprietà ottica assai più rara nei tessuti animali: la birifrangenza³, la quale si mette in evidenza con l'illuminazione in luce polarizzata. Sfruttando questa proprietà, è possibile mettere in evidenza con forte contrasto e magari con vivaci colori anche materiali viventi, a fresco, non colorati.

L'uso della radiazione polarizzata consente osservazioni qualitative con quasi tutti i microscopi biologici; si tratta di una tecnica inizialmente assai semplice: basta applicare un filtro polarizzatore sotto al condensatore ed uno sopra l'obbiettivo e si tratta di filtri facilmente reperibili, ed a poco prezzo, presso i distributori di materiale per microscopia (vedi la fig. 155 nell'articolo O10 – “La polarizzazione della luce”). Questa tecnica è largamente ignorata dai naturalisti in genere.

Cominciamo quindi ad elencare i reagenti più utili per la preparazione di oggetti vegetali, consigliando però sempre di riferirsi alle tecniche in uso per i tessuti animali, che sono ben descritte in ottimi testi, alcuni dei quali sono citati in bibliografia, alla fine di questo articolo.

Per prima cosa, occorre convincersi che non esiste il reagente ideale che svolge del tutto la funzione che gli è affidata senza effetti negativi. Inoltre, molti risultati dipendono dalla temperatura, dalla composizione dell'acqua ed altri solventi usati per le varie soluzioni (spesso è indispensabile l'acqua distillata, l'alcool raffinato per uso chimico, ecc.), e soprattutto dalla natura e dalle condizioni dell'oggetto. Solo una lunga esperienza indica la procedura migliore.

Nascono problemi anche riguardo al modo di mettere l'oggetto in contatto col reagente. L'oggetto (microrganismo, frammento di organo o di tessuto, sezione sottile, ecc.) può avere dimensioni anche molto piccole e può facilmente andare perduto al fondo dei recipienti. Inoltre, può essere necessario economizzare certi reagenti per motivi di reperibilità o di costo ed in altri casi vi sono precauzioni da prendere per ridurre il contatto dell'operatore con soluzioni o vapori tossici.

Un primo caso è dato da oggetti isolati (microrganismi, frammenti), non fissati su vetrino od altro supporto. In questi casi viene consigliato l'uso di una reticella, possibilmente metallica, ripiegata o deformata per formare una cuvetta (fig. 1).

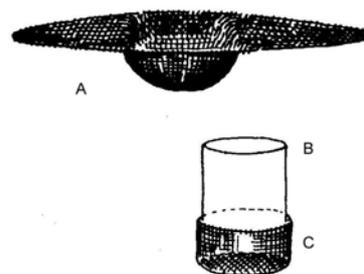
La cuvetta o il tubo possono confinare l'oggetto durante i vari passaggi da un recipiente all'altro. L'oggetto così subisce l'azione dei vari reagenti con un minimo consumo dei medesimi.

perdono turgore e si afflosciano come quelle animali. Tutti sanno che un frutto congelato e poi scongelato ha la consistenza del frutto cotto. E per gli stessi motivi.

² I sali dell'acido ossalico rappresentano per le piante ciò che rappresentano i sali dell'acido urico per gli animali: un materiale di rifiuto, prodotto ultimo del metabolismo. Ma le piante non possiedono strutture escretorie come i reni e pertanto sono costrette a depositare gli ossalati nei tessuti, specialmente in quelli morti (legno, catafilli, cortecce) sotto forma di cristalli insolubili.

³ Vedi l'articolo “Introduzione alla Microscopia in radiazione polarizzata” nella serie “Approfondimenti di microscopia ottica” e l'articolo O 10 - “La Polarizzazione della luce” nella serie “Esperienze di ottica”, sempre in questo sito.

Fig. 1 – A: reticella metallica incavata per il trasporto di piccoli oggetti da un recipiente all’altro. La stessa funzione si ottiene con un tubo di vetro aperto al fondo e munito di analoga reticella (B + C).



Finché è possibile, si preferiscano i recipienti in vetro a quelli in plastica, sia per il pericolo di inquinamento dei reagenti, sia per l’alterazione e la colorazione irreversibile delle varie materie plastiche.

Un altro metodo di manipolare l’oggetto è di poggiarlo su un porta-oggetti e di coprirlo con un copri-oggetto (o “**lamella**”), in modo che esso rimanga racchiuso in una sottile intercapedine. I vari liquidi andranno introdotti in quest’intercapedine poggiando la punta di un contagocce presso l’orlo della lamella. Al termine del tempo prescritto, il liquido andrà aspirato dalla parte opposta poggiando un pezzo di carta bibula o carta per asciugamani sempre sull’orlo della lamella.

Altra procedura è quella della “saliera” o del vetro d’orologio (fig. 2), recipienti a fondo concavo da cui un oggetto libero difficilmente sfugge se i reagenti vengono aggiunti ed eliminati con attenzione a mezzo di pipette o contagocce.

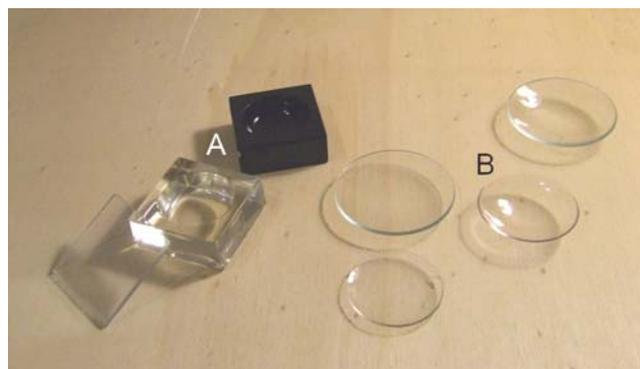
Fig. 2

A: “Saliera” in vetro;

B: “Vetri d’orologio”.

Si tratta di piccoli recipienti concavi in cui è possibile deporre piccoli oggetti da inondare, volta per volta, con i vari reagenti.

La quantità di questi ultimi può essere assai ridotta se si fa uso di contagocce.



Altra possibilità è di usare un normale tubo in vetro a fondo piatto (fig. 3). Occorrerà una maggior quantità di reagente (proprio perché il fondo non è incavato), ma in compenso è possibile chiudere il recipiente con un tappo, e con ciò ridurre l’ingresso della polvere e l’evaporazione del solvente.

Fig. 3 – Tubi in vetro a fondo piatto.



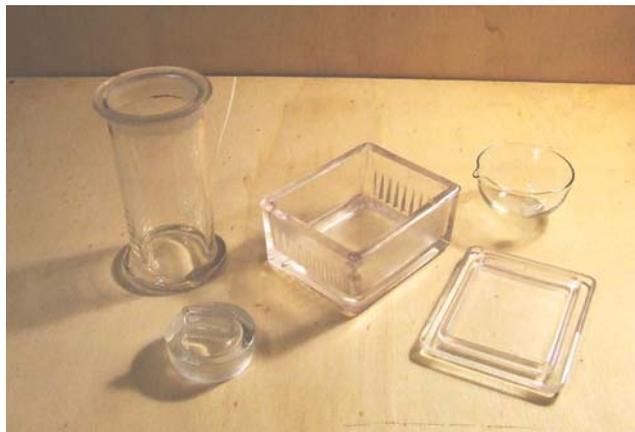
Se l’oggetto è già stato sezionato e le fette sono state fatte aderire ad un porta-oggetti, si può versare il reagente a gocce sul vetrino e, terminata la sua azione, scolarlo via inclinando il vetrino od assorbirlo col contagocce o con carta bibula. Sempre col contagocce, si potrà a

questo punto aggiungere il reagente successivo.

Se i vetrini sono più d'uno, conviene usare le apposite vaschette in vetro con scanalature (fig. 4, al centro) oppure i larghi tubi con tappo (fig. 4 a sinistra), ma in questo caso il consumo di reagente sarà elevato.

Fig. 4 – Contenitori per più vetrini portaoggetti, sia con supporto singolo (scanalature nelle pareti laterali della scatola quadrata), sia per semplice appoggio sul fondo (contenitore cilindrico).

Entrambi i contenitori possiedono un coperchio, il tutto in vetro.



2 -- PRECAUZIONI

-- Mai fumare, sia per non inquinare gli oggetti ed i reagenti, sia per la frequente presenza di materiali infiammabili (alcool, xilolo, ecc.) nei paraggi.

-- Massima pulizia, soprattutto nei confronti della polvere.

-- Massimo ordine per non confondere oggetti, reagenti e materiali diversi, che possono reagire fra loro o danneggiare occhi e pelle.

-- Conoscere bene i reagenti, le loro proprietà ed i loro pericoli, in particolare per quelli che, reagendo fra loro, tendono a ribollire. Quei liquidi che, per svolgere la loro funzione, devono essere portati all'ebollizione, siano manipolati in modo da evitare gli schizzi. Quelli che devono evaporare, siano tenuti lontani da ogni tipo di fiamma.

-- Mai versare acqua in un acido concentrato; in genere si sviluppa molto calore, con pericolo di spruzzi e rotture. Occorre versare l'acido nell'acqua.

-- Non versare liquidi caldi in recipienti di vetro a parete spessa, pena rotture.

-- Manipolare con cura lame ed aghi, specie se non disinfettati da poco.

-- Evitare gli indumenti in fibra sintetica.

-- Se si manipolano lieviti, muffe, batteri, spore, ecc., si eviti qualunque dispersione nell'ambiente. Disinfettare tutto con la varechina.

Si veda in proposito il testo di M. Brusadin in bibliografia ed in questo sito, e comunque si ricordi che molti dei reagenti indicati qui sono in qualche misura tossici, e quindi vanno usati con cautela. L'autore non si assume alcuna responsabilità per i danni derivanti da un uso inappropriato dei reagenti e strumenti descritti. Si vedano anche le indicazioni nella "Pagina di avvertimento" che si presenta all'apertura di questo sito.

3 -- REAGENTI

3.1 – FISSATIVI

I fissativi sono reagenti capaci di conservare la struttura originale dell'organismo, evitando alterazioni o putrefazioni. È ovvio che la fissazione va eseguita il più presto possibile, specialmente dopo la morte dell'organismo, proprio per evitare quelle alterazioni.

Non esiste il fissativo ideale, ma ognuno si presta meglio per certe strutture che per altre.

Dal punto di vista chimico, i fissativi possono essere classificati in base al tipo di azione che svolgono (vedi bibliografia), ma noi ci limiteremo a quelli più utili in botanica, partendo da singole sostanze e poi elencando alcune miscele.

3.1.1 – Formolo

Il formolo commerciale o “formalina” è una soluzione acquosa di aldeide formica al 35 - 40%. Questa soluzione si adopera di solito diluendola ulteriormente in acqua al 5 – 10%. Il costo è modesto.

La formalina del commercio contiene sempre un residuo di acido formico, ma questo generalmente non nuoce o addirittura può giovare alla fissazione.

Gli oggetti possono rimanere in essa per un tempo indefinito, ma l’azione deve durare almeno qualche ora per pezzi piccoli, altrimenti qualche giorno.

Il suo uso è universale, anche se può indurire certi oggetti ed alterarne altri.

Può essere utile, per questioni di pressione osmotica, di cui riparleremo, aggiungere alla soluzione il 3 – 4 % di cloruro di sodio, oppure realizzare un miscuglio con acqua marina nel caso si studino alghe o microrganismi marini.

Per i tessuti vegetali può essere utile invece aggiungere il 7 – 8% di zucchero.

Dopo l’azione del formolo, occorre un energico lavaggio.

Il formolo è dannoso alla pelle ed agli occhi, anche sotto forma di vapore.

3.1.2 – Acido acetico “glaciale” o “cristallizzabile”

Ottimo fissativo per i tessuti vegetali se sciolto in acqua al 1 – 5%.

Quello commerciale è una soluzione al 25% in acqua, e come tale serve solo come energico “rischiarante” (vedi oltre).

3.1.3 – Alcool etilico

In commercio si trova quello diluito con acqua, cioè concentrato al 90 – 95%. Spesso è sufficiente quello per liquori⁴.

È bene ricavarne soluzioni meno concentrate, per es. 60° o 80°. Poiché esso penetra male all’interno delle cellule vegetali, va usato con pezzi molto piccoli. Tende ad indurire i tessuti e questo può agevolare le sezioni a mano. Deve agire per 2 – 5 ore.

Come disidratante (vedi oltre) deve essere puro, cioè “anidro” (= senz’acqua) o “assoluto”; in realtà si può solo cercare di privarlo il più possibile dell’acqua, poiché esso è fortemente igroscopico e basta l’esposizione per pochi minuti all’aria o la conservazione in recipienti non sigillati per fargli assorbire l’umidità dell’aria e limitare il suo potere disidratante. Anche l’introduzione in esso di un oggetto contenente acqua lo rende non più “assoluto” e perciò è spesso necessario passare l’oggetto da disidratare in due o tre recipienti successivi di alcool assoluto, poiché nel primo la stessa introduzione dell’oggetto ha fatto decadere la purezza dell’alcool assoluto.

Poiché l’alcool assoluto commerciale è costosissimo e difficile da conservare, illustreremo un metodo economico per ottenerlo e mantenerlo, partendo da quello a 90° (vedi il § 5).

3.1.4 -- Acido picrico

Si presenta in forma di piccoli cristalli di un giallo intenso e di sapore amaro (attenzione: è tossico).

Va sciolto in acqua distillata a freddo fino a saturazione. Lasciar decantare almeno 12 ore. La sua azione deve durare alcuni giorni e poi il pezzo va lavato a lungo in alcool a 70° finché

⁴ La percentuale dell’alcool si esprime di solito in “gradi” (°): una soluzione acquosa al 90% si indica perciò “a 90°” (“a novanta gradi”).

non cede più colore.

3.1.5 – Liquido di Duboscq – Brasil

Alcool a 80° : 150 cc. – Formolo al 40% : 60 cc. – Acido acetico cristallizzabile : 15 cc. – Acido picrico : 1 gr.

Preparare la miscela subito prima dell'uso sciogliendo l'acido picrico nell'alcool e poi aggiungendo il formolo. All'ultimo minuto, aggiungere l'acido acetico.

Immergervi il pezzo per 1 – 3 ore. Poi, conservare nell'alcool non troppo concentrato.

3.1.6 – Picro-formolo di Bouin

Formolo commerciale (40%) : 1 parte. – Acqua distillata: 3 parti. – Ac picrico fino a saturazione. Al momento dell'uso, aggiungere acido acetico cristallizzabile al 5%.

Lasciare agire almeno 3 giorni. Lavare in alcool a 90° per 2 o 3 volte almeno.

3.1.7 – Alcool formolato acetico

Acido acetico glaciale : 1 cc. – Formolo : 5 cc. – Alcool a 60° : 100 cc.

Deve agire per qualche giorno, ma può anche servire per la conservazione a tempo indefinito.

3.2 – COLORANTI

La colorazione di un preparato per l'osservazione al microscopio ha lo scopo di rendere visibili oggetti o strutture molto trasparenti, ma più ancora di differenziare fra loro le varie strutture o parti di un oggetto.

Molte tecniche ottiche (contrasto di fase, DIC, campo oscuro, ecc.) possono dare forti contrasti nell'immagine di un oggetto trasparente, e magari vivente, senza alcuna manipolazione preventiva. Ma ciò in base a differenze di cammino ottico (spessore × indice di rifrazione), mentre un colorante è un reagente che tende a fissarsi chimicamente e selettivamente solo su particolari strutture e consente così di riconoscerle.

Lo studio di ogni categoria di oggetti sarà perciò più proficuo se basato sia sulle tecniche ottiche, sia sulle colorazioni selettive.

Ogni colorante mostra affinità per certe strutture più che per altre e quindi va scelto oculatamente caso per caso.

I coloranti a reazione acida sono adatti, fra l'altro, per la colorazione del citoplasma; quelli a reazione basica per i nuclei. Vi sono anche coloranti “neutri” e coloranti specifici per particolari gruppi di sostanze come i grassi, gli amidi, le cellulose, ecc.

Alcuni coloranti sono solubili in acqua; altri in alcool o altri solventi. Se un oggetto impregnato di alcool deve essere colorato da una soluzione acquosa, va prima passato nella “serie decrescente degli alcoli” secondo il procedimento della “re-idratazione”, di cui parleremo.

I coloranti per la microscopia sono in genere sostanze organiche complesse che tendono a alterarsi in un tempo variabile, da pochi mesi a qualche anno, anche se allo stato solido. In soluzione, la durata si può ridurre ancora. Subito prima di usare le soluzioni, è bene filtrarle con carta da filtro per eliminare eventuali “precipitati” (granuli solidi).

Ogni colorante va lasciato agire per un tempo determinato che dipende dalla sua concentrazione, dal tipo di oggetto, dalla temperatura, ecc. Col passare di questo tempo, la colorazione dell'oggetto diviene più forte (“colorazione progressiva”), ma a volte conviene lasciarla progredire oltre l'optimum, cioè “sovracolorare”, e poi scolorire parzialmente o “**differenziare**”, realizzando una colorazione “regressiva”. Il differenziamento può aumentare la selettività del colorante.

Il differenziamento, s'intende, va arrestato prima che il colorante scompaia del tutto ed il reagente differenziante va poi eliminato con cura, per essere certi che la sua azione non

proseguo oltre l'optimum, e per questo occorrerà un apposito "lavaggio". L'agente differenziante può essere costituito dall'alcool "cloridrico", cioè alcool a 70° addizionato da 5 gocce di acido cloridrico.

Sono poi frequenti le colorazioni "multiple", capaci di colorare simultaneamente varie parti di un oggetto, con affinità chimiche diverse. Si possono usare soluzioni contenenti due o più coloranti, oppure manipolazioni con una serie di soluzioni separate. È frequente colorare prima i nuclei e poi, con un secondo colorante, avere una "colorazione di contrasto" o "controcolorazione" del citoplasma, di un colore diverso.

Le soluzioni più concentrate ovviamente richiedono tempi di colorazione più brevi ma la maggiore selettività si ottiene con le soluzioni più diluite.

Citiamo ora i coloranti più utili nel campo della botanica.

3.2.1 – Coloranti singoli

•• Blu di Toluidina

Ha reazione basica e, per quanto detto a suo tempo, ha affinità elettiva per i nuclei. Ottimo per i preparati "a fresco" (vedi oltre). Si scioglie in acqua allo 0,05 %. È simile al blu di metilene, ma è più selettivo per i nuclei.

•• Blu di Metilene

Ha reazione basica. In soluzione al 1/10.000 si può usare *in vivo*. Molto usato in soluzione acquosa al 1%.

•• Blu d'acqua (Wasserblau)

Adatto per i cromosomi. Si usa in acqua al 1%, ma si può diluirlo molto per preparati a fresco. Disponendo della soluzione madre al 1%, conviene diluirlo ancora al momento dell'uso. Se dovesse sovracolorare, si può differenziare con alcool.

•• Blu cotone o Blu di Metile o Azzurro d'anilina.

Colorante acido, adatto ai funghi ed alle muffe. Si scioglie nel lattofenolo al 0,5%.

Il **lattofenolo di Amann** è così composto:

Acido fenico cristallizzato	: 10 g
Acido lattico	: 10 g
Glicerina	: 20 g
Acqua distillata	: 10 g

Va conservato al buio, per es. in bottiglie scure. Con questo liquido è possibile realizzare preparati a fresco e, con la lutazione (vedi oltre), anche preparati permanenti.

•• Verde rapido (FCF) o diamino trifetil metano

Colorante acido, più stabile del verde-luce, adatto per la cellulosa. Si scioglie in acqua al 1% o in alcool a 0,1% ma è bene lasciar maturare la soluzione per qualche giorno. Viene usato spesso assieme alla safranina.

•• Safranina O

Colorante basico, ottimo per le strutture nucleari e le pareti cellulari. Va sciolto in alcool a 95° all'1%. Al momento dell'uso, diluire una parte di questa soluzione madre con egual volume di acqua distillata. Colorare a lungo, anche uno o due giorni.

Occorre poi differenziare in alcool a 50° acidificato con acido acetico o acido cloridrico; la percentuale dell'acido deve essere molto bassa, inferiore a 0,5%.

•• Eosina-acqua

Colorante acido, normalmente usato per colorare il citoplasma. Si scioglie in acqua distillata all'1%. A differenza della safranina, non si conserva a lungo. Dopo alcune ore, l'oggetto è sovracolorato e deve seguire un differenziamento in acqua e poi in alcool a 70°.

•• Verde iodio

Si scioglie a saturazione nell'alcool e poi si diluisce questa soluzione con acqua distillata. È usato per la cromatina e la lignina. È simile al verde di metile. Lo si può usare come colorazione di contrasto per la fucsina. Deve agire per un'ora o più, in soluzione all'1% in alcool a 70%.

- Fucsina basica (Fucsina diamante o Magenta o Solferino)

È più solubile in alcool che in acqua e colora in breve tempo. Conviene poi differenziare in alcool o acqua acidificata con poche gocce di acido cloridrico o acetico.

La fucsina viene usata normalmente con l'aggiunta di acido fenico ed è consigliabile comperarla già pronta: va sotto il nome di "Fucsina di Ziehl"⁵. Si conserva per circa un anno, ma è bene filtrarla prima dell'uso.

- Ematossilina

Si tratta di un materiale estratto dal legno di campeggio (*Haematoxylon campechianum* L., Leguminose). Non ha proprietà coloranti di per sé, ma le acquista dopo aver trattato l'oggetto con qualche "mordente" contenente ferro od alluminio, cui poi si fissa l'ematossilina.

Le colorazioni con questo materiale sono complesse e non sempre affidabili, ed infatti ne esistono molte varianti, ma a volte sono insostituibili e pertanto ne riportiamo un paio, delle più adatte ai tessuti vegetali, ai cromosomi, ai pirenoidi, ecc.

La materia prima si trova sul mercato sotto forma di polvere; nel caso più semplice, la si può sciogliere in acqua distillata al 0,5% e va fatta "maturare" per qualche giorno.

Come mordente e differenziante va usato il solfato ferrico ammonico, in soluzione acquosa al 2 – 5%, per 30 minuti.

- 1^a ricetta – Ematossilina di Harris

È adatta per le colorazioni "in toto", cioè sull'oggetto non ancora sezionato.

Occorrono: Ematossilina in cristalli, 5 g – solfato di ammonio ed alluminio ("allume di potassio"), 3 g – alcool a 50°, 1 litro. Sciogliere l'ematossilina a caldo; aggiungere 6 g di ossido di mercurio in polvere rossa e bollire per 30 minuti. Filtrare a riportare al volume di 1 litro con altro alcool a 50°. Aggiungere 10 gocce di acido cloridrico.

Dopo la fissazione ed il lavaggio in acqua, i pezzi vanno messi nella soluzione appena descritta per 20 minuti; lavare bene in acqua distillata. Scolorire parzialmente in acqua acidulata (2 – 5 gocce di acido cloridrico in 100 cc di acqua) per circa 5 secondi. Lavare bene in acqua di rubinetto, eventualmente addizionata con 1 – 2 gocce di ammoniaca. Per scolorire il citoplasma, lavare con una debole soluzione di carbonato di litio per circa 10 minuti.

Lavare ancora, disidratare (vedi oltre), ecc.

- 2^a ricetta – Ematossilina ferrica di Heidenhain

La procedura seguente è solo una traccia, visto che ogni specialista ne propone una diversa, e comunque è adatta solo per sezioni sottili.

Il pezzo fissato e sezionato, portato all'acqua, va "mordenzato" con allume di ferro (solfato ammonico ferrico) in cristalli violetti⁶. Sciogliere l'allume in acqua al 2 – 4% poco prima dell'uso e tenervi l'oggetto per 1 – 3 ore. Lavare sotto il rubinetto per 5 minuti, ma deve trattarsi di acqua non troppo "dura". Alla fine, lavare in acqua distillata.

Sciogliere il colorante in acqua al 0,5% e lasciar maturare per qualche giorno. Mettervi l'oggetto per circa 24 ore. Lavare in acqua di rubinetto per 2 – 3 ore. Differenziare in una soluzione di allume ferrico⁷ al 2% per un tempo che dipende da molti fattori e soprattutto dal tipo di materiale. Occorre controllare il vetrino sotto al microscopio ogni pochi minuti finché i nuclei delle cellule sono ben differenziati e appaiono di color grigio scuro. Proteggere il microscopio dalla soluzione di allume, che ha proprietà corrosive.

Lavare in acqua di rubinetto per un'ora circa. Disidratare e "montare" (vedi oltre).

3.2.2 -- Colorazioni miste

Si tratta di processi in cui si usano, simultaneamente o in momenti diversi, due o tre coloranti, ognuno con affinità specifiche per componenti diverse dell'oggetto.

⁵ Pronuncia "zil".

⁶ Quelli che appaiono giallastri vanno scartati.

⁷ Non dovrebbe essere la stessa soluzione usata per la mordenzatura.

Le ricette sono innumerevoli. Ne citiamo alcune, le più adatte a materiali vegetali.

••• Ematossilina ferrica e Bruno di Bismark.

È adatta a colorare il floema (libro). Le sezioni di materiale fissato vanno poste a mordenzare in allume ferrico sciolto in acqua al 2% e vi si lasciano 10 minuti, o fino a 20 minuti se il materiale è fresco. Lavare almeno cinque volte in acqua distillata. Aggiungere all'ultimo lavaggio due o tre gocce di una soluzione di ematossilina in acqua al 1%. Sorvegliando al microscopio, si può arrestare la colorazione al punto giusto. Lavare due o tre volte in acqua.

Mettere le fette in Bruno Bismark al 1% in acqua, per due o tre ore. Lavare in acqua. Disidratare, ecc.

Le varie parti del tessuto si colorano dal rosso al giallo, bruno, fino al blu.

••• Ematossilina ferrica e safranina.

È utile per gli oggetti fissati in liquidi contenenti acido picrico o cromico e differenzia bene i componenti dei nuclei.

Mordenzare in allume ferrico al 3% per due o tre ore. Lavare in acqua corrente e poi in acqua distillata.

Colorare in una soluzione così preparata: sciogliere i cristalli di ematossilina al 10% in alcool assoluto. Al momento dell'uso, diluire questa soluzione madre in acqua al 10%. Lasciarvi i pezzi per due o tre ore.

Differenziare e decolorare in allume ferrico al 3% sorvegliando di frequente al microscopio. Si passano i pezzi nell'acqua per il lavaggio quando i nucleoli sono diventati chiari. Lavare in acqua corrente per almeno un'ora.

Colorare poi in una qualunque soluzione di safranina del commercio; la colorazione deve durare 12 – 15 ore.

Differenziare rapidamente in alcool a 70° acidificato con poche gocce di acido cloridrico.

••• Tripla colorazione di Cooper.

Si tratta di una colorazione "citologica" (per i tessuti nel loro complesso) che però è adatta anche per il contenuto nucleare ed i cromosomi.

Si tratta di una successione di tre passaggi:

- verde di metile in acqua al 1% per un'ora; il colorante deve essere fresco;

- fucsina acida in acqua al 1% per un minuto;

- eritrosina B in acqua al 1% per due o tre secondi.

••• Colorazione delle pareti lignificate e suberificate secondo Pésez.

- Mettere i pezzi per qualche minuto in una soluzione d'ipoclorito di sodio o di potassio così ottenuta: - carbonato di sodio al 5% in acqua: 100 g – ipoclorito di calcio al 20% in acqua: 15 g; mescolare e far riposare; decantare o filtrare.

- Lavare in acqua corrente o acidificata con acido acetico.

- Colorare per 20 – 30 minuti in verde iodio all'1%.

- Passare per qualche secondo in acido cloridrico al 50%.

- Lavare a lungo in acqua resa basica con l'aggiunta di poche gocce di ammoniacca.

- Lavare bene in acqua.

- Colorare con Rosso Congo sciolto in ammoniacca al 5%. Lavare.

Disidratare oppure montare in gelatina glicerinata (§ 10.2).

••• Colorazione di contrasto sec. Coupin (nuclei in verde, citoplasma in rosso)

Si confezioni la seguente miscela: -- verde di metile sciolto in acqua al 1%: 60 g – eosina acqua in soluzione acquosa al 1%: 1 g – Alcool a 95°: 40 g.

Mettere i pezzi in questa miscela per 15 minuti. Lavare in acqua per almeno 5 minuti; eventualmente disidratare e montare.

4 -- RISCHIARAMENTO o CHIARIFICAZIONE

Per oggetti non molto sottili o comunque diffondenti l'esame può risultare difficile. Si pensi ad es. ad un truciolo di legno. Conviene quindi aumentarne la trasparenza.

Per ottenere ciò, si può immergere l'oggetto in uno dei seguenti liquidi:

-- soluzione diluita di varechina;

-- **liquido glicerinato**: Glicerina, una parte; -- Alcool a 90°, una parte; -- acqua distillata, una parte; aggiungere alcune gocce di acido fenico;

-- lattofenolo (§ 3.2.1);

-- xilolo, da usarsi su oggetti ben disidratati, pena la formazione di aree lattiginose dove l'acqua residua si emulsiona e, col tempo, altera l'oggetto;

-- olio di cedro, con le stesse limitazioni viste nel caso dello xilolo.

Questi liquidi agiscono più in fretta a caldo, ma nel caso dello xilolo e dell'olio di cedro occorre agire a freddo. In ogni caso, occorre sorvegliare il processo a piccolo ingrandimento per evitare un'azione troppo energica. Lo xilolo, per es., rende friabili molti oggetti.

5 -- DISIDRATAZIONE

Gli esseri viventi sono sempre assai ricchi d'acqua e, ponendoli in un reagente (fissativo, colorante, ecc.) costituito da una soluzione acquosa isotonica⁸, non nascono molti problemi. Ciò vale in particolare per frammenti o fettine di organi o tessuti.

Se però si passa l'oggetto impregnato d'acqua in un materiale idrorepellente (xilolo, balsamo del Canada, ecc.), l'acqua residua che rimane nell'oggetto si emulsiona, tende ad opacizzarlo e, col tempo, ad alterarlo. Occorre toglierla.

Nel caso poi in cui l'oggetto "in acqua" passa in un liquido che non è acqua ma è miscibile con l'acqua, (molte soluzioni fissatrici e coloranti contengono glicerina, alcool, ecc.), allora può capitare che l'oggetto si contragga e si deformi.

Nel secondo e terzo caso, basta passare l'oggetto dalla soluzione acquosa ad una serie di liquidi intermedi, contenenti una percentuale crescente del nuovo solvente e decrescente di acqua. Classica la "**serie degli alcool**", costituita da una serie di soluzioni acqua-alcool a gradazione crescente, per es. 50°, 80°, 95°, fino all'alcool assoluto. Si tratta insomma di evitare salti bruschi di concentrazione. Ogni passaggio in uno dei termini della serie degli alcool può durare da molti minuti a due ore, in relazione al tipo di oggetto ed alle sue dimensioni.

Nel secondo caso (passaggio diretto in liquidi idrorepellenti), occorre togliere del tutto l'acqua, cioè "disidratare" a fondo.

Abbiamo già parlato dell'alcool fra i fissativi. Supponiamo di passare l'oggetto che si trova in soluzione acquosa in una serie di alcool a concentrazione crescente, per es. quella illustrata sopra (1 – 2 ore per ogni passaggio). A questo punto, per togliere completamente il residuo d'acqua, occorre un alcool puro, anidro, "assoluto" (vedi il § 3.1.3) capace di terminare la serie. Il passaggio in alcool assoluto va ripetuto due o tre volte.

Abbiamo già detto come sia difficile conservare l'alcool assoluto e come quello commerciale, reperibile nei negozi di prodotti chimici, sia costosissimo. Conviene allora fabbricarlo da soli.

Si parte da quello a 90 – 95°, anche quello per liquori, e lo si rende anidro gettandovi del materiale insolubile in alcool, ma fortemente igroscopico. Si usa di solito il solfato di rame

⁸ Isotonico = con la stessa pressione osmotica, quella pressione che spinge un solvente a traversare l'eventuale membrana semipermeabile che separa due soluzioni di diversa composizione.

puro che va polverizzato (la polvere è bluastra) e poi scaldato (“calcinato”) su una piastra metallica con una fiamma sotto, finché diventa del tutto bianco. La polvere bianca va posta sul fondo di una bottiglia e la si ricopre con alcool a 90-95°. La polvere ritornerà blu poiché assorbe tutta l’acqua che può. Occorreranno due o tre passaggi affinché la polvere rimanga stabilmente bianca. L’ultimo passaggio può essere sostituito dalla semplice aggiunta di altra polvere bianca.

Per migliorarne la tenuta, il tappo della bottiglia può essere spalmato di vaselina ma, nonostante tutti gli accorgimenti, la polvere bianca col tempo ritornerà azzurra e bisognerà ricominciare il processo ripartendo dal solfato calcinato e bianco.

Quando si toglie un oggetto dalla serie degli alcool e lo si porta in liquidi idrorepellenti come lo xilolo, può darsi che ricompaia un certa opacizzazione. Ciò significa che l’acqua non è stata del tutto eliminata ed occorre ripetere il passaggio in alcool assoluto.

Per porre rimedio ad una disidratazione incompleta, si può applicare un altro piccolo trucco: se si prevede un “montaggio” (§ 10) in balsamo del Canada, conviene sciogliere il balsamo in cloroformio invece che in xilolo; una traccia residua di acqua non crea allora problemi.

Ogni passaggio nella serie degli alcool dovrebbe contemplare due o tre ripetizioni per ogni passaggio, specie per l’ultimo. Come si è detto, l’oggetto porta sempre con sé un residuo di acqua e diminuisce la gradazione del nuovo termine della serie in cui viene trasportato. Ogni termine della serie dovrebbe quindi contemplare 2 – 3 recipienti contenenti inizialmente lo stesso reagente, il primo dei quali però subisce presto una riduzione della gradazione.

Questo aumento del numero dei recipienti comporta però un largo impiego di reagente.

A questo punto, invece di impiegare i classici tubi per vetrini a grande capacità (fig. 4 a sinistra), si può mettere l’oggetto, non ancora sezionato, in una piccola provetta a fondo piatto (fig. 3) e lì, a furia di contagocce, sostituire il liquido volta per volta con un consumo di poche gocce e toglierlo aspirandolo alla fine del passaggio.

Come disidratante, è utile anche l’alcool isopropilico, che può sostituire l’alcool comune (“etilico”), tranne che come fissativo, ed indurisce meno gli oggetti. Anche più economico è l’alcool butirrico terziario. Da esso si può passare direttamente l’oggetto alla paraffina fusa per l’eventuale inclusione (vedi oltre).

6 -- MACERAZIONE e DISSOCIAZIONE

Certi tessuti si studiano meglio se gli elementi cellulari vengono separati l’uno dall’altro. Con questa separazione si evita il sezionamento, ma naturalmente vanno perduti la struttura generale del tessuto, così come i rapporti geometrici fra le varie cellule.

La dissociazione del tessuto si può ottenere con mezzi meccanici: si pone l’oggetto su un porta-oggetti o un vetro d’orologio (fig. 2 B), magari immerso in acqua o nel fissativo prescelto. Si lavora sotto al microscopio stereoscopico e si cerca di smembrare l’oggetto in parti più fini possibile utilizzando due aghi montati su un manico di legno o di plastica (“aghi manicati”).

La dissociazione si può ottenere con mezzi chimici, e si parla allora di **macerazione**.

Nel caso dei tessuti vegetali, occorre decomporre la “lamella mediana” che tiene unite le cellule in quanto s’interpone nello spazio virtuale fra le pareti.

Per le foglie ed i fusti erbacei conviene effettuare prima una dissociazione meccanica su un porta-oggetti; poi si immerge l’oggetto in glicerina addizionata di iodio. Si copre il tutto con una lamella e si pone una goccia di acido solforico sul bordo, in modo che l’acido penetri lentamente per diffusione.

Per conservare il preparato occorre poi un energico “lavaggio” (§ 7).

Un metodo più energico (“di Jeffrey”) si applica alle sezioni non troppo sottili, cioè con spessore di 0,3 – 0,4 mm, fatte a mano. Si verifichi l’assenza di bolle d’aria (per eliminarle, basta scaldare il materiale fino all’ebollizione e poi lasciarlo raffreddare; si può ripetere l’operazione più volte).

A questo punto, trasportare il materiale per circa 24 ore in una miscela di acido nitrico ed acido cromico in parti uguali, entrambi in soluzione acquosa al 10%. Lavare a lungo e terminare la dissociazione con gli aghi.

Dopo questo trattamento, si può colorare, per es. con safranina (soluzione acquosa al 1%, durata della colorazione: 6 ore), e poi lavare di nuovo.

Questa procedura si applica anche a materiale seccato.

7 -- LAVAGGIO

Dopo che un reagente ha svolto la sua azione su un oggetto, è generalmente necessario eliminarlo, sia per evitare che questa azione si prolunghi troppo e danneggi l’oggetto, sia perché i residui potrebbero interagire con i reagenti successivi, sia per evitare la formazione di precipitati.

Il lavaggio più ovvio va eseguito nello stesso solvente usato per sciogliere il reagente appena utilizzato, spesso acqua od alcool.

A volte si richiede un lavaggio in una soluzione in grado di agire chimicamente sul reagente precedente al fine di neutralizzarlo del tutto. Ciò vale soprattutto con reagenti a carattere fortemente basico o acido.

Il liquido di lavaggio deve essere abbondante, possibilmente smosso di continuo, o con un agitatore elettrico, o a mano. Eventualmente, sostituirlo più volte con liquido fresco.

Nel caso di alcool, la sua concentrazione (o “gradazione”) deve essere la stessa della soluzione precedente.

I reagenti contenenti acido picrico vanno sempre lavati con alcool.

Il problema del lavaggio è semplice quando si ha a che fare con fette aderenti ad un vetrino poiché le fette non vanno perse. In caso di oggetti piccoli e dispersi, si può richiuderli in un sacchetto di tela da bomboniere o un retino “da plancton”, oppure ricorrere alla reticella metallica già descritta nel § 1 e nella fig. 1. Se le maglie sono della giusta dimensione, gli oggetti chiusi nel retino potranno passare da un liquido all’altro senza disperdersi.

In casi estremi (diatomee, radiolari ed altri microrganismi molto piccoli), si può ricorrere alla decantazione: aspettare che gli oggetti si depositino sul fondo e poi versare con cautela il liquido sovrastante. L’operazione è più rapida se si dispone di una centrifuga.

Si può evitare la decantazione, ed il conseguente rischio di perdite del materiale, aspirando il deposito con una pipetta poggiata sul fondo del recipiente.

8 -- LA SEZIONE

La macerazione e la dissociazione ci offrono la possibilità di esaminare cellule isolate o piccoli gruppi di esse. L’osservazione in episcopia consente di osservare la superficie di oggetti (opachi o trasparenti) di grandi dimensioni, senza sezionarli (vedi l’art. n° 8, “L’osservazione in episcopia nel campo delle scienze naturali”, nella serie “Approfondimenti di microscopia ottica”, in questo sito). Ma spesso occorre studiare gli oggetti in “sezioni sottili”, cioè fette abbastanza sottili da consentire l’osservazione per trasparenza su buona parte del loro spessore.

Si ricordi a questo proposito che la profondità di fuoco di un obiettivo da microscopio va

da 0,5 μ a qualche decina di micron, a seconda dell'apertura dell'obbiettivo, per cui lo spessore ideale di una sezione sottile sarebbe di pochi micron. Con le tecniche di sezione più comuni però è difficile scendere al di sotto di 5 μ , tramite l'uso del microtomo, o al di sotto di 30 – 50 μ con sezione a mano.

Se il tessuto da sezionare possiede delle strutture allungate, come fibre di ogni genere, è bene eseguire una sezione perpendicolarmente alle fibre ed una parallelamente. Meglio ancora se la sezione parallela è duplice: una secondo un piano che passa per il centro dell'organo (sezione radiale), l'altra che passa per la periferia (sezione tangenziale).

8.1 - SEZIONI A MANO

Si può sezionare un oggetto semplicemente impugnando una lama affilata, purché esso sia abbastanza consistente da non piegarsi sotto la lama, purché non presenti un'alternanza di parti dure e molli e purché non si pretenda uno spessore inferiore a circa 30 μ .

L'oggetto non deve neppure essere troppo coerente poiché rischierebbe di frantumarsi al contatto colla lama.

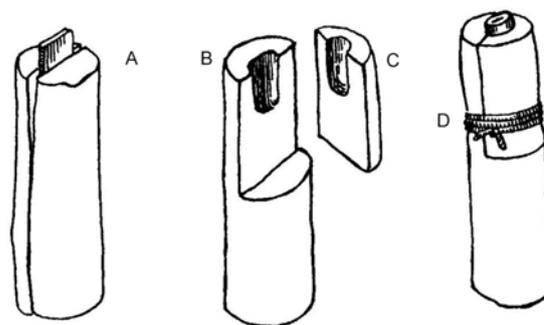
Per fortuna, molti tessuti ed organi vegetali (di quelli ci occupiamo) sono sufficientemente consistenti già allo stato fresco o possono essere induriti con un bagno in alcool a 95° (dopo un primo passaggio in alcool a 70 – 80°).

Se il materiale deve essere conservato per un certo tempo prima del sezionamento, senza che indurisca troppo, si può immergerlo nel "liquido glicerinato", già descritto nel § 4, pag. 8. Per evitare putrefazioni, aggiungere al liquido una goccia di acido fenico sciolto preventivamente in acqua. Si ricordi però che anche il liquido glicerinato tende col tempo ad indurire gli oggetti di natura vegetale.

Il maggior problema della sezione a mano sta nel fissare l'oggetto ed evitarne il piegamento sotto la pressione della lama. Conviene in genere alloggiare l'oggetto in una piccola cavità ricavata da un materiale semirigido come il sughero, il polistirolo espanso (possibilmente del tipo "ad alta densità"), un pezzo di carota o delle grosse foglie carnose del finocchio; ma il materiale più usato è il midollo ricavabile dai grossi fusti di sambuco⁹.

Questi materiali vanno preparati: se l'oggetto è laminare (foglia, fronda, certi licheni), lo si serra fra le superfici piane di due blocchetti di midollo di sambuco (fig. 5 A). Se l'oggetto è cilindrico (un fusto, ad es.), si parte da un pezzo di midollo inciso, in cui si è ricavata una fossetta delle dimensioni dell'oggetto (fig. 5, B), e lo si accosta ad un pezzo piano o incavato capace di serrare l'oggetto stesso (fig. 5, C).

Fig. 5 – Come si prepara un blocchetto "fissa-oggetti" in midollo di sambuco; in A per il caso di oggetti laminari; in B il blocchetto preparato per un oggetto cilindrico; in D il blocchetto montato e serrato con un filo avvolto in più giri.



Il blocchetto ben serrato (fig. 5, D) può essere tenuto con una mano ed affettato, assieme all'oggetto, tenendo la lama con l'altra mano.

⁹ Molti esperti lamentano l'eccessiva deformabilità di questo midollo, specialmente quando lo si bagna; molto dipende dalla pianta madre e dalla sua età. Occorre procedere per tentativi.

Piuttosto che tentare subito una sezione sottile di spessore uniforme, è bene contentarsi di una fettina cuneiforme, di cui si può sempre osservare il lato più sottile. Ovviamente, tutte queste operazioni si compiono meglio sotto un microscopio stereoscopico a basso ingrandimento.

La lama deve essere ben affilata ed esente da dentellature. L'affilatura della lama è un'operazione delicata ed è ben descritta nei manuali di tecnica microscopica citati in bibliografia, ma è altamente consigliabile rivolgersi ad un artigiano esperto.

È bene che almeno una delle facce della lama sia piana (vedi anche il § 13.9.1).

L'oggetto e la lama debbono essere sempre bagnati di acqua o, meglio, di alcool a 70°. C'è chi consiglia l'alcool a 95° mescolato in parti uguali con glicerina. È utile impregnare di alcool anche il midollo di sambuco o il polistirolo.

La lama va fatta scorrere obliquamente sull'oggetto in modo da sfruttare tutta la lunghezza del filo, come si farebbe con una sega.

Le fette vanno prelevate dalla superficie libera della lama con un pennellino morbido bagnato collo stesso liquido che bagna la lama.

Se la fetta tende ad incurvarsi, si può tenerla compressa per qualche minuto col pennellino.

Per ulteriori trattamenti (eventuale fissazione, colorazione, ecc.), le fette possono essere manipolate tenendole in fondo ad una gabbietta di reticella o in fondo ad una provetta, come già descritto. Se si opera in un recipiente aperto, come un vetro d'orologio, i vari reagenti possono essere aggiunti o eliminati con un contagocce. Eventuali passaggi in xilolo devono essere rapidi poiché le fette tendono ad arricciarsi, indurire e rompersi.

Se l'oggetto è disseccato, o comunque troppo duro, si può provare a rammollirlo con una breve ebollizione in acqua di rubinetto. Può essere utile impregnare prima l'oggetto con alcool, per pochi minuti, e ciò favorisce l'uscita dell'aria. Se non si ha fretta, si può rammollire un oggetto secco ponendolo nel liquido glicerinato per un tempo da 1 a 6 settimane.

8.2 - IL MICROTOMO DI RANVIER

A mano libera è difficile ottenere fette di spessore adeguato per molti casi. Uno strumento in grado di trattenere l'oggetto e guidare la lama è il microtomo.

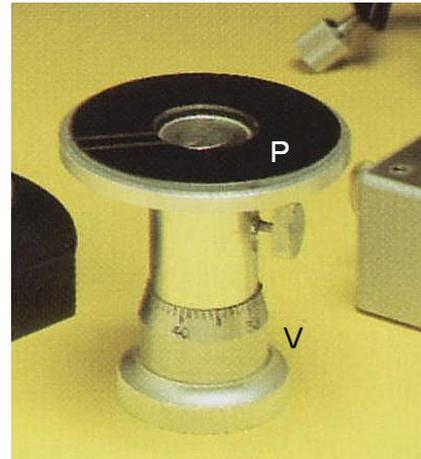
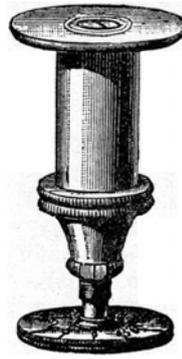
Il modello più semplice, di costo ridotto e di costruzione semplice (può essere anche auto-costruito con un po' di attrezzatura meccanica) è quello "di Ranvier" (fig. 6) in cui un disco serve a far scorrere la lama ad un'altezza definita, mentre il cilindro inferiore, perpendicolare al disco, serve da manico ma guida anche l'oggetto poiché è cavo e contiene un piccolo pistone che può scendere o salire per l'azione di una vite che sporge in basso.

La vite è a passo fine e consente la salita dell'oggetto con molta gradualità.

Il cilindro di midollo già visto in fig. 5, contenente l'oggetto in stato di compressione, viene infilato a forza all'interno del cilindro (il pistone sarà stato preventivamente abbassato ruotando la vite in senso anti-orario). Immergendo il tutto in alcool debole, il midollo si gonfia e stringe meglio l'oggetto. Certi apparecchi di questo genere mostrano internamente al cilindro una piccola pinza manovrabile con una vite laterale, dedicata al fissaggio dell'oggetto o del blocchetto, anche se più piccoli del diametro del pistone.

Fig. 6 – Il microtomo di Ranvier in una graziosa incisione di un secolo fa ed in una versione moderna. La vite in basso (V) termina con un tamburo graduato che consente di impostare avanzamenti controllati del pistone interno e quindi dell'oggetto.

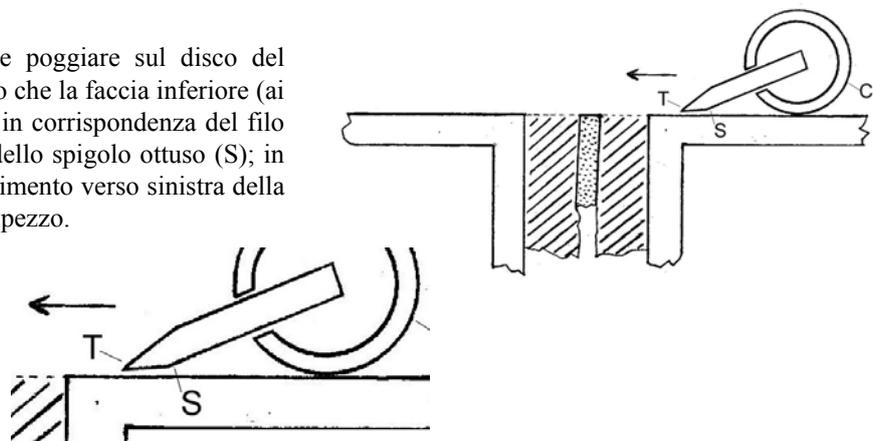
Il disco superiore (P) serve a farvi strisciare la lama e quindi a guidarne il movimento secondo un piano definito.



Il microtomo di Ranvier dà buoni risultati se sono verificate alcune condizioni:

- il midollo di sambuco è secco e compatto; altrimenti è bene sostituirlo con polistirolo espanso ad alta densità;
- lama, pezzo e disco siano bagnati di alcool debole o liquidi simili in modo che le fette galleggino su un velo liquido;
- la lama avanza obliquamente, in modo da utilizzare la massima lunghezza possibile della lama stessa;
- la superficie del disco è ben piana, e quindi il movimento della lama è regolare;
- la lama stessa è ben affilata;
- la lama poggia sul disco in modo che la “faccia di taglio” inferiore (faccia T-S in fig. 7) non tocchi il disco o vi sia al massimo parallela.

Fig. 7 – La lama deve poggiare sul disco del microtomo di Ranvier in modo che la faccia inferiore (ai lati del taglio) tocchi il disco in corrispondenza del filo (T) e non in corrispondenza dello spigolo ottuso (S); in caso contrario, durante il movimento verso sinistra della lama, lo spigolo S schiaccia il pezzo.



La rotazione della vite inferiore spinge il pezzo verso l'alto e consente avanzamenti del pezzo molto fini ma, con materiale fresco, non incluso, è difficile ottenere spessori di fetta inferiori a 20 μ .

La lama da usare può essere quella di un rasoio da barbiere, purché lunga almeno 10 cm, ma essa va munita di una costola (vedi l'anello C nella figura 7) per darle l'inclinazione opportuna ed evitare lo schiacciamento del pezzo, come appena detto. La “costola” può essere ottenuta da un tubetto in plastica in cui si ricava con la sega un taglio in grado di alloggiare il dorso della lama.

8.3 - MICROTOMI A LAMA GUIDATA

Si tratta di strumenti professionali, pesanti e costosi, in cui i movimenti della lama e dell'oggetto sono regolari e controllabili. A volte, la lama è immobile e si muove solo

l'oggetto.

Impossibile descrivere tutti i modelli finora costruiti. Anche le classiche lame di forte spessore (§ 13.9.1 e 13.9.2) sono speciali e costose. Oggi però sono in commercio lame “usa e getta” di costo inferiore.

Questi microtomi possono servire per sezioni a fresco, ma sono in genere adibiti al taglio di oggetto “inclusi” in paraffina, celloidina o altri materiali che impregnano e danno consistenza all'oggetto (vedi il § 9). Se l'oggetto è ben preparato, questi microtomi consentono di eseguire fette di spessore fino a 5 μ .

Non entriamo nei dettagli poiché si tratta di tecniche difficilmente accessibili ad un privato ed inoltre poiché tali tecniche sono state ampiamente elaborate per l'istologia animale e quindi sono accuratamente descritte nei manuali citati in bibliografia.

9 -- INCLUSIONE

Come appena detto, l'esecuzione di sezioni di spessore inferiore a circa 30 μ (le cosiddette “sezioni sottili”) richiede l'impregnazione dell'oggetto in un materiale indurente e l'uso di un microtomo a lama guidata.

Poiché l'inclusione è mirata soprattutto al confezionamento di preparati permanenti, si presuppone che l'oggetto sia sempre piccolo per facilitare la penetrazione del mezzo d'inclusione e che sia stato preventivamente fissato ed eventualmente colorato “*in toto*”. La colorazione si può poi eseguire anche, o solamente, sulle fette.

I materiali adatti all'inclusione sono, in ordine decrescente d'importanza, la paraffina, la celloidina, e varie resine epossidiche.

Durante una serie di tagli consecutivi, le fette possono rimanere incollate l'una all'altra per un lato, in modo da costituire un “nastro”. I pezzi di nastro, se disposti ordinatamente su un porta-oggetti, mostrano sezioni contigue dell'oggetto e consentono di studiarlo nell'intero suo spessore in modo da poterne valutare la struttura nello spazio.

L'adesione delle fette al vetrino si ottiene con semplici mezzi, come un velo di albumina ben diluita in acqua o, meglio, di “**albumina glicerinata**” di Meyer, costituita da un miscuglio omogeneo in parti uguali di albume d'uovo e di glicerina filtrata. Dopo aver ben mescolato, aggiungere un cristallo di timolo o di canfora per evitare la formazione di muffe.

Anche su quest'argomento sorvoliamo, poiché la tecnica da usare in campo botanico è la stessa usata per i tessuti animali e tutti i dettagli si trovano nell'articolo “I preparati microscopici” di M. Brusadin (in questo sito) e nella letteratura citata in bibliografia.

C'è da dire che, ovviamente, l'inclusione precede la sezione, generalmente con microtomo a lama guidata, e presuppone una serie di passaggi preventivi (disidratazione, impregnazione con xilolo, per es.) e consecutivi (sparaffinamento, idratazione, ecc.). Tutto ciò presuppone una buona quantità di reagenti e di vetreria, più alcuni apparecchi particolari, per lo meno una stufetta termostatica per l'impregnazione in paraffina, che va usata allo stato fuso.

Difficilmente quindi un dilettante troverà i mezzi economici, lo spazio ed il tempo per tutto ciò.

10 -- MONTAGGIO

Per il confezionamento di un preparato permanente esiste dunque una serie quasi obbligatoria di passaggi, che abbiamo sommariamente descritto e che qui riassumiamo, mettendo fra parentesi quelli non fondamentali:

-- fissazione – lavaggio – (rischiamento e lavaggio) – (macerazione / dissociazione e

lavaggio) – (colorazione “*in toto*” e lavaggio) – disidratazione – passaggio in xilolo – inclusione – sezionamento – sparaffinamento – idratazione – colorazione delle fette e lavaggio – disidratazione.

A questo punto, l’oggetto va “montato”, cioè racchiuso fra i due classici “vetrini” (porta-oggetti e copri-oggetti o lamella), che sono lamine di vetro a facce piane e parallele, di spessore standardizzato ($1\text{ mm} \pm 0,1$ e, rispettivamente, $0,17\text{ mm} \pm 0,01$).

Se l’oggetto è globoso (*Volvox*, *Noctiluca*, piccoli insetti, ecc.) si può ricorrere ai porta-oggetti speciali, di forte spessore, che portano al centro uno o due piccoli incavi, del diametro di 10 – 15 mm.

Ma, dopo aver racchiuso l’oggetto fra i due vetrini, nascono due problemi:

1) i due vetrini devono essere meccanicamente fissati fra loro in modo da creare una sottile cavità in cui l’oggetto rimane protetto dagli urti, dal disseccamento, dalla polvere, ecc. Il fissaggio può essere ottenuto con un cordone di apposito adesivo che segue l’orlo della lamella e la sigilla sul porta-oggetti; e questa operazione si chiama “lutazione” (vedi subito sotto). Oppure il fissaggio fra i due vetrini è affidato ad un liquido in cui viene immerso l’oggetto, liquido destinato ad indurire in breve tempo.

2) Un oggetto immerso in aria produce forti contrasti a causa della differenza d’indice di rifrazione fra oggetto ed aria; tranne casi particolari (pollini, spore, fibre, scaglie delle ali di farfalle, ecc.), l’oggetto viene quindi osservato immerso in un liquido con un indice simile a quello del vetro. Questo liquido può rimanere liquido a tempo indeterminato, ed allora si ricorre alla lutazione per fissare fra loro i due vetrini; oppure tende ad indurire, ed allora la lutazione diviene inutile.

Vediamo qualche dettaglio.

10.1 – LIQUIDI DI MONTAGGIO NON INDURENTI - LA LUTAZIONE

Il montaggio si effettua in un liquido capace di conservare l’oggetto e la sua colorazione per il tempo più lungo possibile.

Come già accennato, c’è il liquido che indurisce col tempo e quello (a base di glicerina, lattofenolo e simili) che non indurisce. In questo secondo caso, per evitare che il liquido coli via e la lamella si stacchi, occorre fissare fra loro i due vetrini con un materiale adesivo, quello che abbiamo chiamato “luto”.

Le sue proprietà devono essere: -- aderire al vetro a tempo indeterminato – avere una viscosità sufficiente ad impedirgli di infiltrarsi fra i due vetrini -- non interagire col liquido di montaggio – non possedere una reazione basica né acida -- impedire la fuoruscita e l’evaporazione del liquido – essere trasparente e privo di colore proprio – conservare queste proprietà a tempo indeterminato.

Il luto va posto a cavallo del perimetro della lamella ed in quella zona i due vetrini devono essere puliti ed asciutti.

I prodotti proposti per la **lutazione** sono vari:

-- luto di Apathy: -- paraffina titolata a 60° : una parte; -- balsamo del Canada indurito: una parte. Scaldare circa a 70° C e rimescolare i due componenti. Applicare a caldo.

-- Cemento nero di Tempère: sciogliere il nero d’anilina in alcool a 95° fino a saturazione. Filtrare. Aggiungere il 3% di olio di ricino. In un recipiente metallico, porre della lacca fino ad un terzo dell’altezza; ricoprirla di alcool e porre il recipiente a bagno Maria a 80° C , rimstando fino alla dissoluzione della lacca. Filtrare con una tela fine. Se il miscuglio tende ad indurire, aggiungere un po’ d’alcool mescolando bene.

Applicare sull’orlo della lamella con una bacchetta ed un pennellino.

-- Gommalacca sciolta in alcool;

-- balsamo del Canada sciolto in xilolo;

-- vernici cellulosiche del tipo “copale”, rinvenibili sul mercato sotto innumerevoli forme; lasciarle evaporare fino ad una consistenza sciropposa;

-- adesivi semi-liquidi del tipo “Bostic superchiaro”, che però tendono ad infiltrarsi fra i due vetrini.

Gli ultimi citati sono prodotti commerciali, economici e facili da reperire, ma occorre sperimentarli, poiché non hanno sempre una composizione definita.

Alcuni liquidi di montaggio sono a base di acqua; essi possono conservare meglio certe strutture delicate e certi colori, ma difficilmente il preparato si mantiene a lungo. Ecco i più usati:

-- acqua formolata (formolo commerciale diluito al 5 – 10%);

-- liquido glicerinato (§ 4, pag. 8);

-- glicerina pura, che è miscibile con l’acqua;

-- lattofenolo, per preparati di non lunga durata (§ 3.2.1).

Il Laporte consiglia come montante il cloralfenolo poiché è miscibile col balsamo, senza disidratazione: -- idrato di cloralio cristallizzato, due parti; -- fenolo puro, una parte. Sciogliere a moderata temperatura.

Con questi liquidi, la lutazione deve essere perfetta.

10.2 -- LIQUIDI DI MONTAGGIO INDURENTI

Ovviamente, se il liquido di montaggio tende ad indurire, può rendere inutile la lutazione.

•• Come via di mezzo fra i liquidi indurenti e non, è molto usata la **gelatina glicerinata**, o glicerina gelatinata; essa diviene solida col raffreddamento ma, contenendo acqua, richiede ancora la lutazione.

Essa presenta delle difficoltà di preparazione e conviene acquistarla già fatta. A freddo è solida; per l’uso, conviene fonderla a bagno Maria e poi filtrarla.

Volendola preparare, ecco la ricetta, secondo Kaiser e Courteville:

-- glicerina: 52 g; -- gelatina: almeno 8 g; -- acqua distillata: 35 – 40 g; -- fenolo puro: 0,5 g.

È meglio che gli oggetti da montare in questo liquido siano stati prima trattati con lattofenolo (§ 3.2.1) o glicerina. Se vengono dal lattofenolo, conviene aspettare che l’acqua di questo miscuglio evapori e così l’oggetto rimane in glicerina quasi pura, evitando di deformarsi.

Poi si scalda la gelatina glicerinata a bagno Maria in modo da evitare l’ebollizione; in caso contrario, si formerebbero delle bolle di gas che non spariscono più.

Si prende con una bacchetta una goccia del liquido e la si depone sul porta-oggetti preventivamente scaldato. L’oggetto va deposto sulla goccia. Se la goccia diventa troppo vischiosa, scaldare ancora il vetrino sulla fiamma: va bene un lumino ad alcool o un becco Bunsen; evitare le candele poiché producono nerofumo.

Si prenda una lamella ben pulita con le pinzette, la si scaldi sulla fiamma e la si poggia obliquamente sulla goccia di gelatina (fig. 8). Se la gelatina non si spande bene fra i due vetrini, scaldare ancora, ma con molta prudenza, sempre per evitare la formazione di bolle. Un piccolo peso (un bullone 6 × 30, ad es.) poggiato sulla lamella può aiutare il processo.

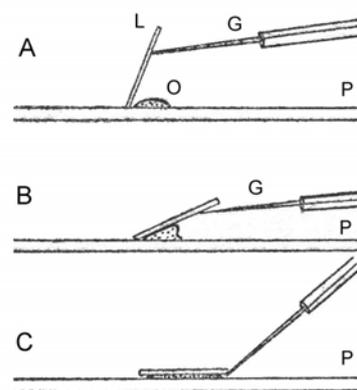
Se la gelatina deborda dalla lamella, aspettare che si raffreddi bene; poi, con uno spazzolino e sotto il rubinetto dell’acqua fredda, si tolga l’eccesso, si asciughi con un panno

imbibito di alcool e si applichi il luto.

Con questo montaggio, molte colorazioni scompaiono col tempo.

Fig. 8 – Come si poggia la lamella (L) sul liquido di montaggio in modo da evitare la formazione di bolle d'aria, che sarebbe poi impossibile eliminare. Un ago manicato (G) sostiene la lamella in modo che il contatto col liquido avvenga gradualmente, mentre la goccia assume forma di cuneo (in B).

