

Ciencias Marinas

Universidad Autónoma de Baja California

cmarinas@uabc.mx, acabello@uabc.mx

ISSN (Versión impresa): 0185-3880

MÉXICO

1994

Dalila Fragoso Tejas / Judith Márquez Guzmán / Eberto Novelo  
TÉCNICAS DE TINCION MODIFICADAS PARA EL ESTUDIO DE ALGAS  
CORALINAS NO GENICULADAS (RHODOPHYTA)

*Ciencias Marinas*, año/vol. 20, número 004

Universidad Autónoma de Baja California

Ensenada, México

pp. 487-510

## **TECNICAS DE TINCION MODIFICADAS PARA EL ESTUDIO DE ALGAS CORALINAS NO GENICULADAS (RHODOPHYTA)**

### **MODIFIED STAINING TECHNIQUES FOR THE STUDY OF NONGENICULATE CORALLINE RED ALGAE (RHODOPHYTA)**

Dalila Fragoso-Tejas  
Judith Márquez-Guzmán<sup>1</sup>  
Eberto Novelo

Laboratorio de Ficología  
<sup>1</sup>Laboratorio de Citología  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias, UNAM  
Apartado postal 70-620  
Coyoacán, México, D.F., 04510  
México

*Recibido en abril de 1994; aceptado en julio de 1994*

#### **RESUMEN**

Con objeto de facilitar y mejorar la observación de características vegetativas y reproductivas de importancia taxonómica, necesarias para determinar genérica y específicamente algas coralinas no geniculadas (Corallinaceae, Rhodophyta), se probaron, evaluaron y modificaron varias técnicas de tinción aplicadas a cortes histológicos. Los resultados obtenidos con las técnicas utilizadas permitieron diferenciar éstas en cuatro grupos: a) colorantes que mostraron poca afinidad por el talo: azul de bromofenol mercúrico, azul de toluidina "O" y azul negro de naftol; b) colorantes con mayor afinidad con el talo que los del grupo anterior: rojo de rutenio y rojo "O" de aceite; c) colorantes combinados, que permitieron una mejor tinción del talo: azul negro de naftol combinado con la prueba de PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff) y azul de toluidina "O" con tetraborato de sodio; d) colorantes que dieron los mejores resultados: hematoxilina de Harris, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>), prueba de PAS y safranina con verde rápido.

*Palabras clave:* Rhodophyta, algas coralinas no geniculadas, técnicas de tinción, colorantes.

#### **ABSTRACT**

Different staining techniques of histological slides were tested and modified in order to improve and facilitate the observation of vegetative and reproductive structures that are taxonomically important for genus and species determinations of nongeniculate coralline algae (Corallinaceae, Rhodophyta). Four groups of staining techniques were differentiated from the results: a) dyes with a low affinity for the thallus: mercuric bromophenol blue, toluidine blue "O" and naphthol blue black; b) dyes with a greater affinity for the thallus: ruthenium red and red "O" oil; c) combined dyes which allowed a better staining of the thallus: naphthol blue black combined with PAS test (Periodic Acid Schiff's reagent) and toluidine blue "O" combined with sodium tetraborate; d) the dyes that gave the best staining results were: Harris' hematoxylin, Mallory's phosphotungstic hematoxylin, potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>), PAS test and safranin-fast green.

*Key words:* Rhodophyta, nongeniculate coralline red algae, staining techniques, dyes.

## INTRODUCCION

Las algas coralinas no geniculadas (Corallinales, Rhodophyta) han sido un grupo difícil de definir a lo largo de su historia taxonómica. Originalmente, los taxa fueron caracterizados por su forma de vida y su morfología externa principalmente. Después, para reconocer subfamilias, géneros y especies, se dio mayor importancia a las características anatómicas internas, tales como arreglo y construcción del talo, forma de las células epitaliales, tipo de conexiones intercelulares (puntos de unión secundarios o fusiones celulares), número de poros conceptaculares, disposición de las estructuras reproductivas en la cámara conceptacular, y presencia de taponos esporangiales, entre otras (Mason, 1953; Cabioc, 1972; Johansen, 1981; Woelkerling e Irvine, 1986; Woelkerling, 1988, principalmente).

Sin embargo, estas algas constituyen un tipo de material biológico de difícil manipulación para su análisis estructural, debido a su parecido externo, su forma de crecimiento costrosa o protuberante de tipo radial irregular, que dificulta la precisión en la orientación de los planos de corte y la impregnación de sus paredes celulares con carbonato de calcio, por lo que requiere un tratamiento previo de descalcificación. Además, el talo algal, después de preservado y seccionado tiene muy poco contraste al observarse en el microscopio de luz. Para salvar esta dificultad, es necesario utilizar alguna técnica de tinción que permita distinguir las características celulares necesarias para el trabajo taxonómico.

Las técnicas de tinción citadas en la literatura ficológica son: hematoxilina fosfotúngstica (Suneson, 1937; Adey, 1970; Adey y Johansen, 1972; Townsend, 1981; Cambell y Woelkerling, 1990), hematoxilina de Delafield (Mason, 1953), permanganato de potasio acuoso (Woelkerling, 1978; Jones y Woelkerling, 1984; Cambell y Woelkerling, 1990), hematoxilina de Harris-Erlich y eosina como contrastante (Johansen, 1969; Johansen, 1970), hematoxilina-fuccina básica (Riosmena-Rodríguez, 1991), hematoxilina-eosina (Riosmena-Rodríguez, 1993), azul de anilina acuoso (Jones

## INTRODUCTION

Throughout their taxonomic history, non-geniculate coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) have been a difficult group to define. Originally, these taxa were characterized mainly by their life form and external morphology. Later on, several internal anatomical characteristics became important to determine subfamilies, genera and species: thallus array and construction, epithallial cells, different types of intercellular connections (secondary pit connections or cell fusions), number of conceptacular pores, disposition of reproductive structures in the conceptacular chamber, and the sporangial caps, among others (Mason, 1953; Cabioc, 1972; Johansen, 1981; Woelkerling and Irvine, 1986; Woelkerling, 1988, among others).

However, it is very difficult to manipulate these algae for purposes of structural analysis, mainly due to their external similarities, and their growth form which can be either crustose or protuberant. These characteristics make it difficult to orient the sections precisely and to impregnate the cellular walls with calcium carbonate, making it necessary to use a decalcification pre-treatment before dying. Further, the sections of the thallus do not show a high contrast when observed in optical microscopy. To solve this difficulty, it is important to use a dying technique that will facilitate the distinction of the different cell characteristics that are necessary for the taxonomic observations.

The dying techniques mentioned in the phycological literature are: Phosphotungstic hematoxylin (Suneson, 1937; Adey, 1970; Adey and Johansen, 1972; Townsend, 1981; Cambell and Woelkerling, 1990), Delafield's hematoxylin (Mason, 1953), aqueous potassium permanganate (Woelkerling, 1978; Jones and Woelkerling, 1984; Cambell and Woelkerling, 1990), Harris-Ehrlich's hematoxylin with a counterstain of eosin-safranin (Johansen, 1969; Johansen, 1970), acid fuchsin-hematoxylin (Riosmena-Rodríguez, 1991), hematoxylin-eosin (Riosmena-Rodríguez, 1993), aqueous aniline blue (Jones and Woelkerling, 1984), light green-hematoxylin (Suneson, 1982), Periodic Acid Schiff's reagent (PAS test) (Matty

y Woelkerling, 1984), hematoxilina verde luz (Suneson, 1982), ácido peryódico con reactivo de Schiff (prueba PAS) (Matty y Johansen, 1981; Walker y Moss, 1984), azul de toluidina "O" en tetraborato de sodio (Woelkerling y Ducker, 1987), rojo de rutenio y azul de bromofenol (Matty y Johansen, 1981). Estas técnicas han permitido observar estructuras en el talo de las algas coralinas que son utilizadas principalmente en la determinación de ejemplares en estudios de desarrollo (Cabioch, 1972) o identificación y determinación de sustancias (Matty y Johansen, 1981). Sin embargo, en la mayor parte de los trabajos no se mencionan el tipo de resultados obtenidos con cada técnica ni porque se prefieren unas tinciones a otras.

Por lo anterior, los propósitos de este trabajo fueron aplicar y ensayar las diversas técnicas de tinción que han sido utilizadas, varias de las cuales son de uso común en angiospermas, así como precisar sus modificaciones para el estudio de las estructuras de importancia taxonómica de las algas coralinas no geniculadas, fundamentalmente para su observación con microscopía de luz.

## MATERIAL Y METODOS

El material biológico usado para el análisis histológico fue obtenido de las muestras provenientes de Santa Elena, Oaxaca, y Puerto Escondido, Guerrero, de la colección del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME). Se procesaron nueve ejemplares, pertenecientes a las muestras registradas con los números PTM 2802, PTM 3273, PTM 3351, PTM 4121, PTM 4124, PTM 4236, PTM 4246, PTM 4248 y PTM 4250, correspondientes a los géneros *Lithophyllum* sp. y *Spongites* sp., las cuales se conservan en formol glicerinado al 4%. De cada ejemplar se obtuvieron en promedio de 10 a 15 laminillas para análisis y observación.

El material procesado fue descalcificado con una solución de ácido nítrico 0.6 N (Woelkerling, 1978) de 2 a 24 h, de acuerdo con el tamaño y grosor del ejemplar. La solución fue sustituida periódicamente, y después el material se lavó en agua destilada, por 10 min.

and Johansen, 1981; Walker and Moss, 1984), toluidine blue "O" in sodium tetraborate (Woelkerling and Ducker, 1987), ruthenium red and mercuric bromophenol blue (Matty and Johansen, 1981). These dyeing techniques have allowed the observation of thallus structures of coralline red algae which are used mainly for species determination in developmental studies (Cabioch, 1972), or in identifying different substances in the algae (Matty and Johansen, 1981). However, in the majority of the studies there is no mention of the results obtained with each technique, nor of the reasons for selecting certain dyeing techniques against others.

Considering the above, the objectives of this study were to test the different dyeing techniques mentioned in the literature, many of which are commonly used on angiosperms, as well as to specify modifications of these techniques, in order to facilitate the study of structures of nongeniculate coralline red algae which are important in taxonomy. These modified techniques make it easier to observe the algae under optical microscopy.

## MATERIAL AND METHODS

The biological material used in the histological analysis was obtained from samples from Santa Elena, Oaxaca, and Puerto Escondido, Guerrero. These collections are kept at the herbarium of the *Facultad de Ciencias* (FCME), of the *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM). Nine samples of species from the genera *Lithophyllum* sp. and *Spongites* sp. were processed, corresponding to collection numbers PTM 2802, PTM 3273, PTM 3351, PTM 4121, PTM 4124, PTM 4236, PTM 4246, PTM 4248 and PTM 4250. The material is preserved in a formaldehyde solution at 4%. An average of 10 to 15 slides were obtained from each sample to be analyzed.

The samples were decalcified with a solution of nitric acid 0.6 N (Woelkerling, 1978) for 2 to 24 h, depending on the size and thickness. The solution was changed periodically. Once decalcified, the samples were washed with distilled water for 10 min.

La deshidratación se realizó en una serie gradual de alcohol etílico (15, 30, 60, 90, 96 y 100°) a intervalos de 20 min, y los especímenes se pasaron luego a xilol durante 15 min. Después, los fragmentos fueron llevados a una solución de xilol y Paraplast (*Tissue embedding medium, Oxford, LABWARE, London*) en proporción de 1:1, mantenidos a 58°C por 24 h, y luego incluidos en Paraplast puro durante 24 h, a 58°C.

La inclusión en parafina se hizo según el método de Johansen (1940), con las siguientes modificaciones: el medio de inclusión fue Paraplast Plus y se omitió el paso de parafina y xilol 1:2.

Se usó un microtomo rotatorio para obtener cortes seriados de 5 a 15  $\mu\text{m}$  (dependiendo de las características del material), en planos radiales longitudinal y transversal. Los cortes fueron montados utilizando el adhesivo de Haupt (Curtis, 1986), desparafinados durante una hora a 58°C e inmediatamente llevados a xilol, dos cambios por 5 min. Se rehidrataron en la serie de alcoholes graduados hasta agua destilada, a intervalos de 3 min por cada cambio.

Una vez rehidratados los cortes, se procedió con las técnicas de tinción. Después de la tinción, las preparaciones se deshidrataron nuevamente y fueron montadas en bálsamo de Canadá.

Se analizaron las laminillas en un microscopio con contraste interferencial y se fotografiaron con película Kodak T-Max. Las laminillas y fotografías se depositaron en la colección correspondiente del herbario (FCME), con los mismos números de herbario de las muestras de donde provienen los ejemplares.

Las técnicas de tinción utilizadas se listan a continuación.

#### Colorantes morfológicos:

Hematoxilina de Harris (Curtis, 1986), hematoxilina de Delafield (Johansen, 1940), hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (Ramón y Cajal y de Castro, 1972), azul de toluidina "O" (Curtis, 1986), azul de anilina (Jones y Woelkerling, 1984), permanganato de potasio (Woelkerling, 1978; Curtis, 1986), azul de

Dehydration was done with a gradual series of ethyl alcohol (15, 30, 60, 90, 96 and 100°) every 20 min and finally with xylol for 15 min. After this, the sections were immersed in a xylol-Paraplast solution (*Tissue Embedding Medium, Oxford LABWARE, London*) in a 1:1 ratio, kept at 58°C during 24 h and then placed in pure Paraplast for 24 h at 58°C.

The paraffin methods used followed Johansen's technique (1940) but with the following modifications: the paraffin embedding medium was Paraplast Plus, and the paraffin-xylol 1:2 step was omitted.

A rotary microtome was used to obtain the sections, which were cut in series of 5 to 15  $\mu\text{m}$  (depending on the characteristics of the samples) in longitudinal and transversal orientation. The sections were mounted with Haupt's adhesive (Curtis, 1986), removed from the paraffin for one hour at 58°C and placed immediately in xylol with two changes at 5 min intervals. Rehydration was done with a series of graduated alcohols and finally distilled water. Changes were done every 3 min.

After rehydration, the sections were dyed following the different techniques. After dyeing, the sections were dehydrated once more and then mounted in Canada Balsam.

The slides were analyzed with a differential interference contrast microscope and photographs were taken with Kodak T-Max film. Both the slides and photographs are now part of the collection of the herbarium (FCME), and are catalogued under the same collection numbers described above.

The following staining techniques were used.

#### Morphological dyes:

Harris' hematoxylin (Curtis, 1986), Delafield's hematoxylin (Johansen, 1940), Mallory's phosphotungstic hematoxylin (Ramón y Cajal and de Castro, 1972), toluidine blue "O" (Curtis, 1986), aniline blue (Jones and Woelkerling, 1984), potassium permanganate (Woelkerling, 1978; Curtis, 1986), toluidine blue "O" in sodium tetraborate (Woelkerling and Ducker, 1987) and safranin-fast green

toluidina "O" en tetraborato de sodio (Woelkerling y Duker, 1987), safranina con verde rápido (Jensen, 1962; modificada por Engleman, comunicación personal).

#### Colorantes histoquímicos:

Rojo de rutenio (Curtis, 1986), rojo "O" de aceite (Johansen, 1940; técnica modificada por Engleman, comunicación personal), prueba de PAS (Johansen, 1940; técnica modificada por Engleman, comunicación personal), azul de bromofenol mercúrico (Curtis, 1986), azul negro de naftol (Engleman, comunicación personal) y prueba de PAS combinada con azul negro de naftol (Engleman, comunicación personal).

Las técnicas fueron probadas de la manera original, es decir, de acuerdo con el autor de la técnica o como son descritas en los trabajos fitológicos, y modificadas para este trabajo según los resultados deseados.

#### RESULTADOS

El manejo de las diferentes técnicas de tinción empleadas permitió valorarlas y clasificarlas de acuerdo con los resultados proporcionados por cada una.

Los colorantes que mostraron poca afinidad con el talo de las coralinas fueron el azul de bromofenol mercúrico, el azul de toluidina "O" y el azul negro de naftol, que tiñeron sólo paredes celulares y estructuras reproductoras en azul muy claro y azul verdoso, respectivamente. Con azul negro de naftol se tiñeron además las células epiteliales. Las laminillas así teñidas no son evidentes en microscopía de campo claro, por lo que es indispensable el uso de filtros o iluminación de contraste de fases o interferencial, para hacerlas evidentes.

Entre los colorantes cuya afinidad con el talo fue mayor que la del grupo anterior están el rojo de rutenio y rojo "O" de aceite, con los que se tiñeron paredes celulares, puntos de unión intercelular, granulación intracelular, estructuras reproductoras, todo en tonos de rojo pálido. Estas técnicas son observables en microscopía de campo claro y las características del tejido se

(Jensen, 1962; modified by Engleman, personal communication).

#### Histochemical dyes:

Ruthenium red (Curtis, 1986), red "O" oil (Johansen, 1940; modified by Engleman, personal communication), PAS test (Johansen, 1940; modified by Engleman, personal communication), mercuric bromophenol blue (Curtis, 1986), naphthol blue black (Engleman, personal communication) and PAS test combined with naphthol blue black (Engleman, personal communication).

The staining techniques were tested according to the original description or as described in phycological studies. They were also modified for the present study.

#### RESULTS

After using the different staining techniques, they were compared and classified according to the results.

The dyes with a low affinity for the thallus of coralline red algae were mercuric bromophenol blue, toluidine blue "O" and naphthol blue black. These dyes stained only cell walls and reproductive structures in very light blue and green blue, respectively. Naphthol blue black also stained epithelial cells. When sections are stained so lightly, it is difficult to distinguish different structures under optical microscopy, unless filters or differential interference contrast are used.

A second group included dyes with a higher affinity for the thallus: ruthenium red and red "O" oil. Cell walls, pit connections, intracellular granulation and reproductive structures were stained in light red by these dyes. With these techniques, cellular characteristics were observed with optical microscopy, and the observations were enhanced with differential interference contrast or by using different types of filters in the microscope.

The combined techniques, naphthol blue black combined with PAS test and toluidine blue "O" with sodium tetraborate, were also ef-

evidencian aun mejor con iluminación de contraste de fases o interferencial, o con el uso de filtros.

Las técnicas combinadas, como la que utiliza el azul negro de naftol con la prueba de PAS y el azul de toluidina "O" en tetraborato de sodio, tiñen bien el tejido. Sin embargo, el manejo de estas técnicas es un poco complejo, pues los resultados de tinción variaron en los diferentes ejemplares. Las pequeñas variaciones en tiempo de permanencia del tejido en el colorante pueden provocar una sobretinción y un encubrimiento de las características anatómicas. Controlada esta situación, las laminillas son fácilmente observables en microscopía de campo claro.

Ahora bien, tres de las técnicas utilizadas,  $\text{KMnO}_4$  (procedimiento 2), la prueba de PAS y la safranina con verde rápido, tienen una reacción similar en el talo de las algas coralinas, pues tiñen tanto paredes como contenido celular, además de diferenciar el tejido en dos regiones evidentemente distintas por la cantidad de inclusiones celulares, la parte basal y la parte superior del tejido.

A continuación (tabla 1), se presentan las técnicas utilizadas, diferenciando, por un lado, colorantes morfológicos, que son todos aquéllos que reaccionan con las estructuras anatómicas y, por otro, colorantes histoquímicos, que son reactivos específicos para la identificación de sustancias tales como polisacáridos, lípidos insolubles y proteínas. En cada caso, se mencionan las modificaciones hechas, las cuales fueron, en general: tiempo de permanencia del tejido en el colorante, concentración, combinación de ellos o alguna variación en los pasos sugeridos en la técnica original. En la última columna, se señalan las estructuras que mejor resaltaron y la referencia donde se muestran.

Los mejores resultados fueron obtenidos con la hematoxilina de Harris y la hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, que tiñeron principalmente caracteres vegetativos relacionados con paredes celulares, núcleos, cloroplastos y estructuras reproductoras, en color rojo y violeta; el  $\text{KMnO}_4$  también tiñó paredes celulares y granulación intracelular, principalmente en tonos café pardos. Con estos colorantes, la

fective in staining the tissues. However, the use of these combined techniques is somewhat complicated, and the results differed among the samples. Small variations in permanence time of the tissue in the dyes resulted in an over-staining effect that masked the anatomical characteristics. Once this situation was controlled, the samples were easily observed with optical microscopy.

Three of the techniques tested,  $\text{KMnO}_4$ , procedure 2, PAS test and safranin-fast green, showed a similar reaction with the thallus of coralline red algae. These dyes stained cell walls and cellular contents. Their different effects made it feasible to distinguish two regions, basal and upper part of tissue, that are evidently very different in terms of the amount of cellular inclusions.

The techniques used are described in the following pages. The morphological dyes, those which react with different anatomical structures, and physiological dyes, specific reactants for the identification of substances such as polysaccharides, insoluble lipids and proteins, were separated. In each case the modifications used are mentioned, generally permanence time in the dyes, concentration, combination of different dyes or a variation in the original technique. The last column indicates the structures that were best distinguished with the techniques used, and the figure where this is shown.

The best results were observed with Harris' hematoxylin and Mallory's phosphotungstic hematoxylin, which mainly stained vegetative characters related to cell walls, nuclei, chloroplasts and reproductive structures in red and violet. On the other hand,  $\text{KMnO}_4$  gave the cell walls and intercellular granulation a grayish brown color. The tonality of both stains in the tissue is differential, allowing different structures to be highlighted. Their reaction with the tissues was easily observed with optical microscopy. The PAS test was one of the combined techniques which stained cell contents and granulations in intense pink, cell walls in light pink and intercellular connections in black. Cellular fusions were evident with the PAS test. Safranin-fast green stained the cell walls,

**Tabla 1.** Resultados de las tinciones utilizadas

Colorantes morfológicos	Modificación a la técnica	Resultados
Hematoxilina de Harris	Sin modificación.	Pared celular y núcleos en rojo. Figs. 1, 2.
Hematoxilina de Delafield	Las laminillas permanecieron en el colorante 30 min.	Pared celular y núcleos en rojo. Fig. 3.
H. fosfotúngstica de Mallory <sup>1</sup>	De la técnica original sólo se tomó la fórmula del colorante, se omitieron todos los pasos de la técnica de tinción sugeridos por el autor. Las laminillas permanecieron en el colorante 30 min.	Pared celular y cloroplastos en tonos morados. Figs. 4, 5.
Azul de toluidina "O"	El colorante se preparó con azul de toluidina O al 1%, en agua destilada. Las laminillas se tiñeron de 5 a 15 min, se enjuagaron en agua corriente y destilada, y se prosiguió con la deshidratación e inclusión.	Paredes celulares en azul claro, que presentaron apariencia de rigidez. Fig. 6.
Azul de anilina	Las laminillas se tiñeron en solución de anilina acuosa al 1%, de 15 a 30 min, se deshidrataron y montaron en bálsamo de Canadá. Otras laminillas se tiñeron de 5 a 15 min y se montaron en gelatina.	Paredes celulares y citoplasma teñidos muy ligeramente.
Permanganato de potasio (KMnO <sub>4</sub> )	Procedimiento 1. De acuerdo con la técnica de Woelkerling (1978), sin modificación Procedimiento 2. De acuerdo con la técnica de Curtis (1986). Las laminillas se tiñeron en solución acuosa de KMnO <sub>4</sub> al 2%, durante 15 min.	Paredes celulares y estructuras reproductoras en tonos de amarillo dorado y café. Se notan muy claramente los gránulos de almidón y las conexiones celulares. Figs. 7, 8.
Azul de toluidina "O" en tetraborato de sodio	Las preparaciones permanecieron en el colorante de 5 a 10 min.	Paredes celulares y células epiteliales. Fig. 9.
Safranina con verde rápido	Se desparafinaron los cortes, se hidrataron hasta alcohol al 50%, se tiñeron en solución de safranina al 1% en alcohol al 50%, por 1 h, se lavaron en alcohol de 50 a 96%, se contrastaron con solución verde rápido al 0.03% en alcohol al 96%, por 1 min después de que se lavaron en alcohol al 96%. Se terminó la deshidratación y se montaron.	Se diferenciaron dos regiones del talo: se tiñó la parte basal de rojo, paredes celulares y núcleos, y la parte superior de verde, paredes, núcleos, cloroplastos y otras inclusiones citoplásmicas. Figs. 10 a 12.

<sup>1</sup>Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory: Se preparó según la técnica original de Ramón y Cajal.

Hematoxilina	0.1 g
Acido fosfotúngstico	2.0 g
Agua destilada	100 ml
KMnO <sub>4</sub>	10 ml de solución al 0.25%

El colorante se dejó madurar durante varios meses antes de usarlo.



**Tabla 1** (Cont.)

Colorantes histoquímicos	Modificación a la técnica	Resultados
Rojo de rutenio	Los ejemplares se fijaron en formol cálcico <sup>2</sup> , y los cortes permanecieron en el colorante de 60 a 90 min.	Reacción positiva. Paredes celulares y granulación en la región basal. Figs. 13, 14.
Rojo "O" de aceite	Los ejemplares se fijaron en formol cálcico <sup>2</sup> . Los cortes se tiñeron de 60 a 90 min en solución de rojo "O" de aceite saturado (0.1% en 25% de n-butanol y 75% de etilenglicol). Se lavaron en alcohol al 60%, rápidamente, y después en alcohol al 50%. Se pasaron a agua destilada y se montaron en gelatina.	Reacción positiva. Paredes celulares, granulación en la región basal, estructuras reproductoras, uniones intercelulares. Figs. 15, 16.
Prueba de PAS	Reactivo de Schiff: fuccina básica, 0.1 g; bisulfito de sodio, 2 g; ácido acético, 2 ml; alcohol 50%, 2 ml; agua destilada, 100 ml. Acido peryódico: ácido peryódico, 0.6 g; ácido acético al 2%, 2 ml; agua destilada, 100 ml. Después de que las laminillas se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 15 min, se lavaron con agua corriente y por segunda vez con ácido acético al 2%, por 2 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, se deshidrataron y se montaron.	Reacción positiva. Paredes celulares en tonos rosa claro e inclusiones celulares, principalmente en la región basal, en tonos de magenta. Uniones celulares en negro y fusiones celulares muy evidentes. En las estructuras reproductoras carposporangiales y tetrasporangiales se evidencia claramente el núcleo. Las fusiones celulares se distinguen muy bien. Figs. 17 a 21.
Azul negro de naftol	Las laminillas se tiñeron de 15 a 20 min en solución 1:1 de alcohol al 50% y colorante al 1%.	Reacción negativa. Paredes celulares y células epitales en tonos muy claros. Figs. 22, 23.
Azul de bromofenol mercúrico	Las laminillas se tiñeron durante 30 a 60 min.	Reacción negativa. Se tiñen algunos núcleos y muy tenuemente las paredes celulares. Figs. 24, 25.
Azul negro de naftol combinado con la prueba de PAS	Ambas técnicas sin modificaciones adicionales.	Reacción policromática: paredes celulares en azul intenso, rosa y morado; estructuras reproductoras y células epitales en azul verde claro; el contenido celular en tonos violeta.

<sup>2</sup>Formol cálcico:

Solución de formalina al 40%	10 ml
Cloruro de calcio al 10% en agua	10 ml
Agua destilada	100 ml

La solución se neutralizó con carbonato (Backer, 1946, en Jensen, 1962).

**Table 1.** Results with the different dying techniques.

Morphological dyes	Modification to the technique	Results
Harris' hematoxylin	No modification.	Cell walls and nuclei were stained in red. Figs. 1, 2.
Delafield's hematoxylin	The sections remained in the dye for 30 min.	Cell walls and nuclei were stained in red. Fig. 3.
Mallory's phosphotungstic hematoxylin <sup>1</sup>	All the staining steps suggested by the author were omitted, except the formula for the dye. The sections remained in the dye for 30 min.	Cell walls and chloroplasts were stained in purple. Figs. 4, 5.
Toluidine blue "O"	The dye was prepared with toluidine blue "O" to 1% in distilled water. The sections were stained during 5 to 15 min, rinsed with tap and distilled water, followed by dehydration and mounting.	Cell walls were stained in light blue. They looked quite rigid. Fig. 6.
Aniline blue	The sections were stained in 1% aqueous aniline solution during 15 to 30 min, then were dehydrated and mounted in Canada Balsam. Other sections were stained during 5 to 15 min and mounted in jelly.	Cell walls and cytoplasm were lightly stained.
Potassium permanganate (KMnO <sub>4</sub> )	Procedure 1. Woelkerling's technique (1978) was followed without any modification. Procedure 2. Curtis' technique (1986) was used. The sections were stained with a 2% aqueous KMnO <sub>4</sub> solution during 15 min.	Cell walls and reproductive structures were stained in golden yellow and brown. Starch granulation and cell connections were clearly distinguishable. Figs. 7, 8.
Toluidine blue "O" in sodium tetraborate	The sections remained in the dye during 5 to 10 min.	Cell walls and epithelial cells. Fig. 9.
Safranin-fast green	The paraffin was removed from sections, then dehydrated to 50% alcohol and stained in a 1% safranin solution in 50% alcohol for 1 h. Then they were washed in 50 to 96% alcohol and contrasted in 0.03% fast green in alcohol at 96% during 1 min after they were washed in 96% alcohol. The dehydration procedure continued and the sections were mounted.	The basal part of the thallus was stained in red; cell walls, nuclei and the upper part of the thallus in green. Cell walls, nuclei, chloroplasts and other cytoplasmic inclusions were also stained. Figs. 10, 12.

<sup>1</sup>Mallory's phosphotungstic hematoxylin: Prepared according to the original technique by Ramón y Cajal:

Hematoxylin	0.1 g
Phosphotungstic acid	2.0 g
Distilled water	100 ml
KMnO <sub>4</sub> solution at 0.25%	10 ml

The dye was matured during several months before it was used.

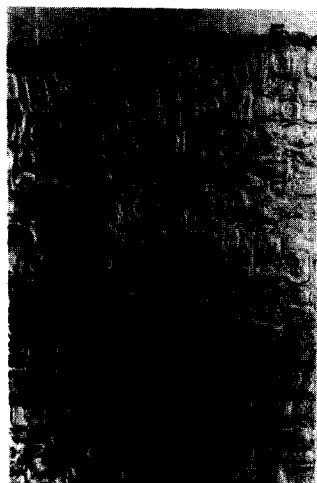
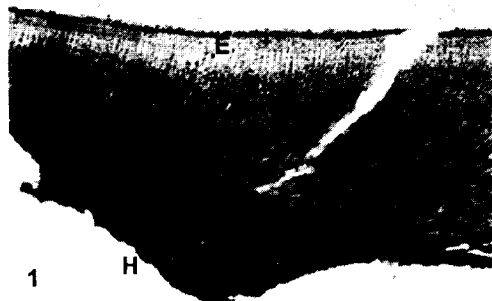
**Table 1** (Cont.)

Histochemical dyes	Modification to the technique	Results
Ruthenium red	The samples were calcic formaldehyde <sup>2</sup> fixed and the sections remained in the dye during 60 to 90 min.	Positive reaction. Cell walls and granulation in the basal region were observed. Figs. 13, 14.
Red "O" oil	The samples were calcic formaldehyde <sup>2</sup> fixed. The sections were dyed during 60 to 90 min in a red "O" oil saturated solution (0.1% in 25% n-butanol and 75% ethylenglycol). They were quickly washed in alcohol at 60% and then in alcohol at 50%. They were transferred to distilled water and mounted in jelly.	Positive reaction. Cell walls, granulation in the basal region, reproductive structures and cell connections were observed. Figs. 15, 16.
PAS test	Schiff's reagent: 0.1 g basic fuccine; 2 g sodium bisulphite; 2 ml acetic acid; 2 ml 50% alcohol; 100 ml distilled water. Periodic acid: 0.6 g periodic acid; 2 ml 2% acetic acid; 100 ml distilled water. After the sections were stained in Schiff's reagent during 15 min, they were washed with tap water and with 2% acetic acid during 2 min. Afterwards, they were washed with distilled water, dehydrated and mounted.	Positive reaction. Cell walls were stained in light pink; cellular inclusions, mainly in the basal region, in magenta tones, and cell connections in black. Cell fusions were obvious. The nuclei were clearly visible in both the carposporangial and tetrasporangial reproductive structures. Cell fusions were clearly distinguishable. Figs. 17 to 21.
Naphthol blue black	The sections were stained during 15 to 20 min in a 1:1 solution of 50% alcohol and 1% dye.	Negative reaction. Cell walls and epithallial cells were lightly colored. Figs. 22, 23.
Mercuric bromophenol blue	The sections were stained during 30 to 60 min .	Negative reaction. Some nuclei were stained and the cell walls were lightly colored. Figs. 24, 25.
Naphthol blue black combined with PAS test	Both techniques were used without any additional modification	Polychromatic reaction. Cell walls in intense blue, pink and purple; reproductive structures and epithallial cells in light green blue; cellular contents in different shades of violet.

<sup>2</sup> Calcic Formaldehyde:

Formaldehyde solution at 40% 10 ml  
 Calcium chloride at 10% 10 ml  
 Distilled water 100 ml

The solution was neutralized with carbonate (Backer, 1946, in Jensen, 1962).



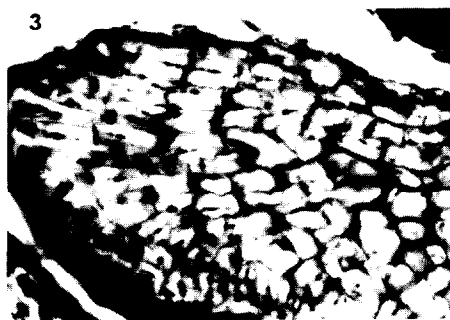
#### Hematoxilina de Harris/Harris' Hematoxylin

**Figura 1.** *Lithophyllum* sp. Arreglo general del talo. Nótese la diferencia en tamaño, forma y arreglo celular de la región basal (H) contrastada con la región superficial (E) (10x, campo claro).

**Figure 1.** *Lithophyllum* sp. General characteristics of thallus. Note the difference in cellular array, size, and shape in the basal region (H) contrasted with the upper region (E) (10x, bright field).

**Figura 2.** *Lithophyllum* sp. Vista de la zona peritalial (P) y epitalial (E) del talo. Megacélula (MG). (40x, campo claro).

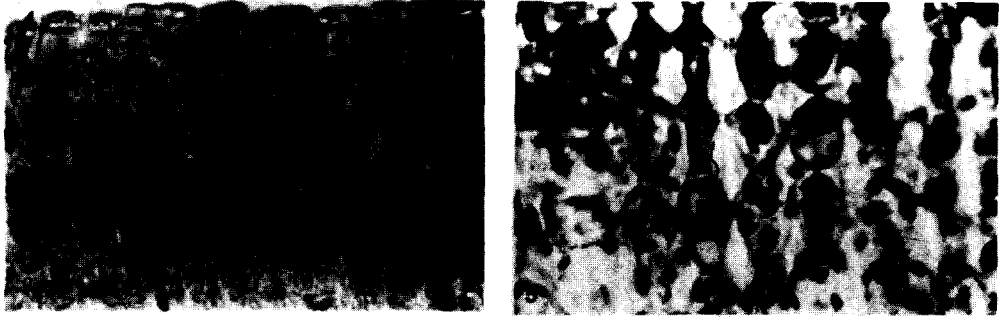
**Figure 2.** *Lithophyllum* sp. Perithallial (P) epithallial (E) zone of the thallus. Megacells (MG) (40x, bright field).



#### Hematoxilina de Delafield/Delafield's Hematoxylin

**Figura 3.** *Lithophyllum* sp. Parte marginal del talo (40x, campo claro).

**Figure 3.** *Lithophyllum* sp. Margin of the thallus (40x, bright field).



**Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory/Mallory's phosphotungstic hematoxylin**

**Figura 4.** *Lithophyllum* sp. Peritalo (P) y epitalo (E) (100x, campo claro).

**Figure 4.** *Lithophyllum* sp. Perithallus (P) and epithallus (E) (100x, bright field).

**Figura 5.** *Lithophyllum* sp. Células de la región peritalial (100x, campo claro), donde se señalan los puntos de unión primarios y secundarios.

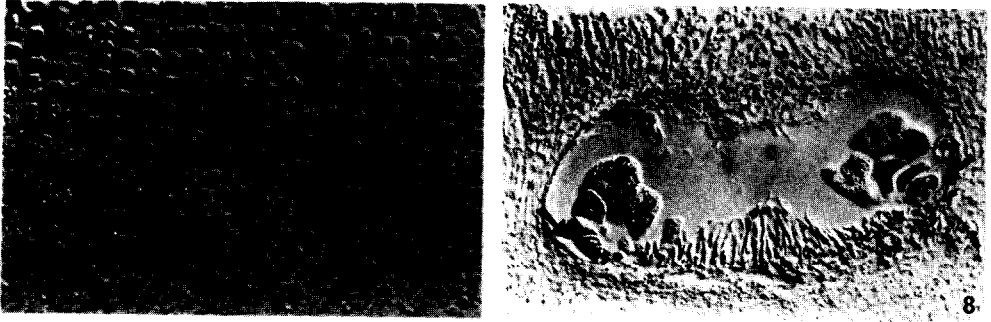
**Figure 5.** *Lithophyllum* sp. Perithallial region showing the primary and secondary pit connections (100x, bright field).



**Azul de toluidina "O"/Toluidine blue "O"**

**Figura 6.** *Spongites* sp. Arreglo general del talo (10x, contraste interferencial).

**Figure 6.** *Spongites* sp. General characteristics of the thallus (10x, differential interference contrast).



**Permanganato de potasio/Potassium permanganate**

**Figura 7.** *Lithophyllum* sp. Vista de la región peritalial (40x, contraste interferencial).

**Figure 7.** *Lithophyllum* sp. Upper perithallial region (40x, differential interference contrast).

**Figura 8.** *Lithophyllum* sp. Conceptáculo carposporangial, filamento gonimoblástico (flecha) y carposporas (C) (40x, contraste interferencial).

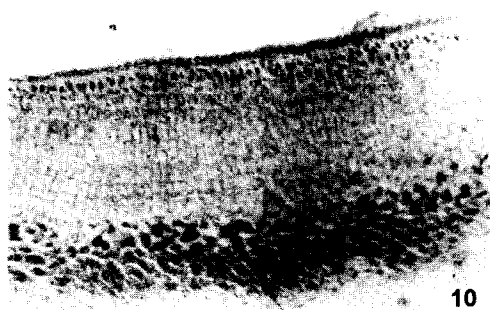
**Figure 8.** *Lithophyllum* sp. Carposporangial conceptacle, gonimoblast filaments (arrow) and carpospores (C) (40x, differential interference contrast).



**Azul de toluidina "O" en tetraborato de sodio/Toluidine blue "O" in sodium tetraborate**

**Figura 9.** *Lithophyllum* sp. Conceptáculo tetrasporangial (10x, contraste interferencial).

**Figure 9.** *Lithophyllum* sp. Tetrasporangial conceptacle (10x, differential interference contrast).



#### Safranina con verde rápido/Safranine-fast green

**Figura 10.** *Lithophyllum* sp. Arreglo general del talo. Obsérvese la acumulación de gránulos de almidón en la región hipotalial (H) (10x, contraste interferencial).

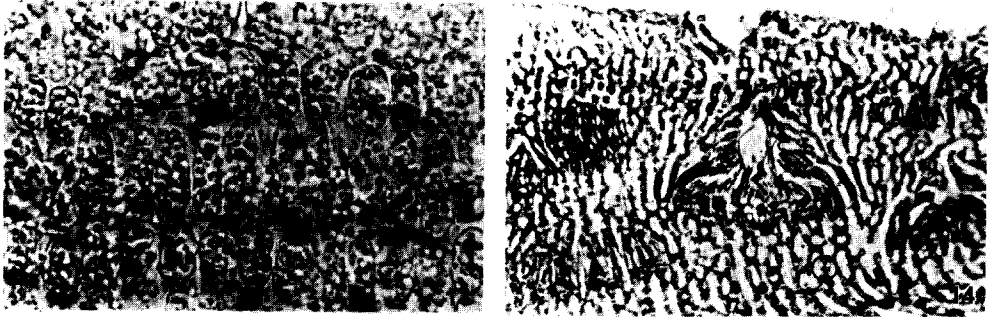
**Figure 10.** *Lithophyllum* sp. General characteristics of thallus. Note the granulation of polysaccharids in the basal region (H) (10x, differential interference contrast).

**Figura 11.** *Lithophyllum* sp. Células hipotaliales, donde se señalan las conexiones celulares secundarias (100x, contraste interferencial).

**Figure 11.** *Lithophyllum* sp. Hypothallial cells showing the secondary pit connections (100x, differential interference contrast).

**Figura 12.** *Spongites* sp. Conceptáculo tetrasporangial. En los tetrasporangios se distinguen los núcleos de las esporas (40x, contraste interferencial).

**Figure 12.** *Spongites* sp. Tetrasporangial conceptacle. The nuclei are evident in the tetrasporangial cells (40x, differential interference contrast).



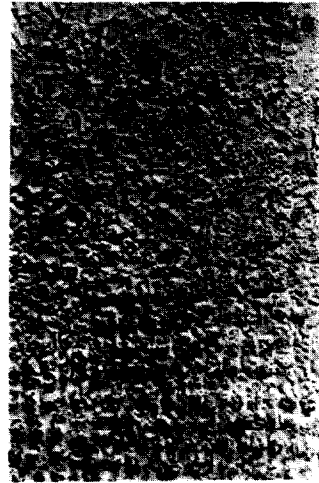
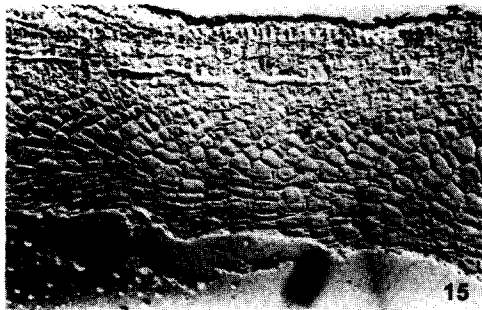
**Rojo de rutenio/Ruthenium red**

**Figura 13.** *Lithophyllum* sp. Células de la región hipotalial que muestran gran concentración de gránulos de almidón (100x, contraste interferencial).

**Figure 13.** *Lithophyllum* sp. Hypothallial cells showing starch granulation in high concentration (100x, differential interference contrast).

**Figura 14.** *Spongites* sp. Vista de la región peritalial, donde se señala una estructura reproductora carpogonial (al centro). Se evidencian las fusiones celulares (40x, contraste interferencial).

**Figure 14.** *Spongites* sp. Perithallial region showing a carpogonia structure (center). The cellular fusions are evident (40x, differential interference contrast).



**Rojo "O" de aceite/Red "O" oil**

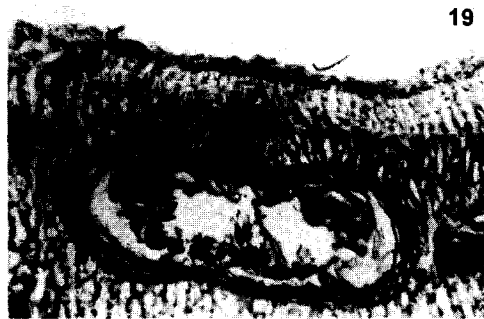
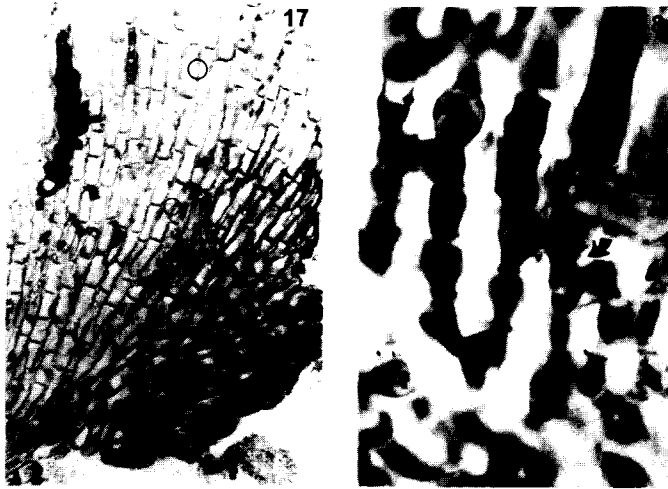
**Figura 15.** *Lithophyllum* sp. Vista panorámica (10x, contraste interferencial). Arreglo general del talo.

**Figure 15.** *Lithophyllum* sp. General characteristics of the thallus (10x, differential interference contrast).

**Figura 16.** *Lithophyllum* sp. Región hipotalial (H). Observe la alta concentración de inclusiones granulares de almidón (40x, contraste interferencial).

**Figure 16.** *Lithophyllum* sp. Hypothallial region (H). Note the high concentration of starch granulation (40x, differential interference contrast).





**Prueba de PAS/PAS test**

**Figura 17.** *Lithophyllum* sp. Región hipotalial, donde se evidencian las conexiones celulares secundarias en las caras laterales de las células (40x, campo claro).

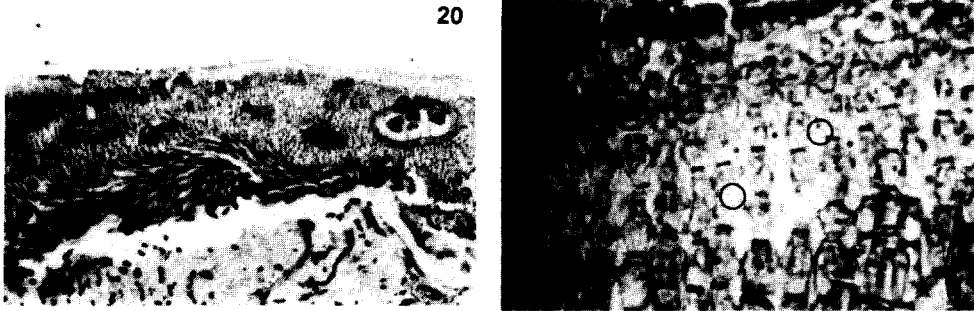
**Figure 17.** *Lithophyllum* sp. Hypothallial region showing the secondary pit connections in the lateral walls (40x, bright field).

**Figura 18.** *Spongites* sp. Se señalan conexiones celulares primarias a lo largo de un filamento y las fusiones celulares entre filamentos (flecha) (100x, campo claro).

**Figure 18.** *Spongites* sp. Note the primary pit connections in the filaments and the cellular fusions between the filaments (arrow) (100x, bright field).

**Figura 19.** *Spongites* sp. Conceptáculo carposporangial. Se observa el filamento gonimoblástico (flecha) desarrollado lateralmente (40x, campo claro).

**Figure 19.** *Spongites* sp. Carposporangial conceptacle. Note the laterally developed gonimoblastic filament (arrow) (40x, bright field).



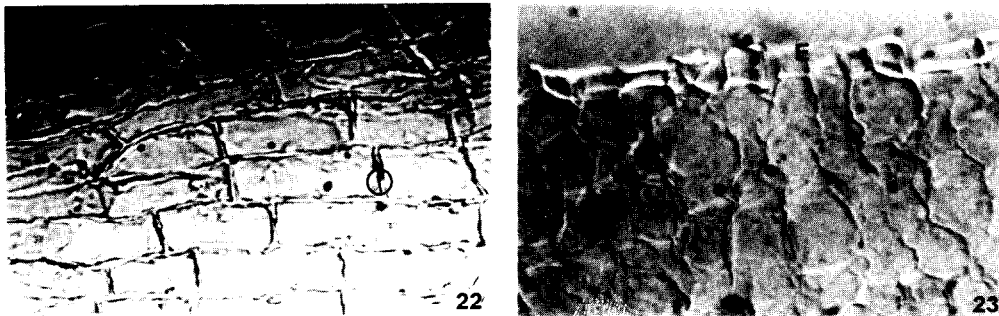
### Prueba de PAS/PAS test

**Figura 20.** *Spongites* sp. Panorámica del talo, donde se presentan dos tipos de estructuras reproductoras, los carpogonios (CG) y los carposporangios (CP).

**Figure 20.** *Spongites* sp. General characteristics of the thallus showing two types of reproductive structures, carpogonia (CG) and carposporangia (CP).

**Figura 21.** *Lithophyllum* sp. Células peritiales. Se señalan las conexiones celulares primarias y secundarias (100x, campo claro).

**Figure 21.** *Lithophyllum* sp. Perithallial cells. Note the primary and secondary pit connections (100x, bright field).



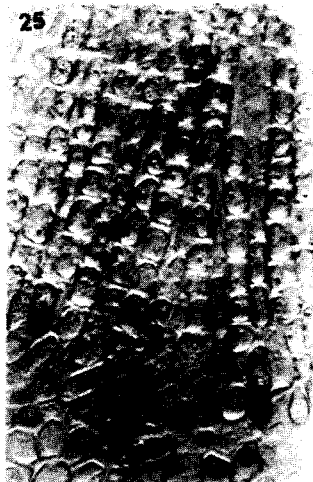
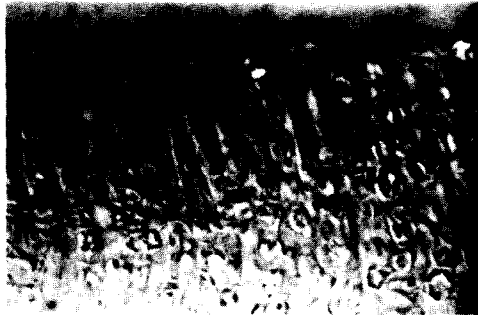
### Azul negro de naftol/Naphthol blue black

**Figura 22.** *Lithophyllum* sp. células hipotiales. Se observan conexiones intercelulares primarias (en círculos) (10x, contraste interferencial).

**Figure 22.** *Lithophyllum* sp. Hypothallial cells. Note the primary pit connections (circles) (10x, differential interference contrast).

**Figura 23.** *Lithophyllum* sp. células epitiales (E) (100x, contraste interferencial).

**Figure 23.** *Lithophyllum* sp. Epithallial cells (E) (100x, differential interference contrast).



**Azul de bromofenol mercúrico/Mercuric bromophenol blue**

**Figura 24.** *Lithophyllum* sp. Grupo de megacélulas (flecha) en la región epitalial.

**Figure 24.** *Lithophyllum* sp. Epithallial region showing megacells (arrow).

**Figura 25.** *Lithophyllum* sp. Vista general del hipotalo (40x, contraste interferencial).

**Figure 25.** *Lithophyllum* sp. General view of the hypothallus (40x, differential interference contrast).

tinción de estructuras en el talo es complementaria, por lo cual se resaltan diferentes estructuras. Su reacción con el tejido es fácilmente observable en microscopía de luz. Entre las técnicas combinadas estuvieron la prueba de PAS, que tiñó contenido celular y granulaciones en tonos de rosa claro y paredes celulares en negro, haciendo evidentes las fusiones celulares, y la safranina con verde rápido, que tiñó paredes celulares, núcleos, cloroplastos, puntos de unión intercelular, estructuras reproductoras y granulación interna. Las laminillas teñidas con los colorantes de este grupo fueron fácilmente observables en microscopía de luz.

## DISCUSION

Varias de las técnicas de coloración utilizadas para este estudio sólo se han aplicado a plantas vasculares, y se apreció que producen resultados distintos en el talo de las algas coralinas no geniculadas. Sin embargo, cuando se varió la concentración de los colorantes, combinándolos o cambiando el tiempo de permanencia del tejido en ellos, se obtuvieron resultados favorables que contrastaron y remarcaron las estructuras celulares de interés taxonómico, tanto vegetativo como reproductivo, útiles para la identificación genérica y específica, lo cual fue el objetivo central del trabajo.

Por otra parte, estos resultados diferenciales debidos a la diversidad anatómica y citológica existente en los tejidos vegetales (talos algales y plantas vasculares) hacen evidente una diversidad fisiológica y bioquímica, que en este estudio se describe sólo en función de los resultados obtenidos con cada tinción.

A continuación se discuten algunos de los resultados.

### Colorantes morfológicos

La hematoxilina, de acuerdo con Jensen (1962), es un colorante de acción progresiva que, en plantas vasculares, tiñe de rojo las paredes celulósicas, cromatina, nucléolo, mitocondrias y otras inclusiones celulares, y es un buen colorante nuclear para algas y hongos. En el

nuclei, chloroplasts, pit connections, reproductive structures and inside granulation. The sections stained with dyes from this group were easily observed under optical microscopy.

## DISCUSSION

Several of the staining techniques that were used in this study had only been used in vascular plants, and gave different results when applied to nongeniculate coralline red algae. These dyes, however, were able to stain and give contrast to different cell structures, both vegetative and reproductive, that are of taxonomic interest in terms of species and genus identification.

The great variability in anatomical and cytological characteristics of plant tissues (both in vascular plants and in algae) observed with the different staining methods, is a result of biochemical and physiological diversity. This diversity is discussed based on the results observed with each technique.

