

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” – București
Facultatea de Farmacie
Disciplina de Botanică farmaceutică și Biologie celulară vegetală

Conf. univ. dr. Mihaela Dinu

Șef lucrări dr. Robert Viorel Ancuceanu
Asist. univ. drd. Adriana Iuliana Anghel
Asist. univ. drd. Oana Cristina Rebegea

Șef lucrări dr. Marilena Viorica Hovanet
Asist. univ. drd. Olga Daniela Crețu
Prep. univ. drd. Octavian Tudorel Olaru

BOTANICĂ FARMACEUTICĂ

BAZE TEORETICE ȘI PRACTICE

**CITOLOGIE. HISTOLOGIE.
ORGANOGRAFIE.**



Editura Universitară,
București

Contribuția autorilor:

M. Dinu – capitolul 3-Celula vegetală; capitolul 9-Floarea (*flores, flos*)

R. V. Ancuceanu – capitolul 1-Sticlărie, instrumentar și aparatură; capitolul 2-Pregătirea specimenelor în vederea examinării microscopice. Preparate microscopice; capitolul 4-Diviziunea celulară.

M. V. Hovaneț – capitolul 6-Rădăcina (*radix*); capitolul 7-Tulpina.

A. I. Anghel – capitolul 8-Frunza (*folium*).

O. Crețu – capitolul 5- Histologia (studiul țesuturilor vegetale)

O. C. Rebegea – capitolul 10- Fructul (*fructus, pericarpium*)

O. T. Olaru – capitolul 11- Sămânța (*semen*)

Coordonator: Conf. Univ. dr. Mihaela Dinu

Coperta și coordonare tehnoredactare: O. T. Olaru

Redactor: Gheorghe Iovan

Tehnoredactor: Ameluța Vișan

Coperta: Angelica Mălăescu

Editură recunoscută de Consiliul Național al Cercetării Științifice (C.N.C.S.)

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

Botanică farmaceutică : baze teoretice și practice : citologie,

histologie, organografie / Mihaela Dinu, Robert Viorel

Ancuceanu, Adriana Iuliana Anghel, ... - Ed. a 2-a, rev. –

București : Editura Universitară, 2012

Bibliogr.

ISBN 978-606-591-518-3

I. Dinu, Mihaela,

II. Ancuceanu, Robert Viorel

III. Anghel, Adriana

615.322:58

DOI: (Digital Object Identifier): 10.5682/9786065915183

© Toate drepturile asupra acestei lucrări sunt rezervate, nicio parte din această lucrare nu poate fi copiată fără acordul Editurii Universitare

Copyright © 2012

Editura Universitară

Director: Vasile Muscalu

B-dul. N. Bălcescu nr. 27-33, Sector 1, București

Tel.: 021 – 315.32.47 / 319.67.27

www.editurauniversitara.ro

e-mail: redactia@editurauniversitara.ro

Distribuție: tel.: 021-315.32.47 / 319.67.27 / 0744 EDITOR / 07217 CARTE

comenzi@editurauniversitara.ro

O.P. 15, C.P. 35, București

www.editurauniversitara.ro

Prefață

Motto

*„Cărțile lui Hipocrate, cel care a expus primul cu desăvârșită limpezime preceptele medicinei, le găsim pline de referiri la plante; la fel și cărțile lui Diocles din Carystus, care se află pe locul al doilea în cronologie și ca faimă; și cele ale lui Praxagoras și ale lui Crisip, apoi Erasistratus din Ceos.....Era însă mai plăcut să stai în școli și să asculți lecții decât să umbli prin locuri singuratice căutând tot soiul de ierburi în diferitele perioade ale anului.“ (Plinius Cel Bătrân, *Naturalis historia*, Cartea a douăzeci și șasea, 10-11)*

Întrețin viața, transformând aproape miraculos apa și un deșeu gazos care îngrijorează ecologiștii obsedați de încălzirea globală (dioxidul de carbon), în zahăr și alte substanțe fundamentale pentru viață. Funcționează ca un uriaș plămân al planetei, regenerând oxigenul consumat de alții în respirație. În clipe rare ale vieții, reușesc să spună ceea ce vorbele nu izbutesc să facă. Ne împodobesc ferestrele, grădinile și mormintele. Ne ocrotesc de arșița verii și de furiile iernii. În livezi, grădini, păduri sau la marginea drumului, se lasă sacrificate fără să se lamenteze vreodată. Adesea tot mai ignorate, tot mai sacrificate, plantele continuă să trăiască și să întrețină viața, nu doar ca alimente sau generatoare ecologice de oxigen, ci și ca medicamente. Din perspectivă istorică, farmacia a fost dominată inițial de plantele medicinale și medicamente obținute din plante. Deși volumul produselor de origine vegetală s-a redus tot mai mult de-a lungul timpului în farmacie, în perioada contemporană asistăm la un reviriment al acestora, nu sub eticheta de medicament, ci sub cea mai mult sau mai puțin discutabilă de „supliment alimentar”.

În prezent, în farmacie, ca și în alte unități de distribuție autointitulate Plafar, există un număr foarte mare de suplimente alimentare conținând pulberi, extracte sau alte preparate din plante, din cele mai neașteptate locuri și nu rareori în combinații de o rară fantezie. În acest context, cunoașterea științifică a plantelor, sub aspectul identificării și controlului calității, rămâne o necesitate socială, mai ales dacă avem în vedere cazurile nefericite în care substituirii involuntare (prin confuzii ale culegătorilor) sau intenționate ale unora din plantele declarate pe etichetă cu altele, care nu țin doar de domeniul trecutului. Identificarea și controlul calității produselor vegetale nu se poate face în absența unor cunoștințe de bază privind anatomia și morfologia plantelor. Prezenta lucrare răspunde unei asemenea nevoi.

Structurată în 11 capitole, aceasta acoperă patru domenii diferite ale biologiei vegetale, din perspectivă practică:

a) Principalele **instrumente și ustensile utilizate în laboratorul de biologie vegetală**, în special domeniul microscopiei. Partea cea mai extinsă este dedicată microscopiei optice, inclusiv tehnicilor de obținere a preparatelor microscopice, dar nu sunt ignorate nici microscopia electronică și chiar microscoapele cu sondă;

b) **Citologia**. Sunt abordate acele aspecte ale celulei vegetale care pot fi investigate cu ajutorul microscopului optic, în condiții nesofisticate: peretele celular, incluziunile vacuolare, plastidele. Tot în legătură cu citologia, dar făcând legătura și cu histologia este prezentată și diviziunea celulară cu cele două variante de bază ale acesteia, mitoza și meioza.

c) **Histologia** este tratată într-un capitol distinct, în mod firesc țesuturilor definitive fiindu-le dedicat un spațiu mult mai larg decât țesuturilor meristematice.

d) **Organografia** ocupă aproape jumătate din conținutul lucrării, făcând obiectul a șase capitole, fiecare din ele dedicate câte unui organ vegetativ și, respectiv de reproducere: rădăcina, tulpina, frunza, floarea, fructul și sămânța. Fiecare organ este abordat atât din perspectivă morfologică, dar și anatomo-histologică. Fiecare capitol pune în perspectivă medicinală organul vegetal respectiv, oferind exemple de produse vegetale cu caracter medicinal obținute din acesta; în acest scop sursa de referință a fost Farmacopeea Europeană, ediția a 6-a.

Ca elemente distinctive față de volumul anterior menționăm:

- extinderea datelor privind microscopia electronică;
- includerea de tehnici și metode noi de colorație, precum și date despre coloranți specifici unor componente cito-, histo-anatomice;
- iconografia îmbogățită cu fotografii și microfotografii realizate în laboratorul nostru;
- introducerea unui subcapitol – „Teme și întrebări” la fiecare din cele 11 capitole ale cărții;
- indexul de termeni botanici și cel de denumiri latine ale plantelor, menite să ajute accesarea rapidă a informațiilor;
- includerea unor adrese de site-uri de pe internet unde pot fi accesate date, imagini, filme, care să completeze într-o manieră modernă, actuală noțiunile prezentate și să faciliteze înțelegerea lor.

Volumul se adresează tuturor celor interesați de studiul plantelor în general și a celor medicinale în special, și nu în ultimul rând studenților din anul I de la Facultatea de Farmacie. În speranța că vă va fi util așa cum și-au dorit, autorii vă mulțumesc anticipat pentru eventuale sugestii în vederea realizării unei noi ediții.

Autorii

1. Sticlărie, instrumentar și aparatură de laborator utilizate în studiul plantelor

1.1. Introducere

Botanica este ramura biologiei care are ca obiect studiul științific al plantelor. Cel puțin aceasta era definiția tradițională. În realitate, botanica a studiat și continuă să studieze, nu doar plantele, ci în general toate organismele vii care până relativ de curând nu erau considerate ca aparținând regnului animal – cum ar fi cianobacteriile, algele, ciupercile sau lichenii. Aceste categorii de organisme (cianobacterii, alge etc) erau privite în trecut ca plante, dar în lumina cunoștințelor taxonomice actuale ele nu mai sunt considerate astfel; aceste organisme continuă totuși să facă obiectul de studiu al botanicii, pentru că trăsăturile lor sunt în general mai apropiate de cele ale plantelor decât de ale animalelor.

Botanica este o știință descriptivă, dar și experimentală. Este descriptivă, în sensul că descrie organismele și caracteristicile lor (forma diferitelor organe, vegetative și de reproducere, dimensiuni, durata de viață, perioada de înflorire, fructificare etc). În același timp, cunoașterea multor aspecte referitoare la viața plantelor necesită realizarea de experimente științifice din care să se obțină anumite concluzii: de exemplu, cum influențează substanța X germinarea semințelor speciilor Y și Z, cum influențează temperatura creșterea plantelor, care sunt factorii care fac ca anumite țesuturi să fie prezente numai la anumite plante sau organe etc. Cunoașterea unor aspecte de acest gen necesită conceperea și realizarea unor experimente ale căror rezultate să fie apoi interpretate în mod corect, inclusiv prin aplicarea metodelor statistice la analiza datelor cantitative. De fapt, există mai multe perspective din care pot fi studiate plantele: la nivelul moleculelor care le alcătuiesc (sau care alcătuiesc anumite porțiuni de interes), la nivelul celulelor din care sunt formate, la nivelul organelor, la nivelul organismului vegetal privit ca întreg, la nivelul interacțiunii cu alte organisme, vegetale sau animale, și chiar la nivelul interacțiunii cu întreaga biosferă. Pentru fiecare asemenea abordare, există metode și tehnici specifice de cunoaștere a plantelor. Prezenta lucrare, cu un caracter preponderent practic, este orientată în special spre studiul plantelor la nivelul țesuturilor și organelor. Pentru acest demers sunt utilizate în primul rând tehnicile microscopice. Acestea necesită utilizarea anumitor recipiente, ustensile și echipamente de laborator care, deși nu sunt în general sofisticate, trebuie să fie cunoscute pentru utilizarea cu cele mai bune rezultate.