P è il porta-oggetti. O è la goccia di liquido di montaggio contenente l'oggetto.



•• Laporte consiglia una soluzione di gomma arabica e glicerina: sciogliere la gomma in acqua calda, magari rimescolando; poi filtrare. A due parti di questa soluzione aggiungere una parte di glicerina; infine, qualche cristallo di timolo o canfora.

Questo miscuglio si usa a freddo ed accoglie oggetti senza disidratazione. Dopo qualche settimana indurisce, ma è meglio lutare anche questo poiché può assorbire umidità e guastarsi.

Altro caso intermedio fra preparato temporaneo e permanente è dato dallo “**sciroppo di Apathy**”:

-- sciogliere 15 g di gomma arabica in 8 g di acqua distillata; -- sciogliere 15 g di zucchero di canna (non candito) in altri 8 g d'acqua; -- mescolare le due soluzioni ed aggiungere un cristallo di timolo.

Questo liquido indurisce sui bordi della lamella, per cui la lutazione può essere omessa.

I liquidi indurenti più comuni sono resine naturali ed artificiali solubili in xilolo. Esse sono incompatibili con l'acqua e perciò gli oggetti che esse accolgono devono essere ben disidratati.

In genere, esse hanno lo stesso indice di rifrazione del vetro e, impregnando l'oggetto, lo rendono quasi invisibile, salvo che non sia stato colorato prima. Solo in casi particolari (diatomee, radiolari, ecc.) si usano liquidi di montaggio con indice superiore a quello del vetro.

Il nome generico è “balsamo del Canada”, ma il vero “balsamo”, definito commercialmente “naturale”, è un prodotto della purificazione della trementina o resina di alcune conifere nordamericane (*Abies balsamea*, *Abies canadensis*, ecc). Allo stato naturale è vischioso e sciropposo (ed indurisce lentamente), ma spesso in commercio se ne trova una versione solida da allungare con xilolo che indurisce in poche ore o pochi giorni.

Il prodotto naturale ha alcuni vantaggi: aderisce al vetro come nessun altro, a tempo indefinito. Si consolida sui bordi della lamella senza ritirarsi troppo, mentre al centro rimane liquido per anni. Se l'oggetto non s'immerge bene, basta scaldare il vetrino.

Ma molti prodotti venduti come “balsamo del Canada” sono solo misture varie di resine artificiali, di composizione varia, con nomi altrettanto vari (Histovitrex, PDX, Eukitt, ecc.), ed hanno in genere dei vantaggi, corrispondenti ad altrettanti svantaggi del prodotto naturale:

- induriscono in poche ore;
- non tendono ad ingiallire;
- non sono fluorescenti;
- sono economici. Ma ...
- si ritirano rapidamente riempiendo d'aria il preparato se non è sottilissimo;
- aderiscono poco e la lamella si stacca facilmente;

- di solito, non sopportano il riscaldamento.

Comunque, quando si depone la goccia di resina sul vetrino, l'oggetto sulla goccia e l'altro vetrino sull'oggetto, può prodursi una serie di bolle d'aria che invadono l'oggetto. Abbiamo già indicato un metodo (fig. 8) per evitare le bolle ma, se il balsamo è "naturale", è inutile preoccuparsi e cercare di scacciarle comprimendo la lamella: si sciolgono da sole nella resina e scompaiono in pochi giorni. Se invece la resina è artificiale ed indurisce presto, occorre rifare il preparato.

Se la resina contiene molto solvente (in genere xilolo), tende comunque a ritirarsi dall'orlo della lamella. A questo punto, si sorvegli il vetrino ogni qualche ora o qualche giorno e si aggiunga una goccia di resina fresca presso la zona di ritiro, ma non sopra, per non rinchiudere una nuova bolla d'aria.

Ovviamente, finché la resina non è indurita, il vetrino deve restare orizzontale. Si può accelerare l'indurimento ponendo il vetrino su un termosifone o, potendo, in una stufetta termostatica a 50°.

10.3 -- MONTAGGIO A SECCO

In certi casi (pollini, spore, diatomee, radiolari, foraminiferi, microcristalli, peli, scaglie d'ali di farfalle, ecc.), conviene confezionare due vetrini, uno con montaggio in un liquido, di quelli appena visti, l'altro in aria. È così più facile osservare le strutture di superficie, specialmente in episcopia.

In questi casi, il lutaggio è d'obbligo, ma il luto deve essere abbastanza consistente da non penetrare fra i due vetrini per capillarità ed invadere il preparato.

Prima di lutare, è bene scaldare un po' il vetrino per essere sicuri di scacciarne l'umidità, che farebbe proliferare le muffe all'interno.

Se l'oggetto è troppo spesso, la lamella si poggerà sul porta-oggetti obliquamente. Si può evitare questo ponendo fra i due vetrini, tutto intorno al perimetro della lamella, delle striscioline di carta o di foglio d'alluminio per alimenti, di 2 – 3 mm di larghezza.

Se il vetrino è destinato all'episcopia, conviene preventivamente verniciare il porta-oggetti con vernice nera opaca.

Si ricordi che, a causa dell'indice dell'aria, pari a circa 1,0, l'oggetto montato a secco non può essere osservato in immersione. Gli obbiettivi forti a secco possono essere usati solo se di apertura non superiore a circa 0,6, a meno che non siano calcolati per l'episcopia (cioè per oggetti non coperti da lamella), ma in questo caso con perdita di definizione a causa di uno spessore di vetro (la lamella) che non è previsto dalla ricetta dell'obbiettivo.

11 -- TECNICHE PER CASI PARTICOLARI

11.1 - PREPARATI "A FRESCO"

Sono i preparati in cui l'oggetto è stato prelevato dal suo ambiente naturale dal minor tempo possibile e non è stato né ucciso né fissato. L'oggetto inoltre viene tenuto per l'osservazione nello stesso liquido in cui si trova in natura: acqua dolce o marina, liquidi organici, ecc.

Prima dell'osservazione, l'oggetto può essere dissociato o macerato (§ 6), sezionato a mano (§ 8.1) o al microtomo, se la sua consistenza lo permette (§ 8.2), ma senza inclusione.

La sezione di materiale fresco esclude quindi le operazioni di disidratazione, inclusione, sparaffinamento, reidratazione, ecc.

Queste osservazioni dirette inoltre escludono il pericolo degli "artefatti", cioè di quelle

trasformazioni artificiali nella struttura dell'oggetto, che sono prodotte dalla fissazione, dall'inclusione, ecc.

L'unico inconveniente è che il materiale fresco non si conserva.

Gli oggetti destinati all'osservazione al microscopio, ma non alla conservazione, si possono da un certo punto di vista distinguere in tre gruppi:

-- quelli di dimensione microscopica che vivono normalmente in acqua (dolce o salata) o in liquidi organici in veste di parassiti. Per questi, la preparazione va fatta semplicemente tenendoli nel liquido in cui vivono di norma: una goccia fra due vetrini.

-- Quelli di grandi dimensioni; per questi, occorre una riduzione a spessori minimi con la dissociazione, la macerazione o la sezione. Se ciò non è possibile, si può solo osservarne la superficie con la tecnica dell'episcopia o col microscopio stereoscopico.

-- Quelli microscopici normalmente viventi in aria, come i pollini. Qui si può pensare ad un montaggio "a secco" (§ 10.3) oppure in qualche liquido. Il liquido può avere funzione conservativa ma, comunque, deve possedere la stessa pressione osmotica dell'oggetto per evitare che quest'ultimo assorba acqua per osmosi, si gonfi ed esploda.

Nel caso di oggetti sospesi in un liquido, se ne prenda una goccia abbastanza piccola da non debordare dalla lamella e si deponga quest'ultima obliquamente come descritto in fig. 8.

Se l'oggetto ha uno spessore maggiore di circa 0,3 mm, la lamella può disporsi obliquamente ed è meglio ricorrere ai porta-oggetti incavati al centro, già citati (§ 10), oppure sollevare la lamella con striscioline di cartoncino sottile.

Se il liquido deborda, si può assorbire l'eccesso con un pezzetto di carta asciugante accostato all'orlo della lamella.

Quando i vetrini rimangono asciutti su tutto il loro perimetro, si può mantenere più a lungo il preparato lutandolo (§ 10.1). Può bastare la paraffina che si liquefa e si preleva dal blocco con un grosso fil di ferro piegato ad L e scaldato alla fiamma, oppure la vaselina spalmata a freddo con un pennello.

Spesso, conviene aumentare la quantità d'informazione ricavabile da un preparato a fresco a mezzo di una colorazione. Trattandosi di materiale morto o di cui si vuol osservare solo la struttura, si possono usare i normali coloranti, anche se tossici. Se invece si vuol osservare materiale vivo nel corso delle sue normali funzioni, occorre rivolgersi a coloranti non tossici. Si parla di "**colorazioni in vivo**" o "vitali".

In diluizioni elevate, sono utili il blu di metilene, il rosso neutro ed il blu di cresile, reperibili in commercio in soluzione acquosa. Una goccia di soluzione per 2 – 20 gocce di sospensione degli oggetti.

Per la terza categoria di oggetti, quelli che si trovano normalmente in aria (artropodi microscopici {insetti, acari, ecc.}, scaglie di ali di farfalle, alghe unicellulari terrestri, organi vegetali come spore, pollini, soredi di licheni, peli, ecc.), si può "montare" in aria o "a secco", come detto poco sopra (§ 10.3), ed in questo modo si possono meglio rivelare le strutture che si trovano sul contorno dell'oggetto. Però il contrasto, a causa della differenza d'indice di rifrazione fra oggetto ed aria, sarà sempre molto forte, tale da nascondere le strutture interne. Di solito, quindi, conviene osservare tali oggetti anche in un liquido, che può essere acqua o una soluzione isotonica (per es. cloruro di sodio in acqua al 3%) o un liquido chiarificante come il liquido glicerinato (§ 4), una miscela acqua-glicerina, o il lattofenolo (§ 3.2.1).

Il lattofenolo si può usare anche su parti disseccate, magari scaldando leggermente. Se esso non deborda dalla lamella, consente la lutazione e con ciò il preparato diviene permanente.

Nel caso di muffe ed altri "funghi inferiori", frammenti di muschi, e simili, occorrerà valutare caso per caso se preferire il montaggio a secco o in un liquido, ma spesso conviene

seguire entrambe le tecniche.

11.2 - MONTAGGI “*IN TOTO*”

Si chiamano così i preparati di oggetti così piccoli o sottili da non richiedere la sezione in fette sottili.

A volte si può richiedere un certo lavoro per liberare le parti interessanti dell'oggetto da ciò che le circonda e comunque da un eccesso di materiale. Si pensi a ciuffi di alghe filamentose, sottili ma aggrovigliate, grumi di ife di funghi, foglioline e rizine di muschi, certe epatiche, epidermidi vegetali con stomi, peli o ghiandole, sori e protalli di felci, pollini e spore con le loro “cellule madri”, ecc.

L'omissione del sezionamento consente a volte una miglior comprensione della struttura di molto materiale vivente.

I preparati *in toto* andranno in genere montati in un liquido non indurente, in modo da portare a vetrini temporanei o semipermanenti, eventualmente lutati (§ 10.1), ma non è escluso il montaggio permanente in resine indurenti.

Non sono da escludere nemmeno la fissazione né la colorazione con i normali metodi, usando l'espedito della reticella o del vetro d'orologio per non disperdere i pezzi piccoli.

Nessuna colorazione è da escludere di quelle già descritte, in particolare le ematossiline.

12 -- CATEGORIE SPECIALI DI OGGETTI

12.1 - EMBRIONI VEGETALI

Già nei bocci fiorali è possibile osservare, sia nelle sacche polliniche che negli ovuli, le cellule in rapida proliferazione; le si riconosce dalla presenza di figure mitotiche.

La colorazione più utile per queste osservazioni è quella a base di ematossilina.

Per osservare i primi stadi dell'embrione, aprire l'ovario di un fiore, estrarre un ovulo e sezionarlo secondo il piano mediano. La stessa cosa si può fare con ovuli in crescita o giovani semi. Si possono ripetere le sezioni secondo un piano equatoriale, perpendicolare al precedente. Se gli ovuli sono troppo piccoli, si può sezionare l'intero ovario senza aprirlo, in modo che gli ovuli rimangano al loro posto.

Per capire qual'è l'orientamento degli ovuli, occorrerà sezionare prima un certo numero di ovari.

Nel caso di infiorescenze compatte, come i capolini delle Composite, conviene sezionare l'intera infiorescenza.

Come fissativo, può andare bene l'alcool, assoluto o quasi. Includere in paraffina a 50%. Si può colorare con ematossilina e poi col Rosso Congo.

12.2 - CROMOSOMI

I cromosomi e le figure mitotiche si trovano in tutti i tessuti in rapido accrescimento come gli apici radicali, apici di fusti, gemme, ovuli fecondati, antere immature, ecc.

Può bastare una sezione a mano, salvo poi dissociare il tessuto con aghi o lamette, in modo da isolare le cellule.

Si copre il tutto con la lamella e si fa penetrare fra i due vetrini, sfruttando la capillarità, sia l'eventuale fissativo, sia il colorante.

Difficilmente in questi casi si possono usare le ematossiline a causa del gran numero di passaggi; più semplici da usare i coloranti d'anilina come il violetto genziana, la safranina ed il verde di metile, tutti in soluzioni diluite.

Poiché l'oggetto è già compreso fra due vetrini, lo si può osservare durante la colorazione in modo da poterla arrestare sempre al momento giusto.

Ogni passaggio della colorazione, compreso il lavaggio, si effettua poggiando la punta della pipetta sull'orlo della lamella e depositando la quantità di liquido richiesta una goccia dopo l'altra e, contemporaneamente, assorbendo il liquido dalla parte opposta con carta da asciugamani.

Aggiungendo alla soluzione colorante un po' d'acido acetico, si può ottenere anche la fissazione, il che consente di arrivare ad un preparato permanente.

Il montaggio si può fare in glicerina, in modo da evitare la disidratazione.

Con i coloranti sopra citati, è bene regolare attentamente la concentrazione e/o il tempo di trattamento in modo da arrestare il processo prima che cominci a colorarsi anche il citoplasma. Il miglior colorante per i cromosomi in questo tipo di preparazione "fra vetrini" rimane comunque il "**carminio acetico**". Ecco la procedura.

Si comincia con la fissazione nel "**liquido di Carnoy**", che si fa agire a caldo per qualche minuto: -- alcool assoluto, 6 parti -- cloroformio, 3 parti -- acido acetico glaciale, 1 parte.

Poi si fa passare fra i vetrini il carminio acetico, scaldando leggermente il vetrino. Tale colorante si prepara così (ricetta di Schneider):

Far bollire a 45°C l'acido acetico (100 cc). Aggiungere 10 g di carminio. Raffreddare e filtrare su carta da filtro.

Da questo colorante, si può passare direttamente in alcool assoluto.

Una seconda ricetta per il carminio acetico è questa: si lascia seccare la carta da filtro del passaggio precedente, si raccoglie il residuo secco che vi è rimasto, e se ne mescola una parte con 10 parti di allume in 200 parti di acqua distillata calda. Raffreddare, filtrare, aggiungere un cristallo di timolo.

Per i **fusi mitotici** e le centrosfere è utile la "**miscela di Pianese**": -- verde malachite, 0,5 g -- fucsina acida, 0,1 g -- acqua distillata, 150 cc -- alcool a 95°, 50 cc.

Lasciar agire per 20 - 30 minuti. È utile una fissazione preventiva nel liquido di Carnoy, appena descritto.

12.3 - MITOCONDRI

Consigliamo due ricette:

A - fissare con la seguente miscela: -- solfato di cromo al 10% in acqua, 1 parte -- formalina al 8%, con aggiunta di abbondante carbonato di calcio, 1 parte.