The results are discussed in the following paragraphs.

### Morphological dyes

According to Jensen (1962), hematoxylin is a progressive dye which in vascular plants stains the cellulosic walls, chromatin, nuclei, mitochondria and other cell inclusions in red. This author mentions that hematoxylin is a good dye for the nuclei in algae and fungi. Adey (1966) on the other hand, mentions in his taxonomical study that all the sporangial caps of the Lithothamniae are strongly stained with Delafield's hematoxylin, and adds that the intensity of the color represents the developmental stages of the reproductive structures.

Johansen (1969) mentions that Harris' and Erlich's hematoxylin, at times contrasted with eosin, stain the inside layer of the cell wall, but not the outside layer or the middle lamellae. Thus, only the cell lumen is outlined.

Mallory's phosphotungstic hematoxylin is a technique generally applied on animal tissues. It shows a polychromatic reaction and mainly

estudio taxonómico hecho por Adey (1966), se menciona que en todas las especies del grupo Lithothamniae los tapones esporangiales se tiñen fuertemente con hematoxilina de Delafield y es reconocible un patrón de intensidad de tinción, de acuerdo con el estado de desarrollo de las estructuras reproductoras.

Johansen (1969) menciona que las hematoxilinas de Harris y de Erlich, algunas veces contrastadas con eosina, tiñen la capa interna de la pared celular de células vegetativas pero no la capa externa o la lamela media. Así solamente el lumen celular es delineado en material teñido y seccionado.

La hematoxilina fosfotúngstica de Mallory es una técnica aplicada en tejidos animales, la cual tiene una reacción policromática que diferencia principalmente células de la neuroglia. En la literatura revisada no se encontró ninguna referencia de su uso en plantas vasculares, y en las referencias de la literatura ficológica donde ésta es mencionada no se señala el procedimiento seguido, por lo que se optó por utilizar el colorante de la técnica de Ramón y Cajal, y de Castro (1972). Adey (1966) afirma que los tapones esporangiales de las especies de *Lithothamnium* se tiñen con este colorante, al igual que con la hematoxilina de Delafield.

El azul de toluidina "O", de acuerdo con Curtis (1986), es una tinción policromática para paredes celulares en plantas vasculares; con él se reconocen paredes lignificadas, parénquima, colénquima y tubos cribosos. No se encontró ningún informe de su uso en algas.

El azul de anilina, de acuerdo con Johansen (1940) y Jensen (1962), es un colorante de uso primario utilizado en el estudio de talos algales, que tiñe tanto paredes celulares como citoplasma. Norris (1957) menciona que actúa como un colorante ácido y que no tiene mucha afinidad con los núcleos.

En plantas vasculares, el  $\text{KMnO}_4$  puede ser usado como fijador (González-Santander 1968, técnica modificada para tejidos vegetales por Esquivel-Huesca, comunicación personal). Este retiene las características de las paredes celulares con muy poca alteración, aunque lava la mayor parte del contenido celular. Mientras más tiempo de fijación se dé a los ejemplares, más

differentiates neuroglia cells. There was no evidence in the literature that this technique has ever been used in vascular plants. The few references related to algae do not mention the procedure that was followed, and hence, it was decided to use the technique described by Ramón y Cajal and de Castro (1972). Adey (1966) mentions that sporangial caps in species from *Lithothamnium* are well stained with both Mallory's and Delafield's hematoxylin.

According to Curtis (1986), toluidine blue "O" is a polychromatic staining method for cell walls in vascular plants. With this method it is possible to recognize lignified walls, parenchyma, collenchyma, and sieve tubes. No reference was found on the use of this dye in algae.

Johansen (1940) and Jensen (1962) state that aniline blue is a primary dye used for algal thalli. It dyes both the cell walls and the cytoplasm. Norris (1957) mentions that it acts as an acid dye and does not show much affinity for nuclei.

$\text{KMnO}_4$  may be used as a fixative in vascular plants (González-Santander, 1968; modified by Esquivel-Huesca for plant tissues, personal communication).  $\text{KMnO}_4$  does not alter cell wall characteristics, but washes out a great deal of the cell contents. The longer the tissues remain in the fixative, the more cell contents will be washed out.  $\text{KMnO}_4$  may also be used as a dye once the tissues have been fixed and histologically processed (Curtis, 1986). In this case, tannins and carbohydrates are stained in brownish tones.

Both methods were used for the coralline algae. First,  $\text{KMnO}_4$  was used as a fixative (most commonly used by Woelkerling in his latest work). In this case, cell walls and pit connections were stained. Secondly,  $\text{KMnO}_4$  was used as a dye after the sections were ready for staining (table 1).

Except for Woelkerling and Ducker (1987), there was no reference found in the literature for vegetal microtechniques related to toluidine blue "O". In this procedure, sodium tetraborate acted as a mordant, and the dye reacted more intensively with the tissues.

The combined technique of safranine-fast green is commonly used by plant morpholo-

estructuras internas celulares se lavarán. Por otra parte, se utiliza como colorante después de que los ejemplares han sido previamente fijados y procesados histológicamente (Curtis, 1986). En este caso tiñe taninos y carbohidratos en tonos pardos.

En las coralinas se utilizaron los dos métodos. Primero fue aplicado como fijador (el más común en los últimos años en la mayor parte de los trabajos realizados por Woelkerling), y se observó que se tiñen las paredes y las uniones celulares. Con el segundo método, el  $\text{KMnO}_4$  fue aplicado como colorante, una vez obtenidos los cortes (tabla 1).

De la técnica de azul de toluidina "O" en tetraborato de sodio no se encontró referencia en la literatura de microtecnia vegetal, y solamente la mencionan Woelkerling y Ducker (1987). En este procedimiento, el tetraborato de sodio actúa como mordente, y el colorante reacciona más intensamente con el tejido.

La técnica combinada de safranina con verde rápido es de uso común entre los morfólogos vegetales. De acuerdo con Johansen (1940), la safranina tiñe los núcleos de rojo brillante, así como las paredes celulares cutinizadas y lignificadas, mientras que el verde rápido colorea de manera brillante el citoplasma y las paredes celulares, en plantas vasculares. Este autor indica también que unas paredes celulares en cierto estado de desarrollo pueden aparecer más o menos teñidas con safranina y otras con verde rápido. En los resultados obtenidos (tabla 1), se presentó un gradiente de coloración en el tejido, de rojo en las partes basales o hipotalo hacia verde en las células más superficiales del peritalo y epitalo, lo cual podría representar un grado de madurez celular, siguiendo la línea de ideas propuesta por Johansen. Por otra parte, aunque con esta técnica no se tiñen los gránulos de almidón, se observan bien diferenciados (Fig. 19), y se reconoce una distribución regionalizada en el tejido, con mayor abundancia en la región basal o hipotalo.

#### Pruebas histoquímicas

El rojo de rutenio es específico para sustancias pécticas en plantas vasculares, de

gists. Johansen (1940) states that in vascular plants, safranin gives nuclei, cutinized and lignified cell walls a bright red color, while fast green stains the cytoplasm and cell walls. This author also mentions that the developmental state of the structures affects the intensity with which the different structures are stained. In the results obtained (tabla 1), it was possible to distinguish a gradient in color: tissues in the basal parts or hypothallus were stained in red, which gradually changed into green towards the more superficial cells from the perithallus and epithallus. Following Johansen's idea, this could represent a gradient in cell maturity as well. On the other hand, even though this technique does not stain starch granulation, they were easily recognizable (Fig. 19) and displayed a larger abundance towards the basal region or hypothallus.

#### Histochemical dye

According to Jensen (1962) and Curtis (1986), ruthenium red is specific for pectic substances in vascular plants. This test was also used by Matty and Johansen (1981) in a histochemical study they performed on *Corallina officinalis*. These authors observed a positive reaction in the cell walls and concluded that they contain cellulose and pectin. Further, the middle lamellae was pink in color. Nongeniculate algae also showed a positive reaction, and the cellular basal granulations were also stained.

In vascular plants, red "O" oil stains the cuticle and insoluble lipids red (Curtis, 1986). No reference of this method being used for algae was found in the literature. The reaction was almost identical to that of ruthenium red. However, it is important to note that this test is not permanent and the color disappears after a few days.

The PAS test (Johansen, 1940) is a reaction to identify any type of saccharids, especially insoluble polysaccharides such as starch. In vascular plants, starch is stained in a very intense pink while the cell walls are lighter. According to the studies with thalli of coralline algae, starch becomes more abundant as the

acuerdo con Jensen (1962) y Curtis (1986). Esta prueba fue utilizada por Matty y Johansen (1981) en un estudio histoquímico de *Corallina officinalis*, donde observaron una reacción positiva en las paredes celulares y concluyeron que éstas contienen celulosa y pectinas, y que, además, la lamela media se colorea en rosa. En las corallinas no geniculadas, se tiñeron también las granulaciones celulares basales.