1.2. Sticlărie de laborator

Termenul „sticlărie de laborator” desemnează o varietate de echipamente realizate multă vreme din sticlă și utilizate în experimentele științifice sau în munca de laborator de rutină, în special în laboratoarele de chimie sau biologie. În prezent o parte din „sticlărie” este fabricată din materiale plastice; obiectele din plastic au avantajul că nu se sparg și sunt uneori mai ieftine, dar au o stabilitate chimică și termică mai mică, fiind imposibil de utilizat în anumite condiții. Totuși acidul fluorhidric se păstrează numai în recipiente de plastic, pentru că sticla este atacată de acest acid. Sticla nu prezintă dezavantajele recipientelor din plastic, dar se sparge relativ ușor și este mai grea. Se preferă sticla de borosilicat (cunoscută încă în multe laboratoare ca Pyrex), pentru că este mai rezistentă la temperaturi ridicate. Pentru unele aplicații este necesar cuarțul. În laboratorul de biologie vegetală, ca în multe alte laboratoare, se utilizează o varietate de ustensile de sticlă. În cele ce urmează vom include frecvent între paranteze denumirea în limba engleză a diverselor obiecte sau caracteristici tehnice ale acestora, acestea fiind adesea necesare pentru utilizarea cu succes a internetului (pentru identificarea unor furnizori, formulări de specificații tehnice etc).

Cele mai importante obiecte de sticlărie utilizate în laboratorul de biologie vegetală sunt:

Lama port-obiect (lama de sticlă, eng. *microscope slide*) – reprezintă o mică piesă dreptunghiulară, plată, confecționată din sticlă, pe care se montează speciile care urmează a

fi examinate la microscop. Dimensiunile standard sunt de 75 x 25 mm, grosimea de 1,2 mm, uneori 1,0 mm. Lame de dimensiuni mai mari (75x38 mm sau 75x 51 mm) sunt utilizate uneori în biologia animală/umană (pentru secțiuni de țesut cerebral, de exemplu). Partea terminală a lamei (o porțiune de cca. 2 cm) poate să fie simplă (*plain end*), ca și restul lamei, sau poate să fie mată (glazurată, *frosted end*), permițând inscripționarea mai ușoară a lamei. Mai recent s-au introdus și tehnologii speciale de acoperire a sticlei (glazurare, măturire), care permit inscripționarea cu orice instrument clasic de scris (pix, creion etc), sau care măresc adezivitatea preparatelor, lipindu-le de lamă. Există de asemenea lame de sticlă cu godeu (*concavity slides*, *single well slides*), adică lame prevăzute cu o depresiune hemisferică, cu utilizări speciale (de exemplu pot fi utilizate pentru analiza florală a unor flori foarte mici, sau la examinarea culturilor de celule); prezintă de asemenea avantajul că pot conține mai mult apă, permițând examinarea pe o perioadă mai lungă, în comparație cu cele standard, unde stratul relativ subțire de apă se evaporă mai repede. Pentru aplicații speciale, când este necesară transparența UV, se pot folosi lame de cuarț (mai scumpe).

Un interes aparte prezintă și lamele acoperite cu adezivi, care sunt utilizate pentru atașarea secțiunilor de lamă înainte de colorare. Există mai mulți adezivi utilizați la acoperirea lamelor; relativ frecvent se utilizează lame acoperite cu poli-L-lisină sau cu silan, compuși care nu interferează în general cu substanțele utilizate pentru colorarea preparatelor. Deoarece lamele acoperite comercial sunt mai scumpe, o soluție mai ieftină pentru a obține rezultate similare constă în aplicarea în laborator a anumitor preparate adezive pe lame microscopice obișnuite.

Lamela de sticlă (eng. cover-slip) – o mică piesă de sticlă, foarte subțire, fragilă, mai mică decât lama port-obiect, utilizată pentru acoperirea specimenului în scopul examinării la microscop. Există o varietate relativ mare de dimensiuni, cum ar fi: 15 x 15 mm, 18 x 18 mm, 22 x 22 mm, 22 x 30 mm, 22 x 40 mm, 22 x 50 mm. Sunt disponibile și mai multe niveluri de grosime: 0,13-0,16 mm; 0,16 - 0,19 mm; 0,19 – 0,25 mm. Lamelele sunt de regulă de formă pătrată sau dreptunghiulară, dar există și lamele circulare (cu diametre de 12, 15, 18, 22 sau 25 mm). Când este necesar se pot utiliza lamele de cuarț.

Lamele și lamelele trebuie să fie foarte curate, deoarece impuritățile pot influența negativ imaginea microscopică (artefacte, imagini neclare) și interpretarea acestora. În acest scop ele se degresează cu apă și detergent, apoi sunt cufundate în alcool de 70° și uscate apoi prin ștergere cu un material textil curat, moale, din bumbac. O altă variantă de curățare constă în tratarea cu un amestec de alcool de 90° și HCl sau HNO₃ în proporție de 9:1, după care se spală cu apă comună, apoi cu apă distilată și se usucă. Se păstrează în cutii acoperite, în mediu uscat sau în alcool de 90°, caz în care trebuie șterse la momentul utilizării.

După utilizare, lamele și lamelele se curăță din nou prin fierbere timp de 30 de minute cu soluție de carbonat de sodiu, apoi se tratează cu un amestec bicromic și se clătesc cu apă curentă și apoi apă distilată.

Cristalizorul (eng. crystallising dish) este un vas de sticlă cilindric cu înălțimea mai mică decât diametrul (aplatizat), utilizat în general pentru păstrarea unor soluții, reactivi etc. și pentru cristalizare. În biologia vegetală este întrebuințat ca recipient pentru păstrarea secțiunilor și ca baie de colorare și spălare a acestora. Există o varietate de dimensiuni pentru cristalizoare, cel mai frecvent în laboratorul de biologie vegetală se utilizează cele cu diametrul de 6-8 cm.

Sticla de ceas (eng. watch glass¹) reprezintă o piesă de sticlă circulară, ușor concavă, utilizată pentru evaporarea lichidelor (deoarece oferă o suprafață relativ mare de evaporare în comparație cu recipientele obișnuite, cilindrice, conice, cu gât etc.), ca suport pentru substanțele solide în timp ce sunt cântărite sau pentru acoperirea unor vase. În laboratorul de biologie vegetală, sticla de ceas cu un diametru de 8-10 cm se utilizează în special pentru acoperirea cristalizorului în timpul operațiunilor de clarificare, colorare și spălare a secțiunilor.

Paharele Berzelius² (pahare cilindrice, beakers) sunt recipiente cilindrice (din sticlă, dar frecvent și din plastic) cu fund plat, utilizate pentru prepararea unor reactivi și soluții,

¹ Sticla de ceas de dimensiuni relativ mari se numește uneori în limba engleză *clock glass*.

² Limba română pare să fie printre puținele în care denumirea acestui recipient este atribuită chimistului suedez J.J. Berzelius. Majoritatea limbilor europene folosesc denumiri comune (de exemplu, în franceză *bécher*, în italiană

agitarea, amestecarea și încălzirea lichidelor. Sunt practic prezente în orice laborator. Sunt de obicei gradate pentru a estima volumul conținut. Totuși aceste gradații sunt numai orientative, erorile sunt relativ mari. Pentru măsurarea volumelor de lichide trebuie utilizate recipiente adecvate, nu pahare Berzelius.

Paharele Erlenmeyer (eng. Erlenmeyer flasks, conical flasks, sau simplu flasks) sunt recipiente de sticlă (mai rar de plastic) care prezintă un corp conic și un gât cilindric. Denumirea provine de la numele chimistului Emil Erlenmeyer care le-a creat în 1861. Forma conică permite agitarea, iar gâtul îngust evitarea pierderii de lichid prin stropire. În plus, gâtul îngust permite închiderea acestuia cu dopuri de cauciuc, de sticlă sau cu vată. Paharele Erlenmeyer sunt mult utilizate la titrări (pentru determinarea cantitativă a unor substanțe) și în culturile microbiene sau în culturile de celule.

Există și așa-numitul *fleaker*, un hibrid între paharul Berzelius și Erlenmeyer (un fel de pahar Berzelius cu gâtul îngustat, care poate fi închis cu un capac de plastic și dop de cauciuc). Acest gen de recipient nu este foarte frecvent folosit.

Eprubetele (test tubes) sunt tuburi mici de sticlă în formă de deget, deschise în partea superioară și închise, cu un fund rotunjit în partea inferioară (mai rar, fundul poate să fie conic). Uneori prezintă marginea ușor evazată pentru a facilita scurgerea lichidului conținut. Eprubetele sunt utilizate pentru prepararea unor reactivi în cantități mici, realizarea unor teste simple, încălzirea unor lichide etc. În biologia vegetală se utilizează foarte frecvent pentru obținerea de preparate superficiale clarificate. Există și eprubete speciale pentru centrifugă; acestea sunt de regulă mai groase și au fundul conic. Eprubetele utilizate cel mai frecvent au lungimea de cca. 15 cm și diametru de 2 cm. Există și eprubete cu capac, cum ar fi cele Falcon® sau Vacutainer® (acestea din urmă sunt concepute special pentru probele de sânge). În general eprubetele sunt simple, dar pot exista și eprubete gradate, care facilitează măsurarea volumelor de lichide. Asemănătoare cu eprubetele sunt *tuburile de fierbere*, practic niște eprubete mărite cu cca. 50%, destinate încălzirii lichidelor la fierbere; această operațiune este dificilă cu eprubetele obișnuite, deoarece au diametrul foarte mic și lichidul iese din eprubetă („dă peste răscoale”).

Sticla picurătoare (dropper bottles, drop-dispenser bottles) și alte sticle pentru solvenți. Sticla picurătoare este o sticlă prevăzută cu unul sau două șanțuri în partea superioară și cu un dop special, permițând scurgerea în picături a lichidului conținut. Este folosită pentru conservarea și manipularea reactivilor de colorare specifici laboratoarelor de biologie. Poate fi fabricată din sticlă albă sau din sticlă brună (pentru coloranții fotosensibili). De regulă sticlele picurătoare au capacități mici, 25-100 ml. Pe lângă sticla picurătoare clasică, în prezent se fabrică o varietate de recipiente picurătoare, din sticlă sau material plastic.

În orice laborator de biologie există de regulă și o serie de sticle, albe și brune, prevăzute cu dop rotat, pentru păstrarea reactivilor și solvenților (*reagent bottles, ground glass stopper bottles*). Volumul acestora variază de la 250 la 5000 ml.

Baloane cotate (volumetric flasks) sunt recipiente de sticlă utilizate pentru măsurarea exactă a volumelor de lichide. Au o formă asemănătoare cu cea a unei pere, fiind formate dintr-un corp rotunjit, dar cu fundul plat, și un gât foarte lung. Pe gât o linie orizontală marchează nivelul care corespunde volumului declarat (la o anumită temperatură, înscrisă pe corpul balonului, de regulă la 20 °C; la temperaturi mai mari sau mai mici există mici erori datorate dilatării sau contracției sticlei). Un singur balon poate fi utilizat pentru măsurarea unui singur volum (de exemplu, 10 ml pot fi mășurați cu un balon de 10 ml, 50 ml cu un balon de 50 ml etc.). În general, volumul baloanelor cotate de laborator variază între 5 ml și 1000 ml.

Baloane de sticlă (round-bottom flasks, flat-bottom flasks). În laborator există diverse baloane de sticlă, recipiente cu corpul sferic, utilizate pentru încălzirea unor lichide (inclusiv în scopul distilării unor produse vegetale) sau producerea unor reacții chimice. Pot avea fundul

becher, în spaniolă *vaso de precipitados*, în germană *Becherglas*). *Les connaisseurs* fac distincție între *paharul Berzelius* (înalt, cu înălțimea mult mai mare decât diametrul) și *paharul Griffin* (scund, asemănător unui Berzelius, dar cu înălțimea aproximativ egală cu diametrul sau puțin mai mare). Dar pentru imensa majoritate a cercetătorilor din lume această distincție este aproape un bizantinism, toată lumea folosind pur și simplu un termen neutru (*beaker* etc). În România, denumirea de pahar Berzelius se folosește și pentru paharul Berzelius propriu-zis, și pentru paharul Griffin.

rotund sau plat. Partea superioară poate fi simplă sau cu șlif, în această ultimă situație fiind posibilă închiderea ermetică cu un dop sau conectarea cu alte vase. Unele au gâtul lung, prevăzut cu o flanșă (bordură) și sunt cunoscute sub numele de vase *florentine* (*Florence flasks*), după orașul Florența din Italia.

Cilindrul gradat (*graduated cylinder, measuring cylinder*) este un vas de sticlă sau plastic utilizat pentru măsurarea mai rapidă, dar cu erori mai mari, a lichidelor. Constă dintr-un tub închis la bază, pe care este înscrisă o scală care corespunde diferitelor volume măsurate, începând cu 0 ml. În general, cu cât diametrul unui cilindru este mai mare, cu atât eroarea de măsurare este mai mare. De aceea, pentru măsurarea de volume mici trebuie utilizați cilindri mici, iar pentru măsurarea de volume mai mari, cilindri mai mari. Volumul cilindrilor gradate variază între 25 și 2000 ml. Se întâlnesc uneori și cilindri de 10 ml, dar utilitatea lor este redusă, pentru că aceste volume se pot măsura mai exact și relativ ușor cu pipeta.

Vasul Coplin (*Coplin jar*) este un vas de sticlă, plastic sau alte materiale de dimensiuni relativ mici (capacitate în general sub 100 ml), cu înălțimea mai mare decât lățimea și prevăzut cu un suport (raft) pe care se așează lamele microscopice pentru colorare și spălare. „Raftul” poate fi reprezentat de niște șanțuri în care se imobilizează lamele, de obicei în poziție verticală. Majoritatea pot menține 5 sau 10 lame de sticlă. Deși vasul Coplin reprezintă cel mai cunoscut tip de vas de colorare (*staining dish*), există și alte vase de colorare, cu diferite caracteristici tehnice, destinate colorării și spălării preparatelor imobilizate pe lame microscopice.

Vasul Linhart este un recipient de porțelan sau de sticlă utilizat în laboratorul de biologie vegetală pentru germinarea unor semințe în condiții experimentale.

Lampa de spirt este un mic dispozitiv care servește ca sursă de căldură în laborator, utilizând alcoolul drept combustibil, dar și alți combustibili de natură organică. Se utilizează în special la obținerea unor preparate microscopice.

Cutia Petri este un recipient cilindric plat utilizat în laborator în special pentru cultura unor celule sau microorganisme; se utilizează însă și pentru studiul germinării semințelor sau la observarea comportamentului unor animale foarte mici (insecte, crustacee, helminți etc.). Cutiile Petri pot fi fabricate din sticlă (reutilizabile prin sterilizare) sau din plastic (de unică folosință). Numele provine de la cel al bacteriologului german Julius Richard Petri, asistent al lui Robert Koch; Petri a inventat acest recipient în anul 1887. Mai târziu au apărut și plăci cu godeuri multiple (*multi-well plates*), recipiente din plastic care conțin mai multe cavități, și care sunt echivalentele mai multor cutii Petri pe un singur suport. Există și plăci cu cavități foarte mici, numite plăci *multi-titru* sau *microplăci*, utilizate pentru studii de enzimologie, imunologie etc.

În laboratorul de biologie vegetală se mai utilizează și mojară cu pistile (pentru triturare, pulverizare sau omogenizare), capsule de porțelan sau de sticlă (pentru evaporarea solvenților, concentrarea unor soluții etc.), baghete de sticlă (pentru agitare, amestecare) etc.

1.3. Instrumentar de laborator

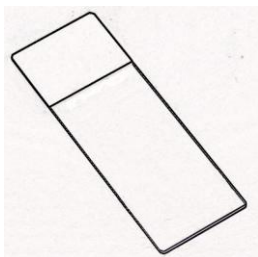
Pentru studierea plantelor în condiții de laborator se utilizează o varietate de instrumente (de regulă metalice), majoritatea fiind comune și altor laboratoare (cum ar fi cele de chimie, anatomie, fiziologie, geologie etc).

Lingurița (*laboratory spoon*) și **spatula** (*laboratory spatula*) sunt instrumente metalice utilizate la prelevarea substanțelor din recipiente și cântărirea acestora. În biologie se utilizează mai ales la prepararea reactivilor și coloranților pentru microscopie.

Bisturiul (*scalpel*) este un instrument folosit pentru fragmentarea materialului vegetal mai dur (rădăcini și organe subterane, tulpini, unele fructe sau semințe) la dimensiuni mai mici. Este metalic, alcătuit dintr-o lamă ascuțită și un mâner fix, sudat cu lama.

Foarfecă (*scissors*) utilizată în laborator poate avea diferite dimensiuni și poate prezenta vârful ascuțit sau rotunjit, drept sau recurbat. Se utilizează pentru desprinderea de pe planta studiată a unor organe sau fragmente de organe și pentru fragmentarea organelor vegetale subțiri (frunze, flori) în scopul obținerii de preparate superficiale.

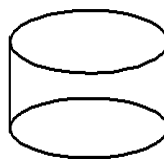
Fig. 1.1. Pe baza descrierilor din text, recunoașteți obiectele de sticlărie și instrumentar din imagine, notând numele fiecăruia în spațiile punctate.



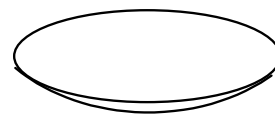
1.....



2.....



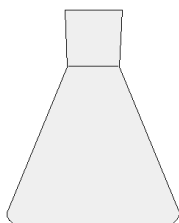
3.....



4.....



5.....



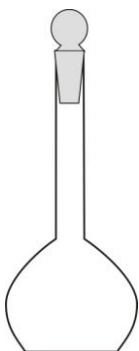
6.....



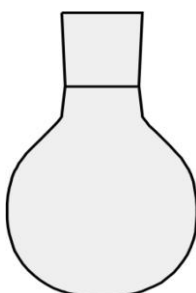
7.....



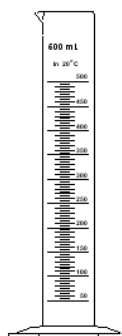
8.....



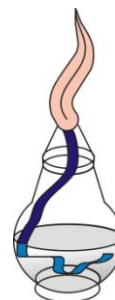
9.....



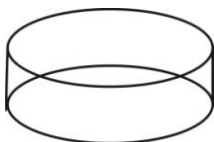
10.....



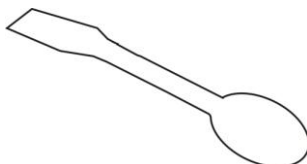
11.....



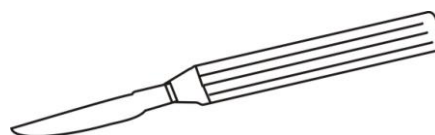
12.....



13.....



14.....



15.....

Pensa anatomică (*forceps*, *anatomical forceps*, *tweezers*) poate avea dimensiuni mai mari sau mai mici și vârful drept sau recurbat. Cea cu vârful recurbat se mai numește și *pensă de iris* (engl. *iris forceps*, pentru că este adecvată pentru prinderea irisului în anatomie). În studiul plantelor se utilizează pentru desprinderea epidermelor de pe frunze, a unor fragmente foarte mici de organe vegetale, la realizarea analizei florale.

Briciul anatomic (*razor*) este un instrument folosit pentru obținerea manuală a secțiunilor microscopice din organele vegetale sau din talul organismelor vegetale primitive

(alge, ciuperci). Pentru a putea examina un obiect (în cazul nostru un fragment de plantă) la microscop, este necesar ca acesta să fie foarte subțire. Din acest motiv, nu se examinează la microscop întreaga plantă sau un întreg organ, ci numai o porțiune foarte subțire obținută din aceasta, adică o *secțiune*. Este format dintr-un mâner mobil (din metal sau alt material, de exemplu polimeric) și o lamă metalică, aceasta din urmă având o față plană și alta ușor concavă (fig. 1.2.). Mânerul are rol de protecție a lamei și facilitează menținerea poziției corecte la secționare. Lama este partea esențială a briciului, trebuie să fie bine ascuțită. Cu ceva antrenament, secțiunile manuale obținute cu briciul anatomic pot să fie destul de subțiri și transparente. Briciul trebuie utilizat și păstrat curat, de aceea trebuie șters cu o cârpă moale și curată după utilizare.

Microtomul reprezintă un aparat de precizie, destinat obținerii de secțiuni uniforme dintr-o varietate de materiale pentru examinarea microscopică. Termenul „microtom“ a fost propus la 1839 de biologul francez Charles Chevalier pentru a desemna un instrument care permite obținerea de secțiuni fine. Pentru microscopul optic, grosimea unei secțiuni poate varia între 1 micron și 60 de microni. În cazul microscopului electronic secțiunile sunt mult mai subțiri, de ordinul a 10 nm (secțiuni ultrafine).