Colorare con fucsina acida o violetto cristalli o ematossilina ferrica o verde Janus B (quest'ultimo per materiale fresco).

B - Fissare per alcuni giorni nel **liquido di Regaud**¹⁰: -- bicromato di potassio, 2 parti -- acqua distillata, 100 parti -- formolo, 25 parti.

Lavare in acqua corrente per 24 ore.

Mordenzare per 20 - 30 giorni in bicromato di potassio al 3%. Lavare in acqua per 24 ore.

Passare in allume di ferro al 5% per almeno 24 ore. Lavare in acqua distillata.

Colorare con questa soluzione: -- ematossilina cristallizzata sciolta al 10%, 10 cc -- glicerina, 10 cc -- acqua distillata, 80 cc.

Lavare in acqua distillata e differenziare in allume di ferro al 1%.

12.4 - NUCLEOLI

Fissare in formalina al 10% per 3 - 6 ore. Lavare in acqua corrente per 12 ore. Passare per 15 minuti in acido tricloroacetico al 5%, scaldato a bagno Maria bollente.

¹⁰ Pronuncia: "regò" con la "o" chiusa.

Trattare con alcool a 70° per 10 minuti, cambiando l'alcool per tre volte.

Passare in acqua distillata. Poi, 30 minuti in "verde rapido" al 0,1% con aggiunta di frammenti di soda caustica. Cinque minuti in acqua distillata. Eventualmente, disidratare con le serie degli alcool, ecc.

13 -- I PRINCIPALI GRUPPI VEGETALI

13.1 - ALGHE UNICELLULARI TERRESTRI

Si tratta di Protococchi e simili, piccole, sferoidali, comuni sulle superfici non troppo aride, cortecce di alberi, rocce, muri, e simili.

Si prenda la pietra o la cortecchia dove appare una patina polverulenta verde. Con una lancetta, grattare un po' della polverina.

Si può osservare a secco, ma la visibilità delle strutture interne è migliore immergendo in acqua. Per preparati permanenti, si può fissare con acido picrico (liquido di Bouin o picroformolo, § 3.1.6) per almeno 24 ore. Lavare abbondantemente in alcool a 90°.

Montare in gelatina glicerinata, senza colorazione.

Non si potrà mai ricordare abbastanza che tutti gli organismi che vivono sulle foglie, cortecce, licheni, rocce, ecc. si studiano benissimo a fresco, senza alcuna preparazione, col microscopio episcopico. Col vantaggio che li si osserva nel loro ambiente, mentre svolgono le loro funzioni, senza disturbarli.

13.2 - ALGHE UNICELLULARI D'ACQUA DOLCE

Le specie ed i gruppi di specie sono innumerevoli, ed ognuno richiederebbe una tecnica speciale. Indichiamo comunque alcune tecniche più semplici di uso generale.

Se gli organismi sono poco numerosi, si possono concentrare sottoponendoli a centrifugazione. Se sono mescolati a fango, si può inclinare il recipiente (se trasparente) per ammonticchiare il fango da una parte, e poi disporre dall'altra parte una lampada accesa. Molti organismi migreranno spontaneamente verso la lampada, uscendo dal fango.

Per la loro conservazione per tempi lunghi è utile il **liquido di West**: -- glicerina, 10 g -- acqua, 90 g -- acido fenico, 1 g.

Per molte forme, specie per quelle munite di flagelli, così come per i Protozoi ciliati, viene consigliata una colorazione (si potrebbe chiamare meglio "visualizzazione", visto il contrasto negativo che produce) a base di **nigrosina**.

Tale colorante, che ha reazione basica, si presenta come una polvere nera ottenuta facendo reagire anilina, cloridrato d'anilina, nitrobenzene e limatura di ferro. La sua composizione non è però definita.

Si scioglie la nigrosina in acqua distillata al 10% e si fa bollire per 10 minuti. Raffreddare. Aggiungere qualche goccia di formolo. Filtrare su carta e conservare in recipienti ben chiusi.

Per l'uso, si mescola una parte della soluzione appena descritta con 1 - 3 parti del liquido di cultura delle alghe. Si spalma un sottile strato del miscuglio su un vetrino e lo si fa asciugare il più rapidamente possibile. Poi, si può montare direttamente in balsamo del Canada.

Gli organismi, come i loro flagelli, figureranno chiari su fondo scuro. Si renderanno visibili anche le guaine di gelatina di cui alcuni, specialmente batteri e Cianoficee, si circondano.

Molti microrganismi, specialmente Euglene, tendono rapidamente ad appallottolarsi prima di qualunque colorazione. Per evitare ciò, si può aggiungere alla cultura una traccia di formolo. Ottenuta l'immobilità, il formolo al 10% può anche servire da fissativo.

Molte alghe verdi, d'altra parte, si osservano bene anche senza colorazione. Per conservare il colore della clorofilla, e nello stesso tempo fissare, si può usare la seguente miscela: -- acqua distillata, 100 g -- acido fenico, 1 g -- acido acetico cristallizzato, 0,3 g -- bicloruro di rame cristallizzato, 0,2 g -- nitrato di rame, 0,2 g.

La sospensione di alghe, più concentrata possibile, si getta in questo liquido. Montare in gelatina glicerinata.

Specialmente per le cloroficee, si consigliano anche questi fissativi:

- Acido cromico, 0,5 g -- acido acetico, 4 g -- acqua, 100 g. Lasciare agire per un tempo da 10 a 24 ore. Lavare abbondantemente in acqua.

- Formalina, 5 cc -- acido acetico glaciale, 5 cc -- alcool a 50°, 100 cc. Anche questo deve agire per 24 ore; lavare in alcool a 50°.

Se si sceglie una colorazione, si può usare questa miscela: -- alcool a 70°, 100 cc -- acido acetico, 3 g -- verde luce, 0,1 g, -- safranina, 0,15 g. Lasciare agire da 30 min ad alcune ore. Lavare in alcool a 70°. Si può disidratare e montare in balsamo, oppure montare in gelatina glicerinata e lutare.

Altra colorazione doppia, di uso peraltro generale, è l'ematossilina + il verde luce.

Specie per le Volvocacee, si consiglia di concentrare gli individui per filtrazione ma, per impedire la loro agglutinazione, conviene aggiungere alla sospensione un po' di acido acetico. Poi, si può fissare con la seguente soluzione, per un tempo di almeno 48 ore: -- sciogliere 2 g di ioduro di potassio ed 1 g di iodio in 400 cc di acqua; -- aggiungere 24 cc di formalina e 4 cc di acido acetico glaciale. Lavare con acqua leggermente acidificata. Si può a questo punto colorare col **picro-indigocarminio**: -- indigocarminio, 0,25 g -- acqua, 100 cc -- acido picrico fino alla saturazione. Questa soluzione colorante deve agire almeno una settimana.

La disidratazione nella serie degli alcool può seguire le regole normali; semmai, aggiungendo un po' di acido fenico nello xilolo. Il balsamo andrà aggiunto goccia a goccia alla sospensione degli organismi in xilolo, finché non si raggiunge una consistenza sciropposa.

Un montaggio di validità generale rimane sempre quello in gelatina glicerinata: se i campioni sono stati tenuti in acqua pura o acqua addizionata di glicerina, si evita il rischio di accartocciamento.

13.3 - DIATOMEAE (frustoli)

La raccolta di Diatomee, ottenuta per decantazione o altri metodi, si mette in un recipiente di ferro ben pulito e lo si riscalda fino a calcinazione, cioè alla decomposizione di tutti i residui organici.

Sciogliere le ceneri in xilolo, eliminare i corpi estranei più grossi con le pinzette, possibilmente lavorando sotto un microscopio stereoscopico, montare in balsamo o altri materiali ad indice elevato.

Questo processo, rapido ma grossolano, può essere migliorato eliminando i residui carbonatici con acido cloridrico. Utile anche l'azione dell'acqua ossigenata.

Molte altre ricette prevedono l'uso di acido nitrico, acido solforico, clorato di potassio, ecc. Molti specialisti hanno approfondito quest'argomento ben al di là di quanto si possa fare in questa sede. Si veda anche la bibliografia.

Nel caso delle Diatomee pelagiche, che vivono sospese nelle acque del mare aperto, il trattamento con acidi è da evitare, poiché compromette le appendici lunghe e sottili di cui sono spesso dotate.

Non si dimentichi però che le Diatomee non sono frustoli imbalsamati, ma esseri viventi, che vale la pena di osservare nel loro ambiente, mentre svolgono le normali funzioni per cui la selezione le ha adattate.

13.4 - ALGHE MARINE

È ovvio che i microrganismi d'acqua dolce si possono trattare con soluzioni a base di acqua pura; quelli marini devono rimanere in liquidi isotonici con l'acqua di mare e quindi in miscele basate su acqua marina o su apposite combinazioni di sali.

Per il resto, fissazione e colorazione non differiscono molto dai metodi già citati.

Per le alghe pluricellulari di grandi dimensioni occorre invece pensare a sezioni sottili; la loro consistenza in genere non è sufficiente per una sezione a fresco, per cui si ritorna alla normale sequenza: «fissazione - (colorazione) - disidratazione - inclusione - sezione - sparaffinamento - montaggio».

Le forme più piccole possono essere fissate in lattofenolo (3.2.1) e montate in gelatina glicerinata (10.2). Se le alghe sono state seccate in vista della conservazione per tempi lunghi, vanno rammollite in acqua dolce e rigonfiate in lattofenolo.

Come fissativo, è raccomandata anche la **miscela cromo-acetica**, avendo cura di usare acqua marina invece che acqua dolce: -- acqua (marina) filtrata, 100 cc -- acido cromico, 1 g - - acido acetico glaciale, 1 g -- saponina, 0,5 g (non essenziale). La fissazione deve durare da 4 a 24 ore. Il lavaggio si effettua in acqua marina filtrata.

La disidratazione si può eseguire con la normale serie degli alcool, cominciando con miscele in acqua marina, per passare agli alcool più forti con una proporzione crescente di acqua distillata. Ogni passaggio deve durare circa un'ora.

Come colorante va bene l'ematossilina, magari colorando poi il citoplasma con arancio G, un colorante acido da sciogliere all'1% in acqua marina ("colorazione di contrasto").

Fra le alghe brune, è comune il *Fucus*. Poco sotto la superficie del tallo, si osservano delle vescichette di 1 - 2 mm di diametro di colore arancio (le maschili) o verde (le femminili).

Staccandole e schiacciandole fra due vetrini, sempre in acqua marina, si osservano i dettagli degli organi riproduttivi.

Gli anterozoi hanno due flagelli ed uno stigma rosso.

Si possono fissare nella miscela cromo-acetica appena descritta o in formalina (diluita al 10% in acqua marina) per alcuni giorni. Lavare in acqua marina, poi in acqua marina diluita al 75% in acqua dolce, poi al 50%, al 25% ed infine in acqua distillata (un'ora per ogni passaggio).

Colorare con ematossilina + arancio G. Differenziare in cloruro ferrico al 1%. Va bene anche l'ematossilina di Harris (§ 3.2.1).

13.5 - FUNGHI

Anche in questo gruppo sono riunite forme viventi molto diverse, ognuna delle quali richiederebbe tecniche di preparazione differenziate. Ci limitiamo pertanto a descrivere le tecniche di uso più generale, rimandando ai testi citati in bibliografia per ogni ulteriore dettaglio. Ottimo quello di Johansen.

Per quanto riguarda i reagenti da utilizzare, va ricordato che nei funghi, come materiale di riserva, non esiste amido ma glicogeno. I reagenti a base di iodio, specifici per l'amido, sono quindi inutili. Così si ricordi che nelle pareti cellulari, invece della cellulosa che è tipica di quasi tutti i vegetali, è spesso presente un altro polisaccaride simile alla chitina, accompagnato da pectina e callosio, altri due carboidrati.

La coltura dei funghi è possibile su innumerevoli "terreni", come la comune gelatina usata in batteriologia, a base di agar, eventualmente addizionata con zucchero.

Come fissativo, va bene l'alcool a 95° o, meglio, una **soluzione cromo-acetica** "media" così composta: -- acido cromico sciolto in acqua al 10%, 5 cc -- acido acetico in acqua, sempre al 10%, 8 cc -- acqua distillata, 90 cc -- maltosio, 1 - 2 g. Questo fissativo deve agire

per uno o due giorni ma, dopo l'uso, va gettato. Lavare abbondantemente in acqua. In esso, alcuni materiali tendono ad indurire.

Come coloranti, vanno bene le ematosiline, in particolare quella ferrica; come colorazione di fondo, "di contrasto", va bene il verde rapido (§ 3.2.1). Anche la safranina ed il blu cotone sono consigliati.

Normalmente, la consistenza dei funghi a cappello è sufficiente a consentire la sezione a fresco, anche a mano libera. I miceli si possono stendere direttamente sul vetrino con due aghi. Volendo includere, vedi il § 13.5.3.

13.5.1 -- Le Mucorali (es.: la muffa del pane)

Questi piccoli funghi presentano in genere ife non settate. Per ragioni di tensione superficiale, non "bagnano" e non possono essere immersi direttamente in liquidi acquosi. Occorre prima sommergerli con gelatina sciolta in acqua al 0,5%, aspettare che tutte le bolle d'aria siano scomparse e poi lavare con acqua.

Come fissativo, oltre alla soluzione cromo-acetica vista sopra, va bene anche la formalina acetica o "alcool formolato acetico" (§ 3.1.7), possibilmente con qualche variante:

-- alcool a 50 - 70°, 90 cc -- acido acetico glaciale, 5 g -- formalina, 5 cc.

Questo fissativo deve agire per almeno un giorno, ma si presta male a studi sui cromosomi. Lavare due volte in alcool a 50°.

13.5.2 -- I Saccaromiceti (lieviti)

Questi funghi unicellulari vanno messi in sospensione acquosa diluita; si preleva una goccia di sospensione e la si stende su un vetrino; si aspetta che lo straterello di liquido si asciughi e si fissa al calore passando il porta-oggetto sulla fiamma per 8 - 10 volte.

Come colorante va bene la fucsina, sia quella acida che quella basica, in soluzione acquosa al 1%; lasciare agire il colorante per un minuto circa. Lavare in acqua ed aspettare che il vetrino si asciughi al riparo dalla polvere.

Gli stessi coloranti possono venir usati in concentrazione maggiore, ma allora occorre lavare con una soluzione acquosa di acido tannico al 5% per 20 secondi e poi con acqua acidulata con acido cloridrico.

Utile anche il blu di metilene in soluzione acquosa al 1%, durata della colorazione: 20 secondi. Oppure la miscela in parti uguali di fucsina acida e verde di metile, entrambi in soluzione acquosa al 1%.

Asciugare. Si può montare direttamente in balsamo.

13.5.3 -- Basidiomiceti maggiori

Abbiamo già suggerito come fissativo preferenziale il liquido cromo-acetico; per le specie più piccole occorrerà accorciare i tempi: da 10 minuti a 10 ore.

Colorazioni miste consigliate sono le miscele: ■■ safranina + verde rapido; ■■ ematosilina ferrica + verde rapido; ■■ safranina in soluzione acquosa + violetto cristalli in olio di garofano. Come colorazioni semplici, il blu cotone o il blu-lattofenolo (§ 3.2.1).

Dopo la disidratazione, è meglio evitare lo xilolo o il cloroformio poiché questi prodotti induriscono troppo il pezzo. Meglio usare olio di cedro, olio di bergamotto od olio di origano.

Dopo di ciò si può includere in paraffina e sezionare.