El rojo "O" de aceite tiñe la cutícula y los lípidos insolubles de rojo en las plantas vasculares (Curtis, 1986). No se encontró ningún informe de su uso en algas. La reacción obtenida fue casi idéntica al rojo de rutenio. Sin embargo, cabe destacar que es una prueba no permanente, ya que después de unos días el color se pierde.

La prueba de PAS (Johansen, 1940) es una reacción para identificar casi cualquier tipo de azúcares, pero especialmente los polisacáridos insolubles, como el almidón. En plantas vasculares, tiñe éstos de rosa intenso y la pared puede resaltarse en tonos rosados. De acuerdo con los resultados obtenidos en el talo de las corallinas, se puede decir que los granos de almidón incrementan su abundancia en las células, de acuerdo con la edad de éstas y son más abundantes en las regiones basales. Esto viene a confirmar lo encontrado por Matty y Johansen (1981), quienes mencionan que la mayor parte del almidón está depositado en las regiones medulares de *C. officinalis*, y agregan que este reactivo tiñe la lamela media.

El azul de bromofenol mercúrico es un reactivo para reconocer proteínas en plantas vasculares (Curtis, 1986). Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares a los de Matty y Johansen (1981), pues la reacción fue casi nula. Las regiones del talo que reaccionaron positivamente, como las células epitaliales, estructuras reproductoras y paredes celulares, tuvieron tonalidades diferentes, lo cual seguramente indica que existen diferentes tipos y concentraciones de proteínas en esas estructuras.

El azul negro de naftol es otra prueba para identificar proteínas. No se encontró ningún informe de su uso en algas y en este estudio tuvo resultados muy similares al azul de bromofenol mercúrico.

cells age, and that basal regions are more starchy than others. This confirms the results by Matty and Johansen (1981) who found that most of the starch is deposited in the medullar regions of *C. officinalis*, and also adds that this reagent stains the middle lamellae.

Mercuric bromophenol blue is used to differentiate proteins in vascular plants (Curtis, 1986). The results of this experiment are very similar to those reported by Matty and Johansen (1981). In both studies, it was found that the reaction was almost null. However, several regions of the thallus, such as the epithallial cells, reproductive structures and cell walls were stained in different shades of blue, which shows that proteins in these structures are probably very different, and their concentrations may also vary among the structures.

Naphthol blue black is another reagent used to identify proteins. No reference was found for the use of this dye in algae. The results of this experiment were very similar to those observed with mercuric bromophenol blue.

The PAS test combined with naphthol blue black is a polychromatic test for vascular plants (Engleman, personal communication). Cell contents with saccharids become pink, while cell walls are blue. No report was found of this method being applied to algae.

In conclusion, not all the techniques tested in this study give results that are easily observable under optical microscopy. Thus, for everyday working routines the following procedures are recommended: Harris' hematoxylin, Mallory's phosphotungstic hematoxylin, safranin-fast green,  $\text{KMnO}_4$  and the PAS test. Their main advantages are low cost, and the feasibility of observing the different colored tissues under optical microscopy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dení Rodríguez Vargas, E. Mark Engleman and Ma. Esther Meave del Castillo for their valuable comments and suggestions after reading the manuscript. Also thanks to Ma. Luisa Martínez for the English version. This study received financial

La prueba de PAS combinada con azul negro de naftol es una prueba policromática para plantas vasculares, de acuerdo con Engleman (comunicación personal). Se tiñe de rosa parte del contenido celular que contenga azúcares y en tonos azules, las paredes celulares. No se encontró ninguna información de su uso en algas.

No todas las técnicas utilizadas en esta investigación son fácilmente observables en microscopía de campo claro, por lo que solamente se recomiendan como rutinas de trabajo cotidiano las siguientes: hematoxilina de Harris, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, safranina con verde rápido,  $\text{KMnO}_4$  y la prueba de PAS.

Sus ventajas son rapidez, bajo costo y que los resultados pueden observarse con equipo de microscopía sencillo.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece, a Dení Rodríguez Vargas, E. Mark Engleman y Ma. Esther Meave del Castillo, la lectura del manuscrito y sus valiosas observaciones. Este estudio fue posible gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

#### REFERENCIAS

- Adey, W.H. (1966). The genera *Lithothamnium*, *Leptophytum* (nov. gen.) and *Phymatolithon* in the Gulf of Maine. **Hydrobiologia**, 28: 321-370.
- Adey, W.H. (1970). The crustose corallines of the Northwestern North Atlantic including *Lithothamnium lemoineae* n. sp. **J. Phycol.**, 6: 225-229.
- Adey, W.H. and Johansen, H.W. (1972). Morphology and taxonomy of Corallinaceae with special reference to *Clathromorphum*, *Mesophyllum* and *Neopolyporolithon* gen. nov. (Rhodophyceae, Cryptonemiales). **Phycologia**, 11(2): 159-180.
- Cabioch, J. (1972). Etude sur les corallinacées II. La morphogénèse: conséquences systématiques et phylogénétiques. **Cah. Biol. Mar.**, 13(2): 137-288.
- Campbell, S.J. and Woelkerling, Wm. J. (1990). Are *Titanoderma* and *Lithophyllum* (Cora-

linaceae, Rhodophyta) distinct genera? **Phycologia**, 29(1): 114-125.

English translation by the authors.

- Curtis, P.J. (1986). **Microtecnia vegetal**. Trillas, México, D.F., 106 pp.
- González-Santander, R. (1968). **Técnicas de microscopía electrónica en biología**. Tolle, Lege, Aguilar, España, 665 pp.
- Jensen, W.A. (1962). **Botanical Histochemistry. Principles and Practice**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, 408 pp.
- Johansen, D.A. (1940). **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, Publications in the Botanical Sciences, New York. 523 pp.
- Johansen, H.W. (1969). Morphology and systematics of coralline algae with special reference to *Calliarthron*. **Univ. Calif. Publ. Bot.**, 49: 1-78, plates 1-19.
- Johansen, H.W. (1970). The diagnostic value of reproductive organs in some genera of articulated coralline red algae. **Br. Phycol. J.**, 5(1): 79-86.
- Johansen, H.W. (1981). **Coralline algae, a first synthesis**. CRC Press Inc., 239 pp.
- Jones, P.L. and Woelkerling, Wm.J. (1984). An analysis of trichocyte and spore germination attributes as taxonomic characters in the *Pneophyllum-Fosliella* complex, (Corallinaceae, Rhodophyta). **Phycologia**, 23(2): 183-194.
- Matty, P.J. and Johansen, H.W. (1981). A histochemical study of *Corallina officinalis* (Rhodophyta, Corallinaceae). **Phycologia**, 20(1): 46-55.
- Mason, L.R. (1953). The crustaceous coralline algae of the Pacific Coast of the United States, Canada, and Alaska. **Univ. Calif. Publ. Bot.**, 26(4): 313-390, pl. 27-46.
- Norris, R.E. (1957). Morphological studies on the Kallymeniaceae. **Univ. of Calif. Publ. Bot.**, 28: 251-334
- Ramón y Cajal, S. y Castro, F. de (1972). **Elementos de técnica micrográfica del siste-**



- ma nervioso.** Salvat, Barcelona, España. 283 pp.
- Riosmena-Rodríguez, R. (1991). Taxonomía y variación espacio-temporal de las especies del género *Amphiroa* Lamouroux (Corallinales, Rhodophyta) en la región sur de la península de Baja California. Tesis profesional. **Universidad Autónoma de Baja California Sur**, 109 pp.
- Riosmena-Rodríguez R. (1993). Una propuesta de técnica histológica para el estudio de algas coralinas (Corallinales: Rhodophyta). **Rev. Inv. Cient., UABCS**, 4(1): 65-73.
- Sunesson, S. (1937). Studien über die Entwicklungsgeschichte der Corallinaceen. **Lunds. Univ. Arsskr. n.f. Avd.**, 33(2): 101 pp.
- Sunesson, S. (1982). The culture of bisporangial plants of *Dermatolithon litorale* (Sunesson) Hamel et Lemoine (Rhodophyta, Corallinaceae). **Br. Phycol. J.**, 17(1): 107-116.
- Townsend, R.A. (1981). Tetrasporangial conceptacle development as a taxonomic character in the Mastophoroideae and Lithophylloideae (Rhodophyta). **Phycologia**, 20(4): 407-414.
- Walker, R. and Moss, B. (1984). Mode of attachment of six epilithic crustose Corallinaceae (Rhodophyta). **Phycologia**, 23(3): 321-329.
- Woelkerling, Wm.J. (1978). *Mastophoropsis canaliculata* (Harvery in Hooker) gen. et com. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) in Southern Australia. **Br. Phycol. J.**, 13(3): 209-225.
- Woelkerling, Wm.J. and Irvine, L.M. (1986). The neotypification and status of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). **Phycologia**, 25(3): 379-396.
- Woelkerling, Wm.J. and Ducker, S.C. (1987). *Lesueuria minderiana* gen. et sp. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) from southern and western Australia. **Phycologia**, 26(2): 192-204.
- Woelkerling, Wm. J. (1988). **Non-Geniculate Coralline Algae.** British Museum (Natural History) Oxford University Press, 268 pp.