

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron ejemplares de los siguientes herbarios BA, BAA, BAB, LIL, LP, LPAG, LPS, MVFA y SI (abreviaturas de acuerdo a Holmgren *et al.* 1990). El estudio morfológico y anatómico de las especies se desarrolló en el laboratorio del Área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. En el mismo lugar, se encuentran depositados los preparados microscópicos producidos para tal fin.

Estudio histológico

El material de herbario fue hidratado por hervor con agua adicionada con unas gotas de detergente o colocándolo en estufa a 60°C durante 24-48 horas, para luego fijarlo en F.A.A. Parte del material, una vez hidratado, fue colocado directamente en etilenglicol para ablandarlo y lograr una diafanización natural.

Los cortes fueron realizados a mano alzada y con micrótopo tipo Minot previa inclusión en parafina. Para el estudio de las hojas (lámina, peciolo y raquis) se emplearon hojas en estado maduro y los cortes transversales se realizaron en su parte media. Para que los cortes transversales de los tallos sean comparables se han utilizado aquellos con un diámetro entre 2,5 y 4 mm.

Para el estudio de ciertos aspectos parte de los cortes fueron montados al estado natural en goma de Prosen (Tivano, 1989), y el resto fue decolorado con hipoclorito de sodio al 50% y teñidos con safranina alcohólica 80% o con doble coloración safranina-fast-green (Dizeo de Strittmatter, 1979), realizando el montaje en gelatina glicerizada o bálsamo de Canadá.

Para el estudio de la epidermis y la arquitectura foliar se diafanizaron folíolos siguiendo la técnica de Dizeo de Strittmatter (1973). Para cada una de las especies se determinó el tamaño de los estomas con escala micrométrica incorporada a un microscopio Nikon.

Se estudiaron dos índices: el índice estomático y el índice de empalizada. El primero es considerado un valor de importancia de acuerdo a las Famacopeas en *Senna alexandrina*, que es empleada en medicina. A los fines comparativos se calculó como un dato más el índice de empalizada.

El índice estomático representa la frecuencia de estomas en términos de valor proporcional respecto a las células epidérmicas, porcentaje conocido como índice estomático, aplicado por primera vez por Salisbury (1927). Se calculó realizando el cosiente entre el número de estomas y la sumatoria del número de estomas y número de células epidérmicas por unidad de superficie, expresado en porcentaje, fórmula tomada de Stace (1965). El índice de empalizada introducido como método de control de calidad por Zormig & Weiss (1925), representa la cifra media de células en empalizada que aparecen debajo de una célula epidérmica. Se obtuvo contando las células en empalizada que se encontraban debajo de cuatro células epidérmicas y se determinó el valor medio.

Para el estudio y representación de la estructura de los órganos vegetativos se tomó como base la obra de Metcalfe & Chalk (1950, 1979, 1989). En las descripciones de la arquitectura foliar se siguió a Roth (1996) y a Klucking (1995), adoptando la terminología propuesta por Hickey (1974, 1979).

Estudio topográfico

Para el estudio con microscopio electrónico de barrido, los folíolos y los nectarios fueron deshidratados y luego procesados de acuerdo a la técnica de secado en punto crítico. Los frutos y semillas se estudiaron sin deshidratación previa. En ambos casos el material adherido a los soportes metálicos con cinta bifaz, se metalizó con oro-paladio. Las observaciones se realizaron a 15kv con un microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM-T100 del Servicio de Microscopía Electrónica del Museo de Ciencias Naturales de La Plata. De las imágenes producidas por los electrones secundarios se tomaron las microfotografías.

Estudio químico

Los cristales de oxalato y su composición se analizaron con un microscopio electrónico de barrido Philips 505 equipado con microsonda EDAX. Se obtuvo el espectro EDAX característico del calcio y se trazó el espectro característico de dicho elemento con el sistema gráfico Princeton.

Para el reconocimiento de los tipos de cristales se consideraron diferentes obras (Mansfield 1916; Stevens 1924; Moore & Lersten 1972; Freire 1984; Metcalfe & Chalk 1989).

Para detectar almidón se empleó Reactivo de Lugol. Para detectar taninos se usó cloruro férrico al 10% y carbonato de sodio al 2% (D'Ambrogio de Argüeso 1986). Los mucilagos se reconocieron con alcohol absoluto (Johansen 1940).

Análisis fenético

Para establecer las relaciones entre las especies se procedió a la acumulación de datos, seguida del procesamiento de los mismos haciendo uso del programa de computación NTSYS-pc, versión 2.02 (Rohlf 1998). Se aplicó el Análisis de Agrupamiento (técnicas Q y R) y el Método de Ordenación (técnica ACP).

Ilustraciones

Los dibujos, originales de la autora, fueron preparados empleando un microscopio óptico Leitz SM Lux equipado con dispositivo para dibujo. En las representaciones semiesquemáticas se emplearon los signos convencionales de Metcalfe & Chalk (1950) y para el mesofilo esponjoso se utilizó el símbolo propuesto por Ancibor (1992). Al tratar cada especie se ha incluido junto al texto imágenes de los preparados microscópicos capturadas con un ordenador y el software PhotoExpress versión 1.0.

Abreviaturas empleadas en el texto

abx = abaxial

adx = adaxial

CT = corte transversal

F.A.A. = solución compuesta por: 50 ml de formol, 25 ml de ácido acético glacial, 250 ml de alcohol etílico 96° y 175 ml de agua destilada.

M = medicinal

MEB = microscopio electrónico de barrido.

MEB-EDAX = microscopio electrónico de barrido y microanalizador de minerales.

MO = microscopio óptico.

VS = vista superficial.

El material estudiado se indica al final de la descripción de cada especie.