



MICROSCOPIA CORRELATIVA MULTIESCALA PARA EL ANÁLISIS DE TEJIDOS VEGETALES

MULTISCALE CORRELATIVE MICROSCOPY FOR THE ANALYSIS OF PLANT TISSUES

Ana María Gonzalez^{1*} 

1. Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

*anagonzalez.ibone@gmail.com

Citar este artículo

GONZALEZ, A. M. 2026. Microscopía correlativa multiescala para el análisis de tejidos vegetales. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 61: 5-22.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v61.n1.51789>

[org/10.31055/1851.2372.v61.n1.51789](https://doi.org/10.31055/1851.2372.v61.n1.51789)

SUMMARY

Background and aims: Correlative multiscale microscopy (CMM) combines different microscopic techniques applied to the same sample or region of interest, enabling the integration of structural, functional, and/or compositional information across different levels of biological organization. In botany, however, its application has been limited and often focused on ultrastructural studies. This work presents and evaluates a pragmatic and reproducible MCME approach aimed at integrated anatomical analysis through spatial continuity across observational scales.

M&M: CMM was implemented by processing samples in a single paraffin block from which serial sections were obtained for different microscopic modalities: stereomicroscopy (SM), light microscopy (LM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). The methodology was applied to vegetative and reproductive organs, including normal and pathological anatomy, glandular tissues, and ontogenetic processes in *Allium*, *Eucalyptus*, *Pilostyles*, and *Adesmia*.

Results: CMM allowed the same tissue region to be followed across different observational scales, ensuring spatial correspondence between techniques and enabling structural reconstruction and integrated interpretation of developmental and tissue differentiation processes. The methodological workflow integrates SM for locating regions of interest, LM for histological analysis, CLSM for detecting structural and fluorescent signals, and SEM for micromorphological and topographical characterization.

Conclusions: CMM represents an accessible and reproducible tool that expands the interpretative power of microscopy in plant anatomy and is suitable for addressing complex structural questions in comparative, ontogenetic, and functional studies.

KEY WORDS

Confocal laser scanning microscopy, correlative multiscale microscopy, histology, light microscopy, plant anatomy, SEM, stereomicroscopy.

RESUMEN

Introducción y objetivos: La microscopía correlativa multiescala (MCME) combina técnicas microscópicas aplicadas a una misma muestra o región de interés, permitiendo integrar información estructural, funcional y/o composicional a distintos niveles de organización biológica. En botánica su uso ha sido limitado y frecuentemente centrado en estudios ultraestructurales. Este trabajo presenta y evalúa una propuesta de MCME pragmática y reproducible orientada al análisis anatómico integrado mediante continuidad espacial entre escalas.

M&M: La MCME se implementó mediante el procesamiento de muestras en un único bloque de parafina del cual se obtuvieron cortes seriados para distintas modalidades microscópicas: estereomicroscopía, microscopía óptica, confocal de barrido láser y electrónica de barrido. La metodología se aplicó a órganos vegetativos y reproductivos, incluyendo anatomía normal y patológica, tejidos glandulares y procesos ontogenéticos en *Allium*, *Eucalyptus*, *Pilostyles* y *Adesmia*.

Resultados: La MCME permitió seguir una misma región tisular a distintas escalas, asegurando correspondencia espacial entre técnicas y facilitando la reconstrucción estructural e interpretación integrada en procesos de desarrollo y diferenciación.

Conclusiones: La MCME constituye una herramienta accesible y reproducible que amplía el análisis en anatomía vegetal, con aplicaciones en estudios comparativos, ontogenéticos y funcionales.

PALABRAS CLAVE

Anatomía vegetal, histología, MEB, microscopía confocal de barrido láser, microscopía multiescala, microscopía óptica, estereomicroscopía.

Recibido: 22 Ene 2026

Aceptado: 9 Mar 2026

Publicado en línea: 31 Mar 2026

Publicado impreso: 31 Mar 2026

Editora: Josefina Bodnar 

ISSN versión impresa 0373-580X

ISSN versión on-line 1851-2372

INTRODUCCIÓN

Las plantas son sistemas multicelulares complejos, caracterizados por una marcada heterogeneidad de tipos celulