

SECCION LABORATORIOS DE LA FACULTAD

Nota de técnica histológica relativa al ablandamiento y examen de maderas

Por el Ing. Agr. EMILIO J. RINGUELET

La curiosidad me llevó a ensayar algunos métodos de ablandamiento de maderas para su examen histológico, sobre todo en el deseo de conocer el del acetato de celulosa, citado por Chamberlain (1) en su libro de técnica histológica vegetal. Este autor, hablando en términos generales, cree que el método está destinado a tener éxito con tejidos leñosos duros, pero confiesa que algunos investigadores no lo han tenido en sus experiencias; transcribe en su totalidad la nota de Mr. H. S. Williamson (2), del Imperial College of Science and Technology, aparecida en « Annals of Botany » de enero de 1921, como la única información publicada sobre ese tema. El informante se refiere al acetato de celulosa como sustancia empleada para la inclusión y encastramiento de estructuras vegetales duras, pero que, además, permite ablandarlas y cortarlas fácil y suavemente, y describe el método con detalles.

Me propuse pues, hacer un estudio comparativo de métodos de ablandamiento, incluyendo por una parte éste del acetato de celulosa, no para encastrar sino sólo para ablandar maderas (que no necesitan encastrarse para ser seccionadas), y por otra parte otros muy conocidos y hasta podría decirse clásicos, como p. ej., los que se basan en la acción de la glicerina con agua o con alcohol, del agua en ebullición o de ácidos diluïdos como el ácido fluorhídrico, y aplicarlos a maderas de diferente dureza para saber qué ventajas o inconvenientes presentan los unos y los otros.

(1) CHAMBERLAIN CHARLES J., *Methods in plant histology*. Chicago, 1924, páginas 130-131.

(2) WILLIAMSON H. S., *A new method of preparing sections of hard vegetable structures*, en « Annals of Botany ». London, 1921, vol. 35, N° 137 (enero), p. 139.

Dejé de lado deliberadamente los micrótomos hechos especialmente para cortar maderas sin tratamiento previo, que algunos autores emplean, como talvez Esteve M. A. (3) en su estudio anatómico de maderas, porque sin dar más explicaciones sobre la técnica empleada, dice que hizo las secciones valiéndose del micrótomó automático de la Escuela. En general, estos micrótomos no son empleados, y autores como W. S. Jones (4), los consideran muy costosos y en la mayoría de los casos completamente innecesarios.

MATERIAL EMPLEADO EN LOS ENSAYOS

Como tipo de madera no muy dura y de un árbol vivo, empleé la de una rama de eucalipto de 5 años (*Eucalyptus globulus*), cortada en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía. En cambio, como tipo de madera muy dura, empleé un trozo de quebracho colorado procedente de un corralón de la ciudad, en cuyos establecimientos es considerada como una de las maderas más duras del país, sino la más dura; con toda probabilidad, el trozo empleado pertenece al duramen del *Shinopsis Balansae*.

Dada la índole del trabajo, no me preocupó la determinación exacta de la especie botánica, bastándome su condición de maderas y la gran dureza de la una con relación a la dureza relativa de la otra.

Primeramente ensayé con la madera de eucalipto, ablandando, seccionando y coloreando las preparaciones; luego hice lo propio con la madera de quebracho, y para ambas hice preparar cubos de 1 cm de lado aproximadamente; los cubos de eucalipto contenían la médula, de donde resulta que las secciones fueron hechas en la región vecina a la misma, y además, entre el momento de cortarlos y el de hacer las secciones microscópicas, pasó un tiempo mínimo de 4 meses.

MÉTODOS EMPLEADOS PARA ABLANDAR Y SECCIONAR

Empleé cuatro procedimientos para ablandar los cubos, concretándome a los tipos principales:

(3) ESTEVE MIGUEL ANGEL. *Estudios anatómicos de las maderas*, en « Actes du 1er. congrès international de sylviculture », Rome, 1926, vol. 4, p. 531.

(4) JONES W. S.. *Timbers, their structure and identification*. Oxford, 1926, p. 136.

a) *Agua en ebullición.*— Se coloca el cubo de madera en agua destilada y se hace hervir sobre el mechero hasta que se pueda seccionar con la navaja; la ebullición en agua, al mismo tiempo, desaloja el aire y materias colorantes contenidas en la madera. Jones (5) dice que, en general, es innecesario adoptar métodos que impliquen un considerable cambio químico en el carácter de las membranas celulares y que, en casos comunes, algunas posibles ventajas están contrabalanceadas por el mayor tiempo empleado en la inmersión y las manipulaciones extras que esos tratamientos implican; agrega que la necesidad de tratamientos drásticos ocurre sólo en el caso de ciertas especies exóticas muy duras, y que las maderas descritas que ilustran su trabajo, en su mayor parte, fueron cortadas sin tratamiento preliminar y el resto fué solamente hervido en agua durante media hora y puesto en una mezcla de partes iguales de glicerina y alcohol. Piccioli (6) aconseja el mismo sistema o el estacionamiento en la mezcla de glicerina y agua o de glicerina y alcohol; también lo cita Pujiula (7).

b) *Alcohol y glicerina.*— Se introduce el cubo de madera en una mezcla de alcohol y glicerina por partes iguales, dejándolo hasta que se pueda seccionar. Citan este método, p. ej., Jones (8), Piccioli (9), Strasburger (10), Pujiula (11) y Catalano (12); este autor aconseja, además, el lacto-fenol de Amann, que tiene también glicerina. Beauverie (13) aconseja la mezcla de Gérard que contiene agua y glicerina, adicionada de una pequeña cantidad de hidrato de potasio.

c) *Acido fluorhídrico.*— Se pone el cubo de madera tres veces en agua en ebullición (durante dos minutos cada vez) y dos veces en agua fría (durante un minuto por vez), alternativamente, para

(5) JONES W. S., ob. cit., p. 136.

(6) PICCIOLI LUDOVICO, *I legnami*. Torino, 1927, p. 222.

(7) PUJIULA P. JAIME, *Citología*. Barcelona, 1914-15, parte práctica, p. 52.

(8) JONES W. S., ob. cit., p. 136.

(9) PICCIOLI L., ob. cit., p. 222.

(10) STRASBURGER E., *Manuel technique d'anatomie végétale*. París, 1886, p.p. 66 y 124.

(11) PUJIULA P. JAIME, ob. cit., p. 52.

(12) CATALANO GIUSEPPE, *Guida pratica di Anatomia e Fisiologia vegetale*. Milano, 1925, p. 42-43.

(13) BEAUVERIE J., *Les bois industriels*. París, 1910, p. 7.

expulsar el aire y preparar la madera. Se sumerge enseguida en una mezcla por partes iguales de ácido fluorhídrico y agua destilada, hasta que se pueda cortar. (Se puede emplear una cápsula de porcelana recubierta interiormente de cera). Indicado por Jones (14), Chamberlain (15) y Pujiula (16).

d) *Acetato de celulosa*. — Según indica Williamson (17) en su nota, se pone el cubo de madera en agua destilada (aproximadamente media hora) para desalojar el aire, luego en acetona pura de 24 a 48 horas (basta con un día), para que penetre en su interior y facilite la penetración del acetato de celulosa; se retira de la acetona y se sumerge instantáneamente en una solución de acetato de celulosa en acetona pura al 12 %, hasta que pueda ser seccionado. (Disolver en 100 cm³ de acetona pura, 12 grs de acetato de celulosa de manufactura francesa, como indica el autor, fabricado por la Société Chimique des Usines du Rhône, obtenido de celulosa pura, por ser de viscosidad más uniforme y dar mejor resultado que el de manufactura inglesa, obtenido de celulosa de madera).

En los ocho casos ofrecidos, es decir, madera de eucalipto y quebracho colorado ablandadas por los cuatro procedimientos arriba indicados, realicé una serie de cortes en las tres direcciones, transversal, tangencial y radial, considerando las dos primeras como las más importantes. Hice los cortes a mano, sosteniendo el trozo de madera entre los dedos y seccionando con navaja plana. Comencé siempre por los cortes transversales, que son los más difíciles de obtener, dado que en ellos se cortan normalmente las fibras y los vasos, siguiendo con los tangenciales y radiales. Para estos últimos hay que orientar previamente y con cuidado el trozo de madera, evitando que las secciones tangenciales se transformen en radiales y viceversa; a veces, conviene dividir el cubo en trozos más pequeños, siguiendo el plano de los radios medulares y guiarse con la lupa para facilitar el corte y la orientación.