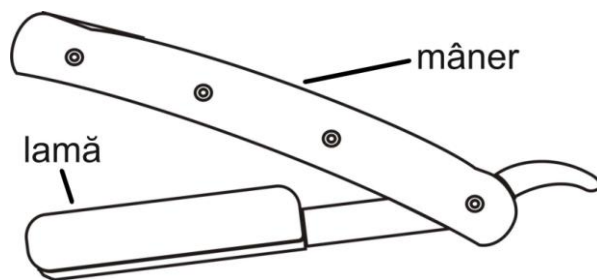


Fig. 1.2. Brici anatomic

Microtomul este de regulă alcătuit din trei componente: baza (corpul metalic), dispozitivul de secționare (inclusiv dispozitivul de susținere a lamei sau cuțitului) și dispozitivul de susținere a specimenului (materialul de secționat). La majoritatea microtoamelor dispozitivul de susținere a specimenului este mobil, în timp ce dispozitivul de secționare este fix. Baza conține un piston acționat manual sau cu ajutorul unui motor, care deplasează dispozitivul de susținere a specimenului în sus și în jos sau înainte și înapoi, după cum secționarea (tăierea) are loc în plan vertical sau orizontal. Specimenul este deplasat după fiecare secționare, avansând cu o distanță setată de operator (de regulă între 0,5 și 60 microni), care reprezintă chiar grosimea secțiunii. Specimenul este de obicei montat într-un bloc de gheață, material ceros, rășină sau un alt material cu proprietăți plastice. Lama (cuțitul) care produce secțiunea propriu-zisă este prinsă pe un dispozitiv de fixare a lamei care este imobil (fix). O condiție esențială pentru obținerea unor secțiuni de bună calitate este ca lama să fie bine ascuțită. Ascuțirea lamelor de microtom este însă dificilă; se poate utiliza o mașină de ascuțit dedicată, destul de scumpă (compania Leica, de exemplu, comercializează una), sau se pot utiliza dispozitive manuale de ascuțit (eng. *strops*, comercializate de Euromex, spre exemplu). Sunt disponibile și lame de unică întrebuințare.

Există mai multe tipuri de microtom:

Microtomul manual (cunoscut, mai ales în Franța, și ca microtomul *Ranvier*³) – este cel mai simplu și primitiv. Este de fapt un suport pentru prinderea specimenului, și orientarea lamei briciului; secțiunile se realizează tot cu mâna, cu ajutorul unui brici anatomic. El permite numai secționarea specimenelor botanice rigide prin

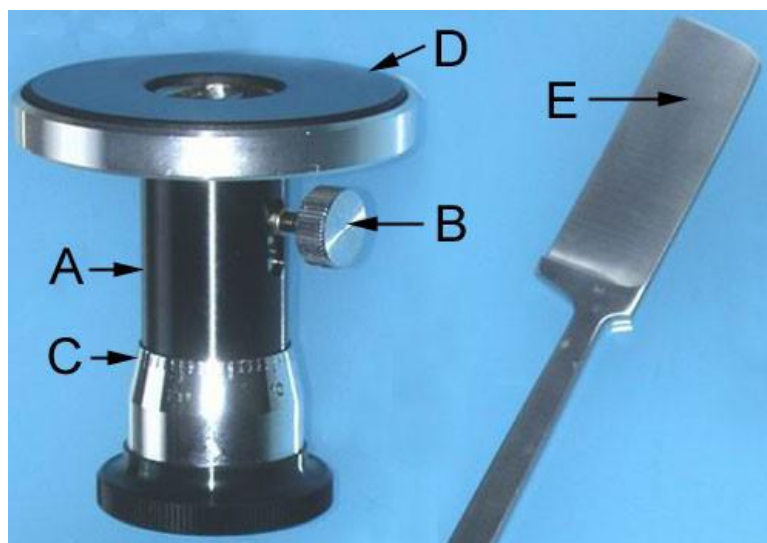


Fig. 1.3. Microtom manual (după J.C. Garaud și G. Roussel)

³ După histologul francez Louis Antoine Ranvier (1835-1922), care l-ar fi inventat.

natura lor, dar nu și a celor moi. Este format dintr-un cilindru metalic gol (A), care prezintă la partea superioară o placă netedă (D). Cilindrul conține o tijă care este acționată de o viză micrometrică (C), permițând împingerea specimenului spre placa netedă, cu grosimea dorită. Specimenul este fixat cu ajutorul șurubului B. Lama briului (E) alunecă pe placa netedă (D), permițând obținerea secțiunilor (fig. 1.3.).

Microtomul rotativ reprezintă cel mai frecvent tip de microtom modern (fig. 1.4.). Este utilizat pentru obținerea de secțiuni semi-subțiri și subțiri destinate microscopului optic (cel mai simplu tip de microscop). Poate fi utilizat pentru o varietate largă de specimene. O roată acționată manual sau cu ajutorul unui motor, determină avansarea blocului specimenului spre o lamă fixă (cuțit). Blocul se deplasează în sus și în jos în raport cu lama, permițând astfel secționarea. Există o varietate mare de microscopice rotative, de la microtoame ușoare adecvate secționării materialelor încorporate în parafină până la microtoame grele, acționate cu motor, care secționează materiale dure încorporate într-o rezină sintetică. De asemenea, majoritatea criostatelor conțin un microtom rotativ pentru obținerea secțiunilor în gheață. Secțiunile obținute din țesuturi încorporate în parafină au cel mai frecvent grosimi de 3-5 micrometri, iar secțiunile obținute în rezine sunt mai subțiri, 0,5-1,0 micrometri. Lamele (cuțitele) de oțel utilizate pentru secționare pot fi schimbate (când se uzează, sau în funcție de tipul de specimen secționat).



Fig. 1.4. Microtom rotativ, model HM 325

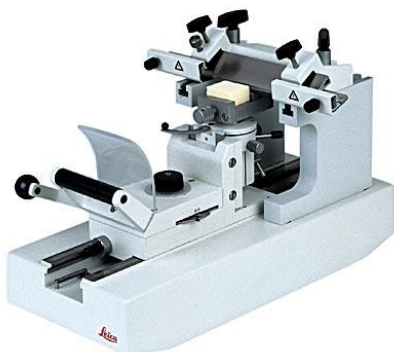


Fig 1.5. Microtom cu car culisant, model Leica SM2400



Fig. 1.6. Microtom cu basculă, model Brunel

Microtomul cu sanie sau cu car culisant (sledge microtome, sliding microtome) – este un microtom foarte greu, pentru asigurarea stabilității, astfel încât să nu prezinte vibrații, destinat secționării materiale incluse în blocuri de parafină și rezină de dimensiuni mari, pentru microscopul optic (nu electronic). Microscopicele mai noi sunt prevăzute cu una sau mai multe ferestre de secționare, care permit și secționarea unor specimene mai mici. Este unul din rarele tipuri de microtoame la care cuțitul este mobil, iar specimenul fix. Specimenul este ferm imobilizat cu ajutorul unui dispozitiv de strângere universal (care permite orientarea corectă a specimenului), iar cuțitul este adus spre și deasupra specimenului (fig. 1.5.). Modelele în care cuțitul este fix iar specimenul mobil sunt mai puțin utilizate și mai periculoase pentru utilizator. Microtomul cu sanie a fost oricum criticat pentru că necesită multă atenție la manipulare, fiind preferabil să se lucreze cu ușile închise, în absența oricărui factor perturbator, și din păcate are performanțe remarcabile în amputarea degetelor operatorului, dacă acesta nu este atent. Este util în special pentru secționarea lemnului și a altor specimene dure. Nu poate fi utilizat totuși la secționarea unor rezine foarte dure, cum ar fi aralditul (în acest caz există riscul apariției unor vibrații).

Microtomul cu basculă (rocking microtome). Foarte popular în special la începutul secolului 20, microtomul cu basculă este destinat obținerii de secțiuni numai din materiale încorporate în parafină și este extrem de fiabil. Este alcătuit din trei componente (fig. 1.6.). Specimenul avansează printr-un arc (resort) înspre cuțit (este utilizat un cuțit ușor biconcav, numit uneori cuțit Heiffor), care este menținut într-o poziție fixă. Este dificilă obținerea unor secțiuni foarte subțiri, iar cadrul microtomului este ușor, astfel încât acesta are tendința de a se mișca în cursul secționării. Un alt dezavantaj este faptul că pot fi secționate numai blocuri de parafină de dimensiuni relativ mici. Microtomul cu basculă a fost în bună parte înlocuit de microtomul rotativ care este mai precis, dar a reapărut într-o anumită măsură în criostatate portabile. În prezent este utilizat în principal pentru secțiuni vegetale de până la 5 μm grosime (nu se obțin secțiuni foarte subțiri, dar pentru celulele vegetale, care sunt mai mari, secțiunile sunt adecvate). Poate să fie foarte ieftin (un microtom Brunel cu basculă costă cca. 250 EUR, mult mai ieftin în comparație cu unul rotativ care este de regulă 5000-6000 EUR, sau chiar mai mult).

Microtomul cu vibrație (vibrating microtome)

Conceput inițial ca un microtom capabil să producă secțiuni de bună calitate din materiale vegetale sau animale proaspete, era destinat să înlocuiască microtomul manual. Funcționează pe baza vibrațiilor produse asupra unui lame asemănătoare cu o lamă de ras, amplitudinea vibrației fiind reglată prin modificarea tensiunii electrice. Prezintă avantajul că secționarea poate fi realizată fără încorporarea prealabilă a materialului sau fără congelare, direct pe țesutul proaspăt sau fixat, reducând la minim pierderile de activitate enzimatică sau leziunile structurale și artefactele. Sunt necesare diferite amplitudini ale vibrației pentru a produce secțiuni în materiale cu densități diferite. Specimenul este imersat într-un fluid (soluție tampon), care se află într-o



Fig. 1.7. Microtom vibrator, model Vibratome® 1000 Plus



Fig. 1.8. Microtom vibrator, model Microm HM 650 V

tăviță specială (numită baia specimenului). Secționarea are loc în baia lichidă. Soluția tampon are rolul de lubrifiere a lamei, de împrăștiere a căldurii eliberate în cursul secționării și de păstrare a caracteristicilor specimenului; în plus, facilitează recuperarea secțiunilor generate. Microtoamele vibratorii moderne sunt prevăzute cu senzori care permit controlul frecvenței și amplitudinii și cu sisteme de răcire eficiente. De obicei sunt prevăzute și cu o lupă care permite vizionarea mai ușoară a secțiunilor; lupa poate fi în general îndepărtată dacă nu este necesară, fiind mobilă. Exemple sunt modelul Microm HM 650 V, fabricat de MICROM International GmbH sau cele din seria Vibratome® fabricate de The Vibratome Company (fig. 1.7 și 1.8).