13.5.4 -- Uredinali (piccoli Basidiomiceti a ciclo vitale complesso, spesso parassiti di piante superiori)

Fissare in formalina acetica (13.5.1). Colorare con ematosilina ferrica, magari aggiungendo una colorazione di fondo con Arancio G.

Per questi ed altri piccoli funghi, come per le Mucorali, si può realizzare un preparato semi-permanente dilacerando un frammento di micelio nel lattofenolo, magari colorando col blu cotone-lattofenolo (§ 3.2.1) e poi montando in lattofenolo e lutando.

Più stabile sarà il preparato se il fungo (in toto se piccolo, in sezione se grande e consistente) viene prima passato nel liquido glicerinato (§ 4) o in lattofenolo e poi in gelatina glicerinata.

Questo vale anche per le spore, ma non è escluso il montaggio classico tramite xilolo (a parte le riserve esposte subito sopra) ed il balsamo del Canada; questo procedimento può produrre però una coartazione del pezzo.

13.5.5 -- Esami in vivo

Per le specie più piccole o per frammenti di micelio si può seguire lo sviluppo e la crescita dell'organismo in una "camera umida".

Si parte da una piccola camera realizzata con un anello di filo metallico; diametro del filo: 1 - 2 mm; diametro dell'anello: circa 20 mm¹¹. Si incolla l'anello su un porta-oggetti con una goccia di balsamo o di altro luto (§ 10).

Si pone al centro di una lamella una goccia del liquido contenente il frammento o le spore. Il liquido può essere acqua, ma è meglio operare con un liquido di cultura o con gelatina.

Si rovescia la lamella, goccia in giù, sulla cavità creata dall'anello metallico e la si sigilla con vaselina.

Non sarà possibile usare obbiettivi a forte apertura per via dello spessore della goccia, né usare il contrasto di fase, poiché la goccia non è assimilabile ad una lamina a facce piane e deforma l'immagine dei diaframmi anulari; è un vero peccato poiché il contrasto di fase è la tecnica più semplice per studiare la biologia dei funghi e di tutti i materiali viventi.

Nello studio in camera umida, la difficoltà maggiore consiste nella grande facilità di contaminare il materiale; occorre sterilizzare tutto (tranne l'oggetto): liquidi, attrezzi, vetrini. Si può immergere tutto in alcool o, se si tratta di attrezzi in vetro, passare alla fiamma.

I liquidi vanno bolliti bene prima dell'uso. Per conservare oggetto o attrezzi, usare scatole di Petri (o recipienti simili), a loro volta sterilizzate.

13.6 -- LICHENI

La maggioranza dei Licheni diviene fragile col disseccamento e li si può conservare in quello stato per tempi illimitati. Per realizzare delle sezioni però, o si opera su materiale fresco ed umido, o su esemplari conservati in formalina acetica (§ 13.5.1), addizionata con 0,2% di solfato di rame e 5% di glicerina.

Se il materiale è secco, imbeverlo in acqua per molte ore.

La formalina acetica agisce anche da fissativo; nella sua ricetta, l'acido acetico può essere sostituito da acido propionico. La fissazione richiede almeno 24 ore ma, avendo effetti conservativi, la permanenza nel liquido può essere illimitata.

Lavare due volte in alcool a 50°.

Per la disidratazione, si può procedere coi metodi normali, ma con una maggior gradualità nei passaggi. Evitare lo xilolo e l'inclusione in paraffina. Meglio quella in celloidina.

Le sezioni al microtomo andrebbero eseguite con spessori di 10 µ. A mano, si fa quel che si può. Le sezioni tendono a staccarsi dal vetrino, per cui è bene colorare *in toto* prima del taglio.

Come coloranti, sono consigliati la safranina ed il verde rapido, da integrare nel processo di disidratazione nel modo seguente.

Dopo aver messo l'oggetto in glicerina, sciolta al 10% in acqua, si aspetta che l'acqua evapori gradualmente; ogni tanto, si aggiunge un po' di soluzione di glicerina per evitare che il preparato si disseccchi.

Prima che l'acqua sia tutta evaporata, aggiungere lentamente la safranina O all'1% in acqua. Quando l'acqua è tutta evaporata, iniziare con la serie degli alcool. Arrivati all'alcool

¹¹ Può andar bene anche un OR (O ring), purché ben pulito.

assoluto, aggiungere a gocce il verde rapido sciolto in alcool a 95° nella concentrazione di 0,2%.

A seconda dei casi, va bene anche l'eritrosina, la fucsina acida ed il blu-lattofenolo. Il montaggio consigliato è in gelatina glicerinata.

13.7 -- BRIOFITE (Muschi ed Epatiche)

Prima di tutto, occorre qui evitare l'uso di soluzioni chiarificanti a base di ipoclorito di sodio o di potassio, spesso indicate per i tessuti delle piante superiori.

Se non si hanno esigenze particolari di colorazione, si può montare il materiale direttamente in gelatina glicerinata o nel lattofenolo. Il montaggio in gelatina va effettuato alla temperatura più bassa possibile, appena sufficiente a fondere quel reagente. Altrimenti, il pezzo si arriccia.

Quando la gelatina è indurita fra i due vetrini, la si può consolidare spennellando quello che sporge dalla lamella con gelatina pura in soluzione a consistenza vischiosa e poi con allume di cromo al 10%, che la fa indurire.

Taluni autori consigliano di macerare preventivamente i pezzi per 24 ore in un miscuglio di acqua e glicerina in parti uguali.

Le spore di Muschi si possono montare direttamente in balsamo del Canada.

La prima fase vegetativa dei Muschi, il **protonema**, simile ad un'alga feltrosa fatta di filamenti verdi ramificati, va prima lavata in acqua di rubinetto e poi posta in glicerina al 10%. Lasciare evaporare l'acqua in modo che la glicerina si concentri.

Montare nella glicerina pura o in gelatina glicerinata. Lutare.

Il verde della clorofilla col tempo tenderà a svanire.

Se si devono esaminare esemplari vecchi e rinsecchiti, lasciare a bagno in acqua fredda per qualche ora, oppure in acqua calda per qualche minuto.

Una semplice colorazione si può avere con verde iodio in soluzione acquosa, per la durata di qualche minuto.

Per un procedimento più rigoroso, fissare in formalina acetica (13.5.1) o in soluzione cromo-acetica (§13.5), ricordando che i liquidi a base di acido cromico induriscono molto i pezzi.

Spesso, i tessuti delle Briofite sono ricchi d'aria, specie quelli degli Sfagni, delle Marcanziali, ecc. Per estrarla, può essere necessario mettere i pezzi in una vaschetta piena d'acqua sotto una campana nella quale va praticato il vuoto con una qualunque pompa ad aria (vedi il § 13.9.4). La permanenza nel vuoto deve durare uno o due giorni; questo però va fatto quando il tessuto è morto e fissato (e quindi indurito), al fine di evitare la plasmolisi.

Volendo includere in paraffina, conviene usare paraffine tenere (titolate a 42 - 45° C) se il pezzo è molle ma, se il fissativo ha indurito bene, basta la paraffina normale a 60 - 65° C.

Come colorazioni, vanno bene quelle classiche come l'ematossilina ferrica o l'ematossilina di Harris, con colorazione di fondo a base di arancio G o verde rapido.

Anche la safranina è consigliata.

13.7.1 -- Torba

La torba è in massima parte costituita da resti di Briofite particolari, gli sfagni, in cui una buona parte delle cellule è cava e comunica con l'esterno tramite fori che consentono un forte assorbimento d'acqua.

Se il materiale è fresco, lo si può trattare come gli altri Muschi. Se è secco o fossilizzato, occorre includerlo per eseguire una sezione sottile, come si fa per le rocce: -- disidratare con un paio di passaggi in alcool assoluto, di un paio d'ore ognuno; -- passare in xilolo (se questo s'intorbida, è segno che un po' d'acqua è rimasta e va ripresa la disidratazione); -- passare ora in balsamo del Canada sciolto in xilolo e poi in balsamo puro scaldato fin quasi all'ebollizione; -- dopo il raffreddamento e l'indurimento, si leviga una faccia del blocco con

due o tre passaggi su abrasivi sempre più fini; -- la faccia levigata del blocchetto si fissa su un porta-oggetti con balsamo fuso o silicone. Raffreddare. -- Consumare il blocchetto dalla faccia opposta fino a ridurlo ad uno spessore di 20 - 50 μ (controllare con un palpatore centesimale); -- lucidare di nuovo; -- montare con altro balsamo ed una lamella sopra.

13.8 -- FELCI

È questo un altro gruppo molto eterogeneo che, oltre alle “felci” comunemente intese, comprende piccoli gruppi meno conosciuti. Si tratta, a volte, di veri e propri “fossili viventi”, molto diversi fra loro, che rivestono un grande interesse filogenetico in quanto indicano i probabili passaggi dalla riproduzione a cicli alterni (metagenesi classica, con alternanza di una fase gametofitica ed una sporofitica, ben distinte fra loro) alla riproduzione tipica delle fanerogame, con riduzione estrema della fase gametofitica aploide. I gruppi minori cui alludiamo sono i Licopodi, gli Equiseti (“code di cavallo”), le Selaginelle, ecc.

Tutti questi, includendo forse le Briofite, vengono raggruppati col termine “Crittogame vascolari” in quanto possiedono un sistema di “vasi”, di cellule tubolari destinate alla conduzione dei liquidi.

Caso per caso occorrerebbero per la preparazione precauzioni particolari, ed il miglior testo cui rivolgersi è quello di Johansen, citato in bibliografia. Ma la presenza di un sistema vascolare accomuna questi organismi alle Fanerogame, almeno dal punto di vista strutturale. Pertanto, possiamo occuparci di qualche indicazione generale.

Il materiale fresco può essere conservato in alcool a 70°; quello secco va rammollito prima in alcool e poi nel liquido glicerinato, citato nel § 4, tenendovelo per almeno una settimana. Può essere più rapido il rammollimento in lattofenolo (§ 3.2.1).

Dopo il passaggio in alcool, si può anche trattare il materiale secco con un buon lavaggio in acqua e poi in ammoniaca molto diluita con acqua.

Il passaggio preventivo in alcool ha lo scopo di evitare la formazione di bolle d’aria e consentire la penetrazione dei reagenti successivi. Questo vale in genere per i prodotti vegetali secchi, il legno, ecc.

Arrivati a questo punto, è spesso sufficiente un esame diretto in acqua o glicerina.

Le epidermidi, semplicemente staccate colle pinzette, si possono osservare in glicerina o lattofenolo.

Dove c’è da aspettarsi la presenza di amido (rizomi, ecc.) si può colorarlo con una soluzione molto diluita di tintura di iodio oppure eliminarlo con un bagno in varechina, per alcune ore.

Le spore possono essere osservate sia fresche che dopo un certo periodo di disseccamento in aria asciutta. Conviene anzi confezionare due preparati, uno con le spore in aria (lutando poi la lamella), uno con le spore immerse in un liquido. Ognuno dei due preparati consente di osservare strutture invisibili nell’altro. Lo stesso vale per le spore dei funghi e dei muschi, i pollini, ecc.

Come liquidi di montaggio, si possono usare:

-- balsamo del Canada, magari dopo una breve imbibizione del pezzo in xilolo;

-- gelatina glicerinata, dopo un breve trattamento con lattofenolo.

Un fissativo di uso generale per le Felci è il formolo acetico (§ 13.5.1) oppure il picroformolo (§ 3.1.5).

Per la colorazione, rimangono valide le ematosiline (§ 3.2.1), magari seguite dalla safranina, oppure l’abbinamento «safranina - violetto di genziana», oppure il semplice blu d’anilina.

Il sezionamento a mano o al microtomo, sia su materiale fresco che dopo inclusione, può risultare difficile per la presenza di strati di tessuto sclerificato all’esterno dei fusti.

Anche negli Equiseti, le cellule superficiali possono essere impregnate di silice, ma sempre in piccoli granuli. La reale difficoltà nel preparare gli Equiseti sta nella loro ridotta

affinità con i coloranti basici.

13.9 -- FANEROGAME (piante con fiori e semi)

Nelle Fanerogame, più che nelle Crittogame, è importante dal punto di vista chimico la presenza della parete cellulosica, e naturalmente ciò influisce sulla penetrazione dei reagenti e sulla tecnica microscopica in generale.

È per questi motivi che, spesso, i tessuti vegetali vengono osservati dopo aver distrutto il contenuto delle cellule, e quindi solo nelle pareti cellulari.

Semmai, certe colorazioni puntano a differenziare le pareti solo cellulosiche da quelle lignificate. Comunque, in molti casi è possibile confezionare preparati permanenti di qualunque tessuto nella sua integrità, con tecniche semplici.

Come generico fissativo, va bene il Bouin (§ 3.1.5) o l'alcool assoluto o il formolo acetico (§ 3.1.6), eventualmente riducendo in quest'ultimo la percentuale di formolo dal 5% al 2% e raddoppiando quella di acido acetico da 1% a 2%.

Il fissativo di Bouin può essere modificato anche in un'altra direzione, allo scopo di conservare il colore delle parti verdi (liquido di Wigglesworth): basta aggiungere alla composizione normale del Bouin l'1% di solfato di rame. Questa ricetta è validissima anche per gli insetti litofagi.

Se si verificano delle contrazioni nell'oggetto, diluire il liquido con un'eguale quantità di acqua distillata.

Come colorante, si consiglia l'ematossilina, con colorazione di contrasto a base di eosina, oppure il verde d'anilina, il verde iodio, la vesuvina.

Molti coloranti (fucsina, safranina, violetto genziana) richiedono una decolorazione poiché inizialmente colorano tutte le parti del tessuto e solo con un processo regressivo si differenziano alcune parti.

Come colorazioni miste sono proposte: -- safranina + blu di metile; -- safranina + verde luce; -- safranina + violetto genziana + arancio G; -- verde malachite + rosso Congo.

Queste colorazioni sono utili anche nel caso delle epidermidi, generalmente monostratificate, che si possono staccare con le pinzette da foglie e fusti. Oggetto ben noto sono le epidermidi delle scaglie carnose del bulbo di cipolla, aglio ed altre Liliacee. Ne riparleremo fra poco (§ 13.9.3).

Può accadere di osservare, al termine della preparazione, il protoplasma contratto, distaccato dalla parete cellulare. Si tratta di un fenomeno già citato, la "plasmolisi", dovuto al fatto che la cellula, immersa in un liquido a forte pressione osmotica, perde acqua. Il fenomeno si osserva facilmente in cellule fresche colorate per natura, come quelle di rapa rossa, in cui un colorante rosso riempie i grandi vacuoli citoplasmatici. Se la sezione sottile di rapa viene immersa in una soluzione di cloruro di sodio (per es. al 5%), la plasmolisi si verifica presto: il vacuolo, assieme allo strato di citoplasma che lo delimita, si stacca dalla parete fino a diventare globoso e la sua colorazione aumenta poiché il succo cellulare si concentra.

Se la plasmolisi si verifica involontariamente, è segno che qualcuno dei reagenti usati era "ipertonico", cioè aveva una pressione osmotica eccessiva ed andrebbe diluito.

Difficilmente tutto ciò si verifica nei tessuti animali, proprio per la mancanza della parete cellulosica semi-rigida.

13.9.1 -- Le sezioni

Anche per i tessuti delle Fanerogame è possibile pensare alla dissociazione meccanica od alla macerazione con mezzi chimici. Ma la sezione a mano libera o col microtomo è spesso possibile anche senza inclusione. La presenza di turgore interno nelle cellule vive, reso

possibile dalla presenza della rigida parete cellulosa, oppure la presenza di pareti lignificate in molte cellule vive o morte, danno spesso ai tessuti vegetali una consistenza sufficiente.