(14) JONES W. S., ob. cit., p. 136 y 138.

(15) CHAMBERLAIN CHARLES J., ob. cit., p. 291.

(16) PUJUILA P. JAIME, ob. cit., p. 52.

(17) WILLIAMSON H. S., ob. cit., p. 139.

MÉTODO DE COLORACIÓN Y MONTAJE EMPLEADO

Siguiendo en general las indicaciones de Jones ⁽¹⁸⁾, el método empleado para colorear y montar las secciones puede resumirse así:

a) Sumergir las secciones en alcohol absoluto, manteniéndolas en un vidrio de reloj sobre la llama del mechero y retirándolas antes de que el alcohol alcance su punto de ebullición; con ésto se eliminan las burbujas de aire, depósitos y materias colorantes que puedan existir.

b) Sumergirlas en ácido láctico puro, como en el caso anterior, manteniéndolas sobre la llama hasta que aquél emita vapores y retirándolas antes de que se formen burbujas; el ácido láctico aclara y mejora considerablemente las secciones.

c) Pasarlas directamente a la fucsina fenicada de Ziehl, donde quedan de 1 a 2 minutos, según la concentración del colorante; hay que debilitarlo previamente con alcohol rebajado, en la medida indicada por la práctica.

d) Lavar sucesivamente con glicerina y alcohol al 50 %, en tres vidrios de reloj, para desalojar la fucsina de las cavidades y dejar teñidas sólo las pareces celulares.

e) Deshidratar en los alcoholes de grado creciente (basta con un pasaje en alcoholes de 50°, 70° y absoluto), sumergir en xilol y montar en bálsamo del Canadá. No es necesario aclarar.

En el caso de la madera ablandada con el acetato de celulosa, previamente al pasaje por el alcohol y el ácido láctico, deben sumergirse los cortes en acetona pura durante varios minutos, para desalojar el acetato de celulosa de los elementos celulares.

OBSERVACIONES

Las observaciones se refieren al tiempo empleado para obtener el ablandamiento de las maderas citadas, a la mayor o menor facilidad para efectuar los cortes, al aspecto, disposición, forma y tamaño

(18) JONES W. S., *ob. cit.*, p. 136-138.

de sus elementos constitutivos, esto es, vasos y sus puntuaciones, radios medulares y sus células, fibras y parénquima leñoso. Resulta casi obvio decir que el tiempo mínimo necesario, varía mucho en relación al estado de la navaja, cuyo borde cortante y cuya capacidad para cortar se estropean y pierden rápidamente; de ahí la imposibilidad de establecer conclusiones en términos absolutos.

MADERA DE EUCALIPTO

a) *Ablandada con agua en ebullición.* — Con este procedimiento, la madera de eucalipto permitió hacer los cortes, con relativa facilidad, a los 45 minutos de ebullición continuada. Es un procedimiento simple y cómodo, con la ventaja de que el agua hirviendo desaloja sustancias colorantes tiñéndose de amarillo rojizo.

b) *Ablandada con glicerina y alcohol,* estuvo en condiciones de ser cortada a las 17 horas, vale decir, en términos generales, poco más de medio día; pero aún con más tiempo, las secciones se hicieron con menos facilidad que en la madera hervida en agua; aunque lento, es un método cómodo.

c) *Ablandada con ácido fluorhídrico,* en la forma ya indicada, estuvo en condiciones de dar cortes transversales a las 17 horas de inmersión, es decir, poco más de medio día, y talvez lo estuviera a las 12 horas. Pero se observó mayor facilidad para seccionar en la madera hervida en agua, a pesar de haberse hecho cortes después de 48 horas de actuar el ácido; este procedimiento es incómodo por los inconvenientes del ácido fluorhídrico, que obliga a recubrir los recipientes con cera y que ataca la navaja y los objetos de vidrio próximos; por otra parte, no extrae los principios colorantes de la madera.

d) *Ablandada con acetato de celulosa* ⁽¹⁹⁾, previo estacionamiento de 25 horas en acetona pura, se pudo seccionar a las 40 horas de acción, vale decir, en un total de 65 horas de tratamiento, casi tres días. Este método resulta lento e incómodo relativamente al del agua en ebullición; es más complicado, exige precauciones por la excesiva evaporación de la acetona y los cortes transversales resultan acartuchados; además, debe tenerse en cuenta que al retirar

(19) El acetato de celulosa empleado es de procedencia francesa: remitido por la casa Poulenc y fabricado por la Soc. Chim. des Usines du Rhône.

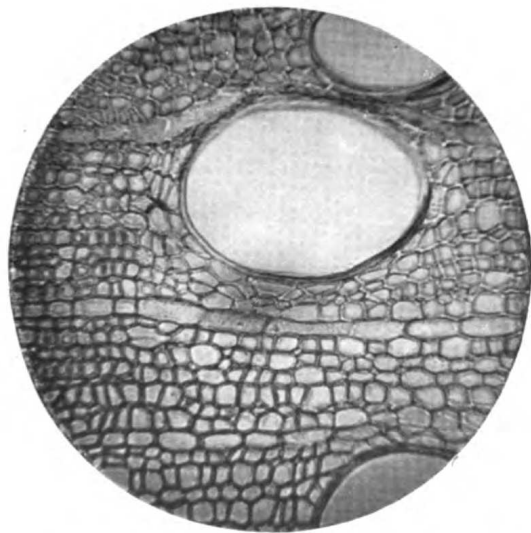


Fig. 1. — Sección transversal de madera de eucalipto ablandada con agua en ebullición; puede observarse la madera de primavera con los vasos, fibras y radios medulares uniseriados horizontales; a la izquierda, una porción de la madera de otoño, con fibras de paredes más gruesas.

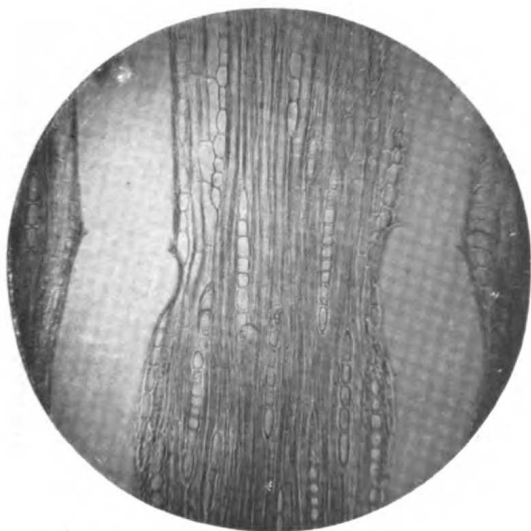


Fig. 2. — Sección tangencial de madera de eucalipto ablandada con agua en ebullición, mostrando dos vasos, las fibras continuas, los radios medulares simples y uniseriados y algunas células de parénquima perivasal, próximas al vaso de la izquierda.

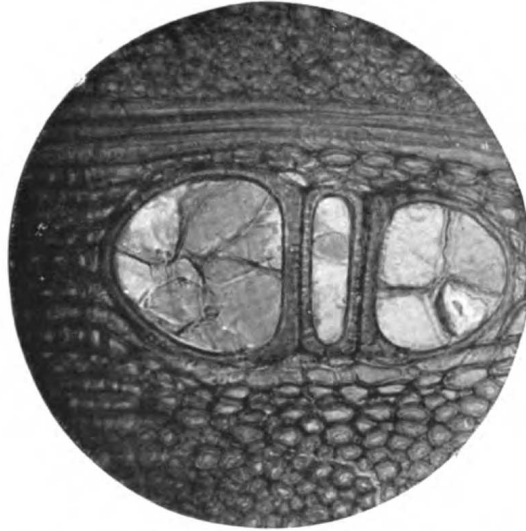


Fig. 3. — Sección transversal de madera de quebracho ablandada con agua en ebullición, mostrando tres vasos asociados de gruesas paredes perforadas por las puntuaciones, y cuyas cavidades están ocupadas por tilios; alrededor, fibras de paredes espesas y radios medulares (horizontales), uni y multiseriados; a la izquierda, fibras más densas de la madera de otoño.



Fig. 4. — Sección tangencial de madera de quebracho ablandada con agua en ebullición, en la que pueden verse dos vasos con tabiques, tilios y puntuaciones; los radios medulares simples y multiseriados, fibras tabicadas y células parenquimáticas perivasales, contiguas al vaso de la izquierda.

la madera de la solución y sacar el exceso, aquélla queda seca y penetrada por el acetato de celulosa; en esas condiciones, los cortes que se obtienen son enrollados y muy quebradizos, hay que recogerlos en seco y pasarlos a la acetona pura para extraer la sustancia incluida, eligiendo los mejores y manipulando con cuidado.

Es oportuno observar que si el líquido se prepara el día antes de usarlo, el reposo hará desaparecer los grumos aún no disueltos y las burbujas de aire producidas por la agitación, resultando perfectamente homogéneo. Conviene usar la cantidad indicada y colocarla, con el cubo de madera, en un recipiente más bien profundo y estrecho y bien tapado, a fin de evitar todo lo posible la evaporación de la acetona, sin cuya precaución la madera quedaría en seco al segundo o tercer día de inmersión. Igual observación corresponde al pasaje previo por la acetona.

* * *

Como se ve, el método que dió mejores resultados es el de hervir la madera en agua, por su simplicidad y rapidez, y por suministrar con más facilidad secciones más claras y enteras que con los otros procedimientos; se pueden obtener microfotografías aceptables, como puede verse en las figuras 1 y 2. El del acetato de celulosa resultó lento y molesto y su aplicación sin ventaja alguna, sobre todo para ablandar una madera no muy dura como la presente. Ahora bien, la observación microscópica de las preparaciones ratificó esta conclusión, pues no he observado diferencias aparentes en la estructura, esto es, en el aspecto, disposición y forma de los elementos de la madera, ablandada por cada uno de los cuatro procedimientos; la modificación en el carácter químico de las paredes y del contenido celular, si la hay, debe ser menor por la ebullición en agua que la producida por otras sustancias, especialmente el ácido fluorhídrico, y además, una modificación en su naturaleza química, sin alterar su estructura, no tendría consecuencias en un examen histológico, cuya finalidad es conocer las cualidades de la madera observada o la determinación de su especie. Tampoco acusa la medición diferencias sensibles en su tamaño.

MADERA DE QUEBRACHO

a) Ablandada con agua en ebullición. — Se obtuvieron cortes transversales aceptables, después de 7 horas de ebullición interrumpida.

vida (hirvió en dos días, quedando sumergida en agua destilada fría mientras no se hizo hervir). El agua se cargó enormemente de tanino desalojado de la madera. Dada la dureza del material, las secciones obtenidas fueron pequeñas, con aspecto de escamas.

b) *Ablandada con glicerina y alcohol*, a los 8 días se pudieron obtener buenos cortes y fácilmente, pero no tanto como de la madera hervida en agua; se extrae una pequeña parte del tanino.

c) *Ablandada con ácido hidrofúrico*, permitió obtener secciones transversales después de 3 días consecutivos de acción, pero no con igual facilidad que ablandada con agua; el ácido no desalojó el tanino, permaneciendo incoloro.

d) *Ablandada con acetato de celulosa*, previo estacionamiento de 25 horas en acetona pura, no pudo ser seccionada con facilidad sino a los 12 días de acción continuada, esto es, con un tratamiento total de más de 13 días. La acetona pura y la solución ablandante, en todo ese tiempo, desalojan solo una pequeña cantidad de tanino. Las secciones obtenidas son enrolladas y muy quebradizas, resultando casi imposible evitar su fraccionamiento; los trocitos que llegan a prepararse son pequeñas escamas, pero bastan para la observación, pues aparecen varios círculos anuales.