Microtomul cu ferăstrău (saw microtome) este destinat în special secționării de materiale foarte dure (oase, dinți, eșantioane mineralogice în diferite domenii industriale, sticlă, ceramică). Utilizează o lamă circulară de tip ferăstrău dintr-un material foarte dur (adesea îmbrăcat în diamant) care se rotește cu o viteză de câteva sute de rotații pe minut (de regulă cca. 600 rotații pe minut). Specimenele, de regulă



Fig. 1.9. Microtom cu ferăstrău, model Leica SP1600

încorporate în rezină, sunt avansate extrem de lent spre lamă. Nu sunt posibile secțiuni foarte subțiri, de regulă grosimea minimă fiind de 20-30 μm (fig. 1.9.).

Microtomul cu congelare (freezing microtome) este utilizat pentru obținerea de secțiuni din țesuturi congelate și din diverse produse industriale (cum ar fi textilele, hârtie, pielea, materiale plastice moi, cauciuc, pulberi, paste). A fost propus pentru prima oară în 1871 de către William Rutherford⁴, profesor la Universitatea din Edinburgh, autorul fiind convins la acel moment că el va înlocui în mare măsură încorporarea specimenelor în parafină sau alte materiale (fapt confirmat doar în mică măsură). Este prevăzut cu o platformă de congelare (*freezing stage*) pe care poate fi congelat rapid specimenul utilizând un material criogen (de regulă dioxid de carbon lichid sau chiar solid, dar și alte materiale, cum ar fi azotul lichid, un amestec de azot-izopentan, un spray cu aerosoli) sau un lichid de răcire recirculat la temperatură scăzută. Unele sisteme de răcire permit răcirea simultană a cuțitului. În mod tradițional platforma de congelare este alcătuită dintr-un material metalic care prezintă o adâncitură în care se introduce specimenul și perforații laterale, prin care se introduce materialul criogen. În cazul utilizării unui gaz lichefiat, acesta se evaporă rapid absorbind căldură și congelând rapid specimenul. Utilizarea pentru răcire a unui modul termoelectric are avantajul că permite fixarea cu acuratețe și menținerea temperaturii specimenului și cuțitului. Principiul de funcționare – pe lângă particularitățile referitoare la congelare – este oarecum asemănător cu cel al unui microtom rotativ, dar în acest caz cuțitul este mobil, fiind deplasat în sus și în jos, în timp ce specimenul este menținut în poziție staționară. Este foarte greu de obținut secțiuni subțiri, egale, de foarte bună calitate cu acest tip de microtom. Prezintă însă avantajul că nu necesită încorporarea specimenului în parafină sau rezină. Este utilizat în special pentru materiale animale dure, cum ar fi țesuturile cartilaginoase sau osoase, și pentru obținerea de secțiuni din țesuturi neurologice; de cele mai multe ori este utilizat în industria alimentară și textilă. Pentru a obține secțiuni mai subțiri de 5 micrometri pe materiale congelate este necesară utilizarea criostatului. De altfel, în prezent criostatul a înlocuit în general pe piață microtomul cu congelare (dar încă există în uz și uneori de vânzare, microtoame cu congelare). Microtomul cu congelare nu trebuie confundat cu criostatul.

Criostatul sau cabinetul rece (cryostat, cold cabinet) reprezintă un sistem de secționare în care întregul microtom și specimenul sunt complet închise într-o cameră refrigerată (fig. 1.10.). Tehnicile sau dispozitivele de secționare în care sunt răcite numai specimenul și cuțitul, dar secționarea este efectuată la temperatura camerei (adică cele în care se utilizează un „microtom cu congelare”) sunt numite uneori tehnici sau dispozitive „cu cuțit rece” (*cold knife*). Criostatul constă dintr-un microtom care este închis într-o cameră refrigerată, a cărei temperatură este menținută la un anumit nivel presetat (temperatura poate fi fixată între cea ambiantă și până la -40°C). Mai recent se construiesc și criostate la care corpul microtomului este situat în afara camerei reci (numai dispozitivul de secționare se află în cameră). Criostatul utilizează de obicei un microtom rotativ, dar unele criostate mobile (portabile) utilizează un microtom cu basculă; unele utilizează un microtom cu car culisant (sanie). Sunt posibile secțiuni de până la 1 micrometru grosime. Temperatura optimă de secționare depinde de tipul de specimen, cel mai frecvent aceasta se situează între (-10) și $(-20)^{\circ}\text{C}$.

Ultramicrotomul este utilizat pentru a obține secțiuni foarte subțiri (s-au raportat secțiuni de până la 5



Fig. 1.11. Ultramicrotom, model PowerTome PC



Fig. 1.10. Criostat, model Cryosect® Seward

⁴ Lawson Tait (1845-1899) a pretins că utilizase și el cu multe luni înainte un aparat asemănător.

nm) care să poată fi examinate la microscopul electronic (fig. 1.11.). Pentru secționare specimene foarte mici sunt încorporate de regulă într-o rezină dură. S-au dezvoltat două tipuri de mecanism de avansare a specimenului: unul mecanic și altul termic. Cuțitele sunt de obicei fabricate din sticlă, diamant sau safir. Blocul care conține specimenul este adus la nivelul lamei sub control microscopic și fiecare secțiune obținută plutește apoi într-o baie de apă aflată în vecinătatea lamei cuțitului. Cuțitul este acționat de un motor, pentru a asigura o mișcare regulată care să permită obținerea unor secțiuni cu grosime constantă. Cele mai noi sunt controlate computerizat, prin intermediul unui computer (PC).

Acul este un mic instrument metalic, cu diferite utilizări. În laborator există ace simple și ace cu vârful spatulat sau lanceolat. În special acestea din urmă sunt utilizate la preluarea secțiunilor microscopice din cristalizor și la etalarea lor pe lama de microscop. De asemenea, acul spatulat se mai utilizează pentru desprinderea pieselor florale de pe receptacul, în scopul analizei florale.

Placa încălzitoare (platina șofantă), este o piesă metalică utilizată la, includerea preparatelor microscopice în masă gelatinoasă sau în parafină. În acest fel se obțin preparate microscopice zise fixe (prin opoziție cu preparatele extemporanee), preparate care pot fi examinate și după multă vreme (ani) de la includere.

1.4. Aparatură optică de laborator

1.4.1. Istoric

Multă vreme instrumentele optice (lupa mai întâi, și apoi microscopul) au reprezentat singurele instrumente utilizate în științele biologice. Dacă din punct de vedere istoric rolul lupei pare să fi fost minor în cunoașterea lumii vii, apariția microscopului a produs o adevărată revoluție științifică.

Botanica și științele biologice în general, fac parte dintre cele mai vechi preocupări de cunoaștere ale umanității. De multă vreme oamenii au observat plantele, au încercat să le descrie, caracterizeze, deseneze și clasifice după diverse criterii. În antichitate și până spre sfârșitul Evului Mediu, cei interesați de studiul plantelor utilizau exclusiv ochiul neajutat de vreun alt instrument pentru cunoașterea acestora. Sticla a fost inventată în primul secol creștin și se pare că romanii au efectuat unele investigații optice cu ajutorul ei. Un anonim a descoperit că o sticlă mai groasă la mijloc și mai subțire la margini așezată deasupra unui obiect îl face să pară mai mare. Un alt necunoscut a descoperit că o asemenea bucată de sticlă, numită lentilă (din latinescul *lens*, care înseamnă linte, datorită asemănării cu un bob de linte) este capabilă să focalizeze razele soarelui și să aprindă un foc. De aceea, aceste lentile se mai numeau și sticle arzătoare. Se pare că până prin secolul XIII această utilizare pragmatică a lentilelor (pentru aprinderea focului) era mult mai importantă și răspândită decât aceea a iscodirii lumii vii.

În cursul secolului al XIII-lea este inventată lupa ca instrument de observație științifică. Meritul îi este atribuit filozofului englez Roger Bacon (1214-1294), unul din primii susținători europeni ai metodei științifice. Undeva spre sfârșitul aceluiași secol (XIII) a apărut și un interes comercial pentru lentile, care au început să fie utilizate sub forma ochelarilor pentru corecția deficiențelor de vedere. Cu această ocazie se manifestă un interes mai sporit și pentru lupe, care de obicei măreau între 6 și 10 ori. Erau utilizate frecvent pentru observarea puricilor și altor insecte minuscule, fiind cunoscute în unele părți ale Europei ca „sticle de purici”.

Spre sfârșitul secolului XVI (în jurul anului 1590), doi fabricanți olandezi de lentile, Hans Janssen și fiul său, Zaccharias Janssen, încep să facă experimente cu lentile și descoperă că punând mai multe lentile într-un tub, se obținea o putere de mărire semnificativ mai mare decât a unei simple lupe. Așa a apărut microscopul, numit uneori și „microscop compus”, pentru că este compus din două sau mai multe lentile. După descoperirea lor, interesul pentru microscop și optică s-a îmbunătățit considerabil, unul dintre primii interesați de utilizarea științifică a microscopului și a opticii în general, fiind Galileo Galilei. El a perfecționat atât microscopul, cât și telescopul.

Tot în Olanda, în secolul al XVII-lea a trăit Antonie Leeuwenhoek (1632-1723)⁵, un mic negustor care avea o afacere în domeniul textil. El utiliza un microscop foarte primitiv pentru examinarea țesăturilor sale. A căpătat însă un interes atât de special pentru microscop, încât a început să își construiască (prin șlefuire) singur lentile. Acestea erau de o calitate deosebită, reușind cu timpul să construiască un microscop care mărea de 270 de ori, o performanță deosebită pentru epoca sa. Undeva după 1665, după ce a luat cunoștință de cartea lui Robert Hooke intitulată *Micrographia*⁶, un best-seller al epocii care descria observațiile făcute de acest „părinte englez al microscopiei”, Leeuwenhoek a devenit interesat de utilizarea microscopului în scopuri științifice. El a trimis celebrei Societăți Regale engleze peste 500 de scrisori, echivalentul articolelor științifice de astăzi, descriind printre altele pentru prima dată unele organisme unicelulare (bacterii, protiste).

Robert Hooke (1635-1703), cu trei ani mai tânăr decât „părintele olandez al microscopiei”, l-a precedat în ce privește utilizarea microscopiei în scopuri științifice (prin *Micrographia*, care conține observații efectuate cu microscopul, dar și cu telescopul), dar nu a contribuit la perfecționarea tehnică a microscopului, cum a făcut-o olandezul. El este cel care a utilizat pentru prima dată termenul „celulă” pentru a descrie micile unități structurale care alcătuiesc organismele vii.