Se un tessuto fresco non può essere sezionato subito, è bene conservarlo nel liquido glicerinato oppure nell'alcool a 70° oppure in formolo al 2 - 3%. Se si sceglie l'alcool, i tessuti molli possono coartarsi, ed allora è bene partire con alcool a 30°, poi a 50° ed infine a 70°.

Se il materiale è stato seccato da tempo, riportarlo in liquido glicerinato, anche per qualche settimana.

Per rammollire i semi si può usare l'acqua "fenicata", cioè addizionata con qualche goccia di acido fenico. Se la sezione dei semi viene eseguita col microtomo di Ranvier, il materiale fresco si può serrare nel polistirolo espanso o nel midollo di sambuco secco. Se il pezzo è stato conservato in qualche liquido, è bene che il midollo sia stato conservato anch'esso nello stesso liquido. Se si ricorre all'inclusione in paraffina, occorre naturalmente provvedere alla disidratazione, partendo dall'alcool a 25°.

La lama più adatta è quella col fianco inferiore piano e quello superiore concavo¹², ma va bene anche quella a due facce piane¹³ formanti un angolo molto acuto. Meno adatte quelle a due facce concave. Comunque, la lama va bagnata con alcool o glicerina od anche acqua.

Se il pezzo risulta troppo molle, si può indurirlo con un passaggio nella serie degli alcool, fino a 95°. Se il pezzo è troppo duro, si può tentare l'acqua fenicata o semplicemente la "camera umida": si ponga una coppa rovesciata su un piatto contenente un po' d'acqua fenicata; il pezzo va posto su un supporto idrorepellente (un pezzo di plastica, per es.) che ne impedisce il contatto diretto col liquido.

Poiché questo processo è assai lento (anche molti giorni), si può accelerare il rammollimento del pezzo con l'acqua calda o anche bollente. Quest'ultimo trattamento però distrugge il protoplasma e lascia solo le pareti.

Nelle fette sottili, la preparazione è semplice se si vogliono conservare solo le pareti: -- da 5 a 30 minuti in ipoclorito di sodio; -- lavare in acqua acidificata con acido acetico e poi in acqua pura; -- una generica colorazione con verde d'anilina o verde iodio può bastare; -- lavare bene in acqua distillata.

I coloranti appena citati sono adatti per gli sclerenchimi ed in genere per gli elementi lignificati, ma non per i collenchimi.

Per mettere in evidenza la cellulosa, vi sono alcune tecniche specifiche.

1) La sezione sottile va prima schiarita con la soluzione di ipoclorito di sodio e poi posta sul porta-oggetti e sommersa per qualche minuto da una goccia di liquido iodio-iodurato (vedi il § 13.9.4) così modificato: -- iodio, 0,3 g; -- ioduro di potassio, 1,5 g; -- acqua distillata, 100 g.

Coprire con una lamella, porre sul suo orlo una goccia di acido solforico al 30 - 50% in modo che possa diffondere nel liquido. Osservare al microscopio durante il processo.

Le parti che virano al blu sono costituite da cellulosa.

2) Trattare per qualche minuto con rosso Congo al 1%. Lavare. Porre l'oggetto in solfato di rame al 1%. Lavare.

Montare in glicerina. La cellulosa appare rossa.

Anche per questa seconda tecnica, può essere utile partire dal trattamento chiarificante con ipoclorito di sodio.

Il liquido iodo-iodurato è utilissimo anche per colorare l'amido in blu-viola.

Per la lignina, è relativamente specifico il verde iodio che va usato in soluzione alcolica molto diluita. Ottima la safranina che, come citato sopra, va usata col metodo "regressivo",

¹² Quelle cosiddette "di tipo B".

¹³ Quelle cosiddette "di tipo C".

cioè con successiva decolorazione: -- si fissi col formolo acetico (§ 13.5.1) per 24 ore; -- colorare con safranina per 2 - 20 ore (tempi più lunghi per le parti meno lignificate); -- lavare abbondantemente; -- differenziare con acqua acidulata con acido cloridrico finché le sezioni appaiono rosa ad occhio nudo; -- lavare ancora abbondantemente.

Come contro-colorazione, si può usare il verde rapido in soluzione acquosa al 1% o l'ematossilina di Harris (§ 3.2.1).

Volendo includere in paraffina, fissare con formolo acetico. L'impregnazione in paraffina nella stufa termostatica può essere molto lunga, anche più di una settimana. Usare paraffina dura.

Il blocchetto di paraffina col pezzo incluso va tagliato in modo che la superficie da esporre al taglio della lama intersechi il pezzo da tagliare. Il blocchetto va poi posto in acqua distillata addizionata con un cristallo di acido fenico. Questo trattamento va controllato con cura: di solito deve durare intorno a 12 ore; per organi adulti e lignificati possono occorrere alcuni giorni; per il legno, fino a due mesi.

A questo punto, il pezzo è divenuto bianco-lattiginoso. Un'immersione troppo lunga è dannosa poiché il pezzo è rammollito e viene allora strappato dalla lama invece che tagliato.

13.9.2 -- Il legno

Data la consistenza di questo materiale, l'inclusione è superflua. Il Séguy propone l'inclusione in acetato: si comincia con una lunga immersione preventiva in acqua (con l'aggiunta del solito cristallo di acido fenico o timolo per prevenire le muffe); s'immerge poi l'oggetto in acetone e poi in acetato di cellulosa al 12%, per una durata variabile da 2 a 6 giorni.

Per la sezione senza inclusione, tenere il pezzo in alcool debole per 5 - 30 giorni. Inondare il pezzo e la lama con alcool. Usare una lama con spigolo ad angolo forte¹⁴, come si vede nella fig. 9.

Fig. 9 - Sezione di lama di tipo D, adatta al taglio di materiali consistenti, come il legno.



Il Johansen consiglia un trattamento a vapore caldo: -- disporre il pezzo nel porta-pezzi del microtomo; si realizza una piccola caldaia (un piccolo bollitore o teiera metallica, per es.); vi si metta un po' d'acqua e la si faccia bollire; -- dirigere il beccuccio ed il relativo getto di vapore sul campione di legno finché si scalda e s'impregna d'umidità. Il punto debole di questa tecnica è che l'acqua tende a condensare lungo il beccuccio ed a gocciolare sul campione, e questo va assolutamente evitato.

Non è impossibile ottenere buone sezioni con un microtomo di Ranvier od anche a mano libera.

Come per altri materiali, la sezione sottile tende ad arrotolarsi. Per evitare ciò si propongono due rimedi.

1) Con un pennellino, spingere la fetta verso il dorso della lama; se questa è coperta da un velo di alcool od altro liquido, la tensione superficiale tratterrà la fetta aderente alla lama. Lasciare la fetta così per alcuni minuti.

2) Trattenerla la fetta sulla lama comprimendola col pennellino

¹⁴ Quelle cosiddette "di tipo D".

Non è in genere necessaria la colorazione. Semmai, è utile l'osservazione in luce polarizzata.

Al temine, disidratare come di norma e montare in balsamo del Canada.

13.9.3 -- Le epidermidi ed i peli

Che si tratti di Crittogame o di Fanerogame, le epidermidi si possono montare in questo liquido in modo da ottenere preparati semi-permanenti:

-- acqua distillata, 50 cc; -- soluzione acquosa satura di canfora, 50 cc; -- acetato di rame, 0,5 g; -- bicloruro di rame, 0,5 g; -- acido acetico, 0,5 g. Al momento dell'uso, mescolare 2 cc di questa soluzione con 1 cc di acqua distillata ed 1 cc di soluzione acquosa satura di cloroformio¹⁵. Questo trattamento evita la plasmolisi ed è adatto anche ad organi interi (foglie, petali, ecc.), alle spore, pollini, sporangi, ecc.

Le epidermidi si possono montare anche nello sciroppo di Apathy (§ 10.2) così modificato: -- acqua, 10 cc; -- gomma arabica, 10 g; -- glucosio, 5 g. Aggiungere qualche cristallo di timolo. Alla fine, lutare.

Questo liquido si adatta ad altri organi vegetali, ma non al polline.

Per i peli, non vi sono difficoltà a realizzare un preparato temporaneo in acqua.

Per una preparazione permanente, si stacchi un lembo di foglia, fusto, ecc. che reca i peli. Scolorirlo per qualche ora in ipoclorito di sodio¹⁶, lavare, colorare, schiarire (§ 4), disidratare, ecc.

Se si vuole montare in gelatina glicerinata, lavare bene dopo la colorazione con acqua distillata, passare nel liquido glicerinato (§ 4), aspettare che l'acqua e l'alcool siano evaporati e montare in gelatina glicerinata.

13.9.4 -- Le foglie

I petali e le foglie sono costituiti in genere da più strati di parenchima, limitati sulle due facce, da un'epidermide unistratificata.

In entrambi i casi, può essere opportuno un trattamento chiarificante, per es. con ipoclorito di sodio. La presenza di clorofilla ed altri pigmenti può rendere inutile la colorazione.

D'altra parte, la presenza di clorofilla ed altre differenze strutturali rendono le foglie, specialmente fra le Felci, imprevedibili riguardo alla risposta a certi reagenti. In particolare, una colorazione differenziale è assai difficile da ottenere. Così è difficile la colorazione dei cloroplasti.

La causa di ciò non dipende tanto dalla scelta del colorante, ma dal fissativo e dal processo di disidratazione. Influisce anche l'epoca della raccolta del materiale: le caducifoglie vanno raccolte in primavera od all'inizio dell'Estate.

È consigliato come fissativo il liquido cromo-acetico (§ 13.5), nella versione "forte", cioè con una maggior concentrazione dei due acidi, eventualmente con l'aggiunta di acido osmico (liquido cromo-osmo-acetico).

Data la presenza dell'epidermide cutinizzata, piuttosto impermeabile, non conviene fissare

¹⁵ La soluzione di cloroformio sarà satura quando uno strato di cloroformio starà stabilmente a contatto con l'acqua senza più sciogliersi: non se ne può sciogliere di più. Tale soluzione va conservata al buio, quindi in bottiglie di vetro scuro, ma bottiglie piene, in modo da ridurre il contatto con l'aria.

¹⁶ Come si è già detto, la varechina del commercio va evitata poiché è troppo impura. In ogni caso, gli ipocloriti devono agire per non più di pochi minuti poiché la struttura dei tessuti molli può risultarne distrutta. Occorre poi lavare con acqua acidulata con acido acetico o bisolfito di sodio e poi con acqua di rubinetto.

la foglia intera, ma tagliarne almeno le estremità per facilitare la penetrazione dei reagenti. Meglio ancora è tagliare dei pezzi dalla lamina, delle dimensioni di circa 5 × 10 mm. Per questi tagli, non usare forbici, che comprimerebbero i tessuti, ma un “cutter” affilato, poggiando la foglia su un cartone.

Il pezzo andrebbe poi privato dell'aria che è presente specialmente nelle lacune del parenchima spugnoso. Ciò si ottiene senza danneggiare il tessuto solo con una pompa a vuoto, mentre l'oggetto è immerso in un liquido opportuno: abbiamo consigliato questo accorgimento anche per altri organi a forte contenuto d'aria, come le foglioline degli sfagni (§ 13.7). Questo trattamento sotto vuoto va eseguito in parte sul materiale fresco; poi, dopo la fissazione, va completato sul materiale morto in modo da ridurre il rischio di plasmolisi.

Per la disidratazione si può usare il metodo della glicerina: dopo la fissazione, lavare abbondantemente e porre in glicerina diluita in acqua al 10%. Aspettare a lungo, finché l'acqua è tutta evaporata. Lavare la glicerina con alcool a 95° e poi disidratare completamente con alcool assoluto.

Il successivo passaggio nello xilolo deve essere graduale: tre passaggi di 4 ore l'uno, nelle soluzioni indicate qui sotto.

- 1) tre parti di alcool assoluto ed una di xilolo;
- 2) una parte di alcool assoluto ed una di xilolo;
- 3) una parte di alcool assoluto e tre di xilolo.

Proseguire con due passaggi in xilolo puro e poi in paraffina fusa, come per le normali inclusioni.

Per la colorazione, è consigliata la safranina + verde rapido, oppure l'ematossilina di Harris.

Quando si tratta di foglie piccole, come nei muschi e certe piante acquatiche, si può partire da materiale fresco e fissato, oppure da materiale secco. Mettere in ipoclorito di sodio (o anche varechina) per un tempo che può variare da 30 minuti (piccole piante acquatiche) a 4 giorni (piante grasse a forte cuticola). Si ha così una chiarificazione. Lavare in acqua corrente per molte ore.

Disidratare con la serie degli alcool (30°, 60°, 90°) e poi in una miscela di tre parti di glicerina ed una parte di alcool a 95°.

La presenza di amido si rivela colla **soluzione iodo-iodurata**:

-- acqua distillata, 100 g; -- ioduro di potassio, 0,5 g; -- iodio metallico, 1 g.¹⁷

Il preparato così ottenuto è temporaneo, ma nulla vieta di procedere colla normale disidratazione e col montaggio in balsamo, oppure col passaggio in glicerina e poi in gelatina glicerinata.

¹⁷ Nei funghi, è noto, non esiste amido come materiale di riserva ma glicogeno. Per colorare il glicogeno si usa una miscela simile: -- acqua distillata, 45 g; -- ioduro potass., 0,3 g; iodio, 0,1 g.

BIBLIOGRAFIA

- BECCARI N. - Elementi di Tecnica Microscopica - Soc. Editrice Libreria, Milano, 1946. Pagg. 310; figg. 8.
- BECCARI N. e MAZZI V. - Manuale di tecnica microscopica - Soc. Editrice Libreria, Como, 1966. Pagg. 326, figg. non quantificate.
- BRUSADIN M. - I preparati microscopici - Pagg. 80. www.funsci.com.
- CARAZZI D. e LEVI G. - Tecnica microscopica - Soc. Editrice Libreria, Milano, 1916. Pagg. 456; figg. 15.
- COLOMBO P. - Preparati microscopici di botanica - EdiSES S.r.l., Napoli, 2003. Pagg. 155. Figg. non quantificate.
- DEFLANDRE G. - Microscopie pratique - P. Lechevalier, Paris, 1947. Pagg. 426; tavv. 154.
- JOHANSEN D. A. - Plant microtechnique - McGraw-Hill Book Company, New York, 1940. Pagg. 502; figg. 110. *Il testo più esauriente e rigoroso.*
- LANGERON M. - Précis de microscopie - Masson, Paris, 1942. *Un testo classico.*
- LA PORTE L. J. - Le monde microscopique - P. Lechevalier, Paris, 1946. Pagg. 301; figg. 300.
- MARCHESINI R. - Indirizzo alla Tecnica Microscopica - Soc. Edit. D. Alighieri, Roma, 1894. pagg. 74.
- PELLETAN J. - Les Diatomées - Baillièrè, Paris, 1891. Pagg. 364. Molte incisioni.
- POLICARD A., BESSIS M. et LOCQUIN M. - Traité de Microscopie - Masson et Cie, Editeurs, Paris VI, 1957. Pagg. 576; figg. 178.
- POULSEN - Microchimica vegetale - Loescher Edit., Torino, 1871.
- RUZIN S. E. - Plant microtechnique and microscopy - Oxford University Press, New York, 1999. Pagg. 306; figg. non quantificate.
- SÉGUY E. - Initiation à la microscopie - N. Boubèe & Cie, Paris, 1970. Pagg. 240; figg. 100.
- SÉGUY E. - Le microscope-Emploi et Applications - P. Lechevalier, Paris, 1949. 2 voll. Pagg. 1316; figg. 311; tavv. 202. *Un vero atlante, con ricchissima bibliografia.*
- SPERANZA A. e CALZONI G. L. - Struttura delle piante in immagini - Zanichelli, Bologna, 1996. Pagg. 220; figg. 333.