Con esta madera, también dió mejor resultado el tratamiento con agua, como el más simple, rápido y capaz de suministrar con facilidad relativa, cortes aceptables y casi libres de tanino. El ácido hidrofúrico le sigue en tiempo de acción, pero no desaloja el tanino; la glicerina con alcohol es un poco lenta para una madera tan dura; el de acetato de celulosa se mostró el más lento en actuar y el más molesto en su manipulación. Con las secciones obtenidas por el primer método, pueden hacerse microfotografías aceptables, a pesar de las dificultades que ofrece esta madera para seccionar con un espesor uniforme (ver figs. 3 y 4).

El examen microscópico, como en el caso anterior, no reveló diferencias en la estructura de la madera y tampoco diferencias significativas en el tamaño de sus elementos. Caben aquí las mismas observaciones hechas respecto a la madera de eucalipto (p. 7).

EMPLEO DEL HIDRATO DE POTASIO

El Ing. Juan B. Marchionatto emplea con éxito el hidrato de potasio al 10 %, de uso corriente en entomología, para ablandar

tejidos leñosos enfermos sin alterar el hongo parásito. Por indicación suya, y a último momento, ensayé este método con el mismo material y en las mismas condiciones que para los anteriores; con placer le expreso aquí mi reconocimiento.

Whetzel ⁽²⁰⁾ emplea la potasa al 7 %, pero el ingeniero Marchionatto la usa al 10 %. El procedimiento consiste en colocar el trozo de madera en alcohol de 70° durante algunos minutos, para desalojar el aire, y pasarlo luego a la solución de potasa hasta que se pueda seccionar con la navaja.

Con la madera de eucalipto, empleando una solución de K.OH al 10 %, obtuve fácilmente secciones al cabo de 1 minuto, y con mayor facilidad aún a los 2 minutos; pero las primeras mostraban un principio de disociación y cambio de estructura de los vasos; ese ablandamiento enérgico favorece el desgarramiento de los tejidos al cortar, y las secciones son malas para la observación histológica. A los 2 minutos la disociación era manifiesta, aumentando progresivamente con el tiempo. Por tanto, el empleo de la potasa con la madera blanda no fué satisfactorio.

Con la madera de quebracho colorado, la solución al 10 % debió actuar de 5 a 6 minutos para obtener cortes cómodamente; a los 15 minutos estaba en excelentes condiciones, pero debe observarse que solo se ablandó una capa superficial, debido probablemente a la gran densidad y poca porosidad de los tejidos en esta madera; este inconveniente disminuyó en parte con 30 minutos de acción, penetrando la potasa más profundamente. El líquido desaloja gran cantidad de tanino, tomando un tinte casi negro. Ahora bien, la observación demostró que 1 minuto basta para que la madera (en preparaciones malas y obtenidas con dificultad) comience a disociarse; a los 2 minutos la disociación era manifiesta y a los 3 minutos intensa, aumentando luego con mayor tiempo de acción. La estructura de los tejidos se alteró por la disociación de sus elementos, especialmente los vasos, y por la modificación de su forma y aspecto, más manifiesta en las paredes y tilios de los vasos. Ese ataque es mayor en las secciones más superficiales, es decir, en contacto directo con la potasa, que penetra difícilmente en la madera. Por otra parte, ese ataque favorece los desgarramientos al seccionar.

Repetí el ensayo empleando soluciones de menor concentración.

(20) WHETZEL H. H., *Laboratory outlines in plant pathology*. Philadelphia and London, 1925, 2ª ed., p. 220.

El empleo de la potasa al 7 % corroboró las anteriores observaciones, ablandando el quebracho para seccionarlo con relativa facilidad, después de 8 a 10 minutos; al cabo de 1 minuto, la madera mostró un principio de disociación y a los 2 minutos era intensa.

Empleando una solución al 4 %, pudo seccionarse después de 10 minutos; al cabo de 1 minuto, las preparaciones parecen mostrar un principio de alteración; a los 2 minutos es manifiesta aunque poco intensa; a los 3 minutos es bien aparente, y luego sigue en aumento.

Por consiguiente, con la madera dura, el empleo del hidrato de potasio no dió buen resultado, por su gran poder de ataque que destruye los tejidos en contacto, sin penetrar y ablandar lo suficiente. Grados de concentración menores no suprimieron el inconveniente. Su éxito se explica cuando se emplea en patología vegetal, para la observación de hongos en material leñoso seco (ramitas, etc.), sin que se altere el parásito, principal objeto de estudio.

CONCLUSIONES

1º Los cinco métodos de ablandamiento de maderas ensayados, pueden clasificarse en el siguiente orden, de acuerdo al tiempo mínimo de acción necesario para obtener secciones microscópicas: hidrato de potasio, agua en ebullición, ácido fluorhídrico, glicerina y alcohol y solución de acetato de celulosa en acetona pura.

2º Respecto a la facilidad en las manipulaciones, incluso el seccionamiento, pueden ordenarse así: agua en ebullición, hidrato de potasio, glicerina y alcohol, y con poca diferencia, el ácido fluorhídrico y el acetato de celulosa.

3º Ninguno de los cuatro métodos ensayados al principio alteró aparentemente los detalles de la estructura y el tamaño de los elementos leñosos; un cambio en la naturaleza química del contenido o de las paredes celulares, suponiendo que algunas de las sustancias empleadas pudiera determinarlo, no puede influir en el examen histológico de una madera, cuya finalidad es conocer sus cualidades o determinar su especie botánica. De todos modos, el que probablemente resulte más inocuo es el del agua en ebullición y el más perjudicial el del ácido fluorhídrico. En cambio el hidrato de potasio alteró en forma manifiesta la estructura de las maderas.

4º Por las razones apuntadas, el procedimiento que dió mejor resultado para ablandar maderas es el de la ebullición en agua; por

otra parte, si se quiere disminuir su acción, ésta puede ser completada por la de las mezclas a base de glicerina.

5º El método del acetato de celulosa sirve para ablandar maderas, lo mismo las muy duras como las blandas, pero es lento y sino complicado, al menos molesto, por lo que su empleo no ofrece ventajas. Tal vez deba esperarse su éxito usándolo combinado para ablandar, incluir y encastrar estructuras leñosas (para la observación de hifas de hongos dentro de maderas, v. gr.), como parece indicarlo Chamberlain (21) al terminar el capítulo con estas palabras: « Sería de valor, entre tanto, procurar adaptar éste método al método de la parafina ».

6º El hidrato de potasio no dió resultado como ablandante de maderas para la observación histológica y, por consiguiente, parece no ser indicado para ese fin, porque debido a la energía y rapidez de su ataque, produce la disociación de los tejidos en contacto antes de estar en condiciones de ser fácilmente seccionados. La menor concentración del líquido no modifica el resultado. Esto es más manifiesto en la madera dura, de tejido denso y escasa porosidad, donde penetra difícilmente; es lógico deducir que puede dar mejor resultado con maderas blandas y porosas, que puedan seccionarse rápidamente antes de su destrucción. Así se explica su éxito en patología vegetal para la observación de hongos en material leñoso seco (ramitas de frutales, etc.), sin alterar el parásito, principal objeto de estudio.

La Plata, agosto de 1929.

(21) CHAMBERLAIN CHARLES J., ob. cit., p. 131.

OBRAS CITADAS

- BEAUVÉRIE J., *Les bois industriels*. Paris, 1910.
CATALANO GIUSEPPE, *Guida pratica di Anatomia e Fisiologia vegetale*. Milano, 1925.
CHAMBERLAIN CHARLES J., *Methods in plant histology*. Chicago, 1924.
ESTEVE MIGUEL ANGEL, *Estudios anatómicos de las maderas*. « Actes du 1er. congrès international de sylviculture ». Rome, 1926, vol. 4, pp. 531-560.
JONES W. S., *Timbers, their structure and identification*. Oxford, 1924.
PICCIOLI LUDOVICO, *I legnami*. Torino, 1927.
PUJOL P. JAIME, *Citología. Curso teórico y práctico de Biología*. Barcelona, 1914-15.
STRASBURGER E., *Manuel technique d'Anatomie végétale*. Paris, 1886.
WHETZEL H. H., *Laboratory outlines in plant pathology*. Philadelphia and London, 1925.
WILLIAMSON H. S., *A new method for preparing sections of hard vegetable structures*. « Annals of Botany ». London, 1921, vol. 35, N° 137 (enero), p. 139.