Micrographia lui Hooke și scrisorile lui Leeuwenhoek adresate Societății Regale au generat curând o emulație și un interes științific fără precedent pentru investigarea științifică a lumii vii și nevii cu ajutorul instrumentelor optice. Microscopia optică a cunoscut de atunci constante îmbunătățiri și perfecționări, contribuind la acumulări constante de cunoștințe în domeniul științelor biologice, și nu numai. În secolul al XIX-lea și în special în secolul al XX-lea, odată cu perfecționarea progresivă a tehnicii s-au adus diferite modificări microscopului optic, construindu-se diferite tipuri de microscopie, precum: microscopul cu câmp întunecat (cu fond negru), microscopul cu fluorescență, microscopul cu contrast de fază, microscopul cu contrast de interferență, microscopul cu raze ultraviolete, microscopia de scanare cu laser confocal, microscopul cu deconvoluție și altele. Pe de altă parte, începând cu secolul XX, s-au construit și microscopie bazate pe alte principii decât cele strict optice: microscopul electronic, microscopie cu sondă de scanare (microscopul cu forță atomică, microscopul cu forță fonică, microscopul cu efect tunel).

1.4.2. Lupa

Lupa este un instrument optic alcătuit de dintr-o lentilă convergentă care, fiind așezat în fața unui obiect, dă o imagine mărită a acestuia. Cel mai frecvent lentila este montată pe un suport circular și în funcție de scopul în care este utilizată, poate fi prevăzută cu un mâner, stativ sau alte accesorii care să-i faciliteze utilizarea.

Puterea de mărire sau *grosismul* unui instrument optic reprezintă raportul dintre dimensiunea aparentă a imaginii și cea reală a obiectului, altfel spus un număr care ne arată de câte ori mărește instrumentul optic un obiect. Aceasta este o definiție intuitivă, ușor de înțeles a grosismului. Întrucât dimensiunea aparentă a obiectului nu poate fi măsurată, în realitate se folosește așa-numitul *grosism unghiular* (angular), care corespunde raportului dintre unghiul sub care este văzut obiectul prin instrumentul optic în raport cu unghiul sub care este văzut obiectul cu ochiul liber. Lupa are grosismul cuprins între 2x și 40x.

În biologia vegetală lupa este utilizată pentru observarea detaliilor morfologice care nu pot fi percepute cu ochiul liber și la efectuarea schemelor secțiunilor transversale prin organele plantei. Spre deosebire de examenul microscopic, examenul unui specimen cu ajutorul lupei nu necesită în general prelucrarea acestuia. Sursa de lumină este soarele sau lumina de interior. Înregistrarea imaginii se face printr-un desen manual sau prin narațiune (înregistrare

⁵ La maturitate, considerând că este suficient de cunoscut pentru meritele sale, olandezul și-a adăugat singur particula nobiliară *van*, astfel încât este de obicei cunoscut ca *van Leeuwenhoek*.

⁶ Robert Hooke, "Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses". London: J. Martyn and J. Allestry, 1665.

„anecdotică”). În domeniul biologiei se utilizează cel mai frecvent două tipuri de lupe: *lupa de mână* (de teren) și *lupa de laborator* (de disecție).

Lupa de mână (fig. 1.12) este formată dintr-o lentilă convergentă (biconvexă, mai rar plan-convexă) inclusă într-un inel metalic prevăzut cu un mâner. Este ușor de manevrat și transportat, fiind utilă în special la studierea plantelor pe teren; din acest motiv se mai numește și *lupă de teren*. Focalizarea ariei de interes se face deplasând lupa și specimenul unul în raport cu celălalt.

Lupa de laborator (numită și *lupă de disecție*, și, în general în publicațiile vechi, *microscop simplu*)⁷ are o alcătuire mai complexă decât lupa de mână (fig. 1.13). Este utilizată în biologia vegetală la analiza florală și la realizarea schemelor secțiunilor transversale, pentru respectarea raportului dintre țesuturi.

Există diferite modele în funcție de fabricant, dar în general o lupă de laborator este formată din următoarele piese (fig. 1.14):

- a) un **stativ metalic** cu rol de suport al părții optice și care conferă stabilitate ansamblului;
- b) o **coloană verticală** (din metal, mai rar alt material) care susține măsura port-obiect;
- c) **măsura port-obiect**, formată dintr-un cadru (dreptunghiular, circular) acoperit de o placă de sticlă transparentă, pe care se aduce obiectul de observat;
- d) un **tub metalic** care glisează în coloana verticală, permițând stabilirea distanței optime dintre lentilă și obiect, și care permite imobilizarea lentilei la distanța respectivă ;
- e) o **oglină** situată sub măsura port-obiect (are rolul iluminării preparatului);
- f) **dispozitivul optic propriu-zis** – o lentilă sau combinație de lentile (de regulă convergente), fixate într-un cadru metalic pe care este înscrisă puterea de mărire a lupei;
- g) o **pârghie a lupei**, prinsă de tubul manevrabil. Aceasta susține lentila și permite mișcarea circulară a acesteia, astfel încât să fie adusă deasupra obiectului de examinat.



Fig. 1.12. Lupă de mână (Zeiss)



Fig. 1.13. Lupe de laborator

Deși grosimentul lupei este destul de limitat (2x-40x), aceasta prezintă următoarele avantaje:

- a) manevrare ușoară (mai puțin pretențioasă decât în cazul microscopului);
- b) obținerea unei imagini drepte (la microscop, imaginea este răsturnată);

⁷ Spre deosebire de microscopul propriu-zis numit inițial și microscop compus, pentru că era compus din mai multe lentile.

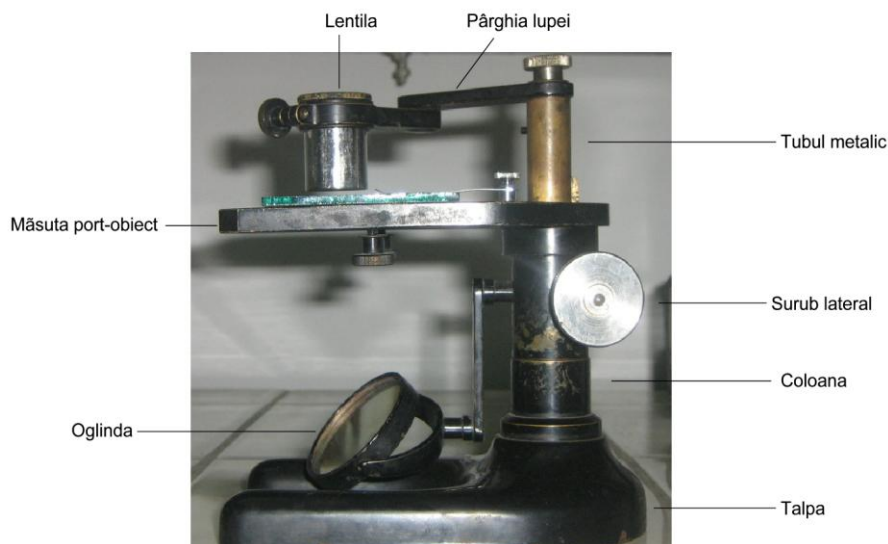


Fig. 1.14. Părțile componente ale lupei de laborator

- c) costuri mai mici în raport cu microscopul (nu doar prețul de achiziție este mult mai mic, dar și întreținerea este mai simplă și durată de viață mai lungă, datorită structurii sale necomplicate).

Alte tipuri de lupe. Există lupe specializate pentru diferitele domenii ale activităților umane, cum ar fi lupa geologică (utilizată în geologie), lupa textilă (utilizată în industria textilă), lupa filatelică (utilizată de filатели), lupa ceasornicarului (lupă oculară) etc. Toate funcționează după aceleași principii, construcția lor fiind adaptată activităților respective. Aceste lupe pot fi utilizate foarte bine și în alte scopuri decât cele principale (tipice) pentru care au fost construite. De exemplu, luptele textile, destinate numărării firelor dintr-o țesătură și prevăzute cu o rețea gradată au fost și mai sunt încă uneori utilizate de fotografi pentru a controla detaliile negativelor, în special în tehnica argentică. Lupa ceasornicarului poate fi mai corect denumită o *lupă oculară*, lupă care se plasează pe arcada ochiului, nefiind necesară ținerea ei cu mâna, dar care poate fi utilizată în numeroase alte domenii.

Lupa digitală. Sub această denumire (lupă digitală) sunt cunoscute sistemele industriale de observație destinate să înlocuiască lupa clasică. Acestea au avantajul unui confort vizual sporit în raport cu lupa clasică, la utilizarea căreia oboseala intervine rapid, în special în cazul persoanelor care sunt nevoite să lucreze perioade lungi de timp cu ea (de exemplu în departamentele de controlul calității).

Luptele digitale sunt compuse dintr-o cameră digitală (alb-negru sau color), un obiectiv cu grosiment fix sau variabil, un software de achiziție a imaginii și de afișare pe ecran a acesteia și un suport fix sau mobil, reglabil. Uneori acest tip de instrument este numit (impropriu) și microscop digital.

Principiul de formare a imaginii prin lupă.

Formarea imaginii în lupă se bazează pe refracția razelor de lumină care traversează lentila lupei. Pentru simplificare, vom considera un obiect de examinat liniar, un simplu segment de dreaptă, notat **ab** (fig. 1.15.). Fie obiectul **ab** și o lupă formată dintr-o lentilă convexă cu centrul **c** și focarul **f**. Pentru a se putea forma o imagine mărită, este necesar ca obiectul să fie așezat între centrul

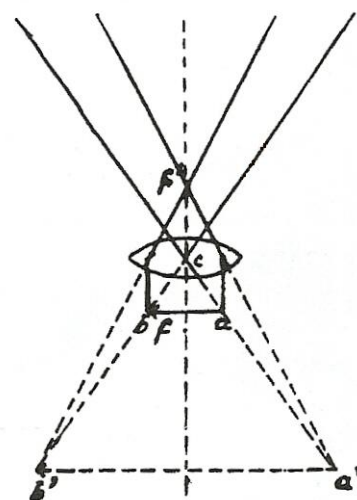


Fig. 1.15. Formarea imaginii prin lupă (după A. Ionică, F. Ștefănescu, M. Alexandru)

și focarul lentilei. Dintre razele de lumină care pornesc de la obiect, unele sunt refractate și se întâlnesc în focarul f' , iar altele trec nedeviate prin centrul optic c al lentilei (ac și bc). Acestea din urmă nu se intersectează cu razele refractate pentru a forma o imagine reală, dar se prelungesc în sens contrar și formează o imagine virtuală, dreaptă și mărită $a'b'$ în spatele obiectului, percepută de ochiul uman.

1.4.3. Microscopul

Microscopul este un instrument care utilizează mai multe lentile pentru a produce imagini mărite, cu detalii fine, ale obiectelor prea mici pentru a fi observate cu ochiul liber. Importanța microscopului a fost decisivă pentru evoluția științelor biologice. El a deschis ochii lumii științifice la existența unor structuri și elemente nebănuite până atunci – mai întâi celulele, apoi organele celulare. De la descoperirea lui, microscopul a fost utilizat pentru studierea lumii vii și continuă să fie utilizat și astăzi. Dacă însă în secolul al 17-lea microscopul optic se bucura de o putere de mărire de 200-300 de ori, astăzi microscopul optic standard atinge o putere de mărire de 1000 de ori, iar microscopul optic mai performant poate atinge un grosiment de 1500. Este astfel posibil să se distingă structuri de până la 0,5 micrometri. Cu ajutorul microscopului optic se pot deci observa nu doar celule vegetale sau animale (5-100 μm), dar și unele organe celulare cum sunt mitocondriile și cloroplastele (2-10 μm), precum și procariote cum sunt bacteriile sau cianobacteriile (1 μm).

O creștere încă și mai semnificativă a puterii de mărire a fost posibilă odată cu inventarea microscopului electronic în anul 1930. Înlocuind lumina vizibilă cu fluxuri de electroni și lentilele optice cu magneți care focalizează fluxurile electronice respective, s-a ajuns la o putere de mărire de 100.000 de ori și, în cazul celor mai performante, de 200.000 de ori. Aceasta permite studierea nu doar a structurii interne a celulelor, dar chiar și a unor molecule individuale cum ar fi proteinele sau acizii nucleici.

Există așadar, două tipuri fundamentale diferite de microscop: *microscopul optic* și *microscopul electronic*. Microscopul optic utilizează o serie de lentile de sticlă pentru a focaliza un fascicul de fotoni și a forma o imagine, în timp ce microscopul electronic utilizează o serie de lentile electromagnetice care focalizează un fascicul de electroni (vezi fig. 1.16). La limită, microscopul optic poate mări imaginea de cca. 1500 de ori, pe când cel electronic de cca. 200.000 de ori. La aceste două tipuri fundamentale s-a adăugat relativ recent un al treilea tip de microscop, *microscopul cu sondă* (cu forță atomică, cu efect tunel), a căror utilizare în domeniul biologic începe să fie tot mai frecvent explorată.

Capacitatea de mărire sau *grosimentul* nu reprezintă neapărat cea mai bună măsură a calităților și utilității unui microscop. *Rezoluția*, capacitatea de a distinge între două puncte situate la o distanță foarte mică asigură o estimare mult mai fiabilă a utilității unui microscop. De ce? Pentru că o imagine poate fi mărită foarte mult fără a câștiga vreun avantaj în observarea detaliilor. O imagine obținută la microscopul optic cu lentile relativ mici poate fi mărită foarte mult, de exemplu prin proiectarea ei pe un ecran cinematografic; totuși, nu vom observa mai bine detaliile decât privind direct prin ocularul microscopului, deoarece imaginea proiectată pe ecranul de cinema, deși foarte mare, nu va fi mai clară. Rezoluția este de aceea mult mai importantă decât grosimentul (sau mai bine zis, grosimentul capătă sens doar când este însoțit de o rezoluție adecvată). Microscopul optic are o limită de rezoluție de cca. 0,5 micrometri (μm)⁸; cele electronice au o rezoluție de până la 1 nanometru (1 nm). Progrese tehnologice recente au îmbunătățit limita de rezoluție a microscopului optic la 0,2 μm în unele aplicații speciale. Cu ajutorul microscopului optic pot fi observate atât celule vii, cât și celule moarte, adesea în culoarea lor reală, pe când cu microscopul electronic pot fi observate numai celule moarte și niciodată în culoarea lor adevărată.

⁸ Rezoluția limită teoretică este de jumătate din lungimea de undă, ceea ce pentru o lumină cu $\lambda=400$ nm înseamnă 200 nm sau 0,2 μm ; limitările de construcție a instrumentelor fac însă ca 0,5 micrometri să fie o limită mai realistă pentru microscopul obișnuit (a se vedea fraza următoare din text).

Aplicațiile celor două tipuri de microscopae (cu variantele lor) sunt în general diferite, în funcție de obiectivul urmărit. De exemplu, pentru studierea principalelor țesuturi care alcătuiesc un organism vegetal este suficient microscopul optic clasic. Dacă, dimpotrivă se dorește măsurarea concentrației unei substanțe într-o celulă embrionară vie, într-un interval de ordinul milisecundelor, este necesar un microscop optic mai perfecționat (numit adesea *sistem imagistic*). În sfârșit, dacă se dorește localizarea unei proteine într-unul sau mai multe organite celulare, va fi necesar microscopul electronic, numai acesta beneficiind de rezoluția necesară pentru a obține asemenea imagini.

Domeniul microscopiei a suferit o renaștere în ultimele două decenii, ca urmare a progreselor înregistrate în domeniul informaticii. Majoritatea imaginilor produse de microscopae sunt acum înregistrate electronic utilizând dispozitive imagistice digitale (camere digitale, software de achiziție digitală a imaginilor, metode de afișaj digital al imaginilor). Acestea progrese au permis dezvoltarea mai multor aplicații în diferite domenii și subdomenii ale științelor biologice.

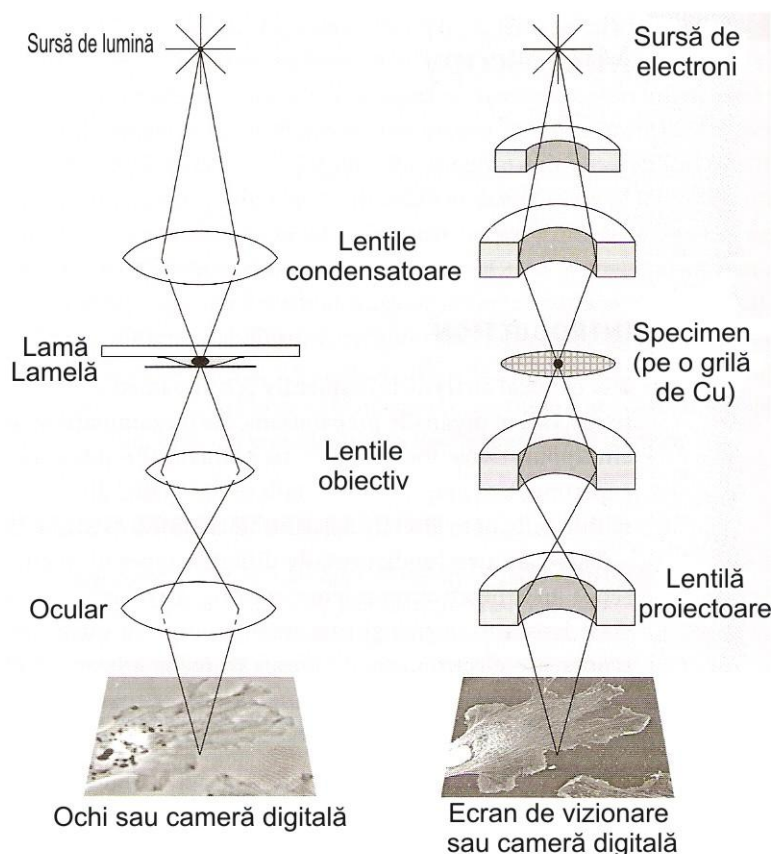


Fig. 1.16. Comparație între microscopul optic și cel electronic (după S.W. Paddock, în K. Wilson, J. Walker (edit.), *Biochemistry and Molecular Biology*)

Fiecare din cele două tipuri cunoaște mai multe variante.

1.4.3.1. Microscopul optic (fotonic)

1.4.3.1.1. Componentele principale ale microscopului optic

Cum deja s-a menționat, microscopul optic utilizează un sistem de lentile și un flux de lumină pentru formarea imaginii. Toate microscopae optice moderne sunt alcătuite dintr-o combinație de mai multe lentile de sticlă, fiind din acest motiv numite în literatura științifică de limbă engleză *microscope compuse* (lupa fiind considerată uneori un „microscop simplu”⁹,

⁹ A se vedea, de exemplu, Smith, WJ, Modern optical engineering: the design of optical systems, 4th edition, SPIE Press (McGraw-Hill Companies), New York, 2007, pp. 303-304

format dintr-o singură lentilă). Indiferent de gradul său de complexitate, orice microscop optic este format dintr-o *parte mecanică* și una *optică*. Cea mecanică funcționează ca suport al celei optice, aceasta din urmă fiind implicată direct în mărirea imaginii obiectului observat.

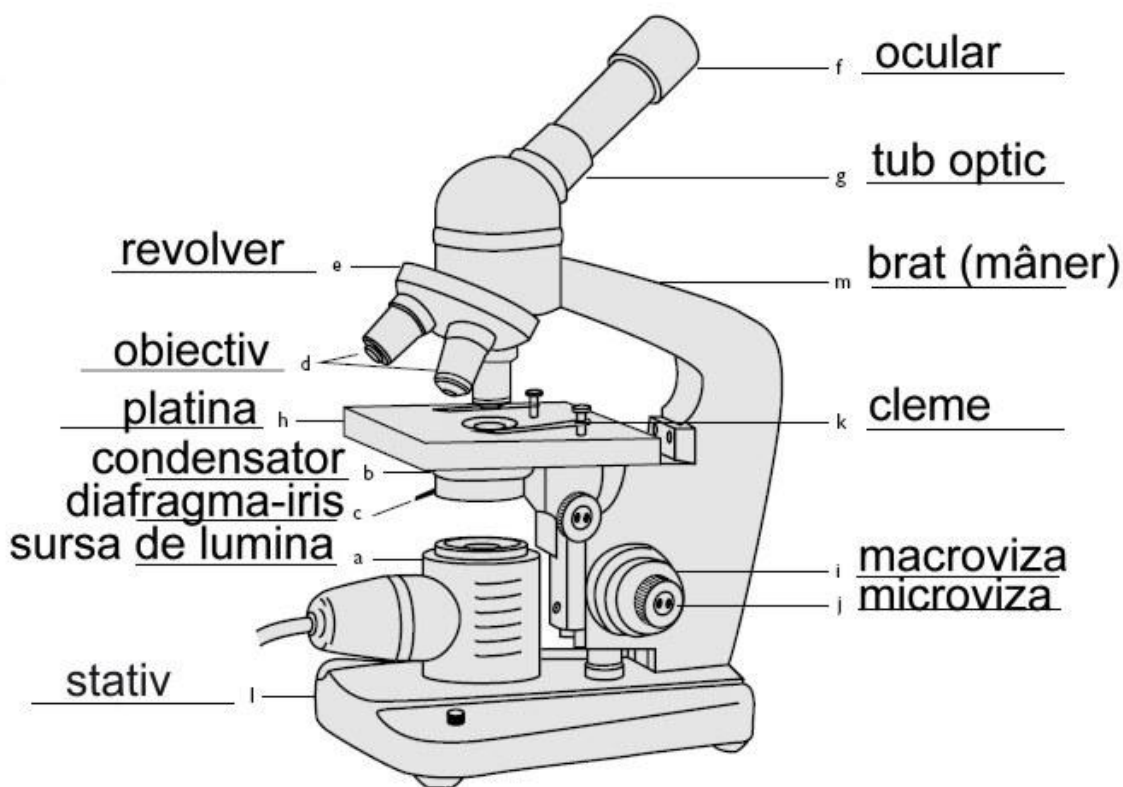


Fig. 1.17. Părțile componente ale microscopului optic (după DR Helms, CW Helms et al., 1998)

Partea mecanică (montura) microscopului cuprinde talpa, brațul, măsuta port-obiect, clemele metalice, tubul microscopului cu revolverul și șuruburile de ajustare a imaginii (macroviză și microviză) (fig. 1.17).

Stativul (talpa, piciorul) microscopului are formă pătrată sau de potcoavă și este adesea confecționată din metal, pentru a conferi stabilitate microscopului. Are rolul de suport al celorlalte componente. După tipul de stativ, se deosebesc două categorii de microscopice: drepte și inversate (acestea din urmă lasă mai mult spațiu la nivelul măsuței port-obiect).

Pe talpă se articulează **brațul sau mânerul** microscopului; acesta permite uneori înclinarea tubului optic în mod convenabil pentru examinarea imaginii. Frecvent însă mânerul este imobil, ocularele fiind înclinate din construcție cu un unghi de 45°. Împreună cu talpa, mânerul servește la deplasarea microscopului dintr-un loc în altul (microscopul se ține de talpă și braț).

Măsuta port-obiect (platina, placa) reprezintă piesa pe care se așează specimenul de examinat. Poate fi confecționată din metal, ebonită sau alte materiale. Poate avea diferite forme: pătrată, dreptunghiulară, circulară. Platina circulară se poate roti în plan orizontal (fiind numită în acest caz *platină turnantă*), iar cea dreptunghiulară sau pătrată permite deplasarea în plan orizontal pe două direcții, perpendiculare una pe cealaltă (adică dreapta-stânga și înainte-înapoi). În partea centrală măsuta port-obiect prezintă un orificiu circular sau oval, care permite trecerea razelor de lumină de la sursa luminoasă (de regulă un bec electric) situată sub măsuta port-obiect, la specimenul de examinat. Tot pe placă se află și o pereche de **cleme metalice** (numite uneori și cavaleri, călăreți sau valeți). Clemele sunt flexibile, fixate la unul din capete cu șuruburi. Rolul lor este de a fixa specimenul pe placă. Uneori clemele pot lipsi, dar în acest caz microscopul este dotat cu o placă mecanică.

Cuprins

Prefață.....	3
1. Sticlărie, instrumentar și aparatură de laborator utilizate în studiul plantelor	5
1.1. Introducere.....	5
1.2. Sticlărie de laborator.....	5
1.3. Instrumentar de laborator	8
1.4. Aparatură optică de laborator	14
1.4.1. Istoric	14
1.4.2. Lupa	15
1.4.3. Microscopul	18
2. Pregătirea specimenelor în vederea examinării microscopice. Preparate microscopice.....	63
2.1. Colectarea materialelor vegetale	63
2.2. Fixarea materialelor vegetale	64
2.3. Preparate microscopice.....	66
2.3.1. Obținerea de „preparate umede“	67
2.3.2. Secționarea produselor vegetale	67
2.3.3. Atașarea secțiunilor obținute prin încorporare în parafină de lamele de sticlă	77
2.3.4. Obținerea preparatelor superficiale	78
2.3.5. Clarificarea preparatelor	79
2.3.6. Colorarea preparatelor microscopice.....	80
2.3.7. Montarea și lutarea preparatelor microscopice.....	92
3. Celula vegetală.....	99
3.1. Peretele celular	103
3.1.1. Preparate microscopice pentru studierea punctuațiilor celulare	104
3.1.2. Preparate microscopice pentru evidențierea mineralizării	106
3.1.3. Preparate microscopice pentru studierea lignificării peretelui celular	107
3.1.4. Preparate microscopice pentru studierea cuticulei epidermice	109
3.1.5. Preparate microscopice pentru studierea peretelui celular suberificat	111
3.1.6. Preparate microscopice pentru studierea membranelor gelificate	113
3.2. Incluziuni vacuolare	114
3.2.1. Preparat superficial din epiderma superioară a frunzelor de <i>Zebrina pendula</i>	114
3.2.2. Preparat superficial din epiderma frunzei de <i>Gynura procumbens</i>	115
3.2.3. Nisip oxalic observat în frunza de <i>Atropa belladonna</i>	116
3.2.4. Cristale prismatice mari, izolate din bulbul de <i>Allium cepa</i>	117
3.2.5. Druze de oxalat de calciu în rădăcina de <i>Saponaria officinalis</i>	118
3.2.6. Rafidii din pețiolul frunzei de <i>Parthenocissus quinquefolia</i>	120
3.2.7. Sferocristale de inulină în radicelele tuberizate de <i>Dahlia variabilis</i>	121
3.2.8. Granule de aleuronă complexă în semințele de <i>Ricinus communis</i>	123
3.2.9. Granule de aleuronă simplă și picături uleioase din sămânța de <i>Juglans regia</i>	124
3.2.10. Granule de aleuronă simplă din endospermul cariopselor de <i>Triticum vulgare</i>	125
3.2.11. Granule de aleuronă din semințele de <i>Cucurbita pepo</i>	125
3.3. Plastidele.....	126
3.3.1. Cloroplaste.....	126
3.3.2. Cromoplaste.....	132
3.3.3. Amiloplaste.....	134
4. Diviziunea celulară	139
4.1. Teoria celulară a vieții	139
4.2. Organizarea celulară a materialului genetic	140
4.3. Interfața	141
4.4. Mitoza.....	143
4.5. Citocineza	145
4.6. Observarea fazelor mitozei în vârfurile radiculare	146
4.7. Meioza	151
4.8. Observarea meiozei în celula vegetală	155
4.9. Comparatie între mitoză și meioză	158
5. Histologia (studiul țesuturilor vegetale).....	161
5.1. Țesuturile primitive	161
5.2. Țesuturile evoluat	161
5.2.1. Țesuturile meristematice (meristeme)	161
5.2.2. Țesuturi definitive.....	162
5.2.2.1. Țesuturile de apărare.....	163
5.2.2.2. Țesuturile fundamentale	173
5.2.2.3. Țesutul mecanic	179

5.2.2.4. Țesutul conducător.....	184
5.2.2.5. Țesutul secretor.....	194
6. Rădăcina (radix)	201
6.1. Morfologia rădăcinii.....	201
6.2. Structura anatomică a rădăcinii	206
6.2.1. Structura primară a rădăcinii	206
6.2.2. Structura secundară a rădăcinii.....	210
7. Tulpina	219
7.1. Morfologie.....	219
7.2. Structura anatomică a tulpinii.....	228
7.2.1. Structura primară a tulpinii.....	228
7.2.2. Structura secundară a tulpinii la <i>Dicotyledonatae</i>	236
8. Frunza (folium)	243
8.1. Introducere.....	243
8.2. Filogenia frunzei.....	244
8.3. Ontogenia frunzei	244
8.4. Prefoliație (vernație).....	245
8.5. Foliație (estivație).....	246
8.6. Părțile componente ale frunzei	246
8.6.1. Limbul (lamina) frunzei.....	247
8.6.2. Baza limbului.....	251
8.6.3. Vârful limbului	252
8.6.4. Suprafața frunzei.....	252
8.6.5. Consistența limbului	253
8.6.6. Marginile limbului	254
8.6.7. Nervațiunea limbului	256
8.6.8. Morfologia pețiolului.....	258
8.6.9. Baza frunzei.....	259
8.7. Anexele foliare	259
8.8. Dispoziția frunzelor pe tulpină	261
8.9. Frunze metamorfozate	263
8.10. Anatomia frunzelor.....	276
8.10.1. Structura frunzuliței la <i>Bryophyta</i>	276
8.10.2. Structura frunzei la <i>Pteridophyta</i>	277
8.10.3. Structura frunzei la <i>Prespermatophyta</i>	278
8.10.4. Structura frunzei la <i>Gymnospermae</i>	279
8.10.5. Structura frunzei la <i>Angiospermae</i>	281
8.11. Frunza ca sursă de medicament.....	297
9. Floarea (flores, flos).....	303
9.1. Floarea la <i>Gymnospermae</i> (<i>Coniferae</i> , <i>Pinophytae</i>)	303
9.2. Floarea la <i>Chlamydospermae</i>	305
9.3. Floarea la <i>Angiospermae</i> (<i>Magnoliophytae</i>)	307
9.3.1. Structura florii la <i>Angiospermae</i>	308
9.3.2. Analiza florală. Formule și diagrame florale.....	321
9.3.3. Inflorescențe - definiție, tipuri de inflorescențe	327
9.3.4. Structura internă (anatomia) elementelor florale: sepale, petale, stamine, gineceu	334
9.3.5. Produse vegetale de tip <i>flos</i> (<i>flores</i>)	343
10. Fructul (fructus, pericarpium)	349
10.1. Morfologia fructului	349
10.1.1. Fructe simple	349
10.1.2. Fructe multiple (fig. 10.13.).....	356
10.1.3. Fructe compuse.....	358
10.1.4. Fructe false (pseudofructe)	359
10.2. Structura anatomică a fructului.	360
10.2.1. Structura anatomică a fructului de <i>Phaseolus vulgaris</i> (fasole), familia <i>Fabaceae</i>	361
10.2.2. Structura anatomică a fructului de <i>Capsicum annuum</i> (ardei), familia <i>Solanaceae</i>	362
10.2.3. Structura anatomică a fructului de <i>Foeniculum vulgare</i>	363
10.3. Plante medicinale de la care se folosesc fructele	364
11. Sămânța (semen).....	369
11.1. Morfologia seminței	369
11.1.1. Tegumentul seminal	371
11.1.2. Endospermul secundar (albumenul)	373
11.1.3. Embrionul	374
11.2. Structura anatomică a seminței.....	375
11.2.1. Structura anatomică a tegumentului seminal.....	375

11.2.2. Structura anatomică a endospermului.....	375
11.2.3. Structura anatomică a embrionului.....	376
11.3. Semințe albuminate	377
11.3.1. Morfologia și structura anatomică a seminței de <i>Ricinus communis</i> L. (ricin).....	377
11.3.2. Morfologia și structura anatomică a seminței de <i>Linum usitatissimum</i> L. (în), familia <i>Linaceae</i> ..	378
11.4. Semințe exalbuminate	379
11.4.1. Morfologia și structura anatomică a seminței de <i>Cucurbita pepo</i> L., familia <i>Cucurbitaceae</i>	379
11.4.2. Morfologia și structura anatomică a seminței de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (fasole)	380
11.5. Sămânța – sursă de medicament.....	381
Index de termeni botanici	384
Index de denumiri în limba latină	391
Cuprins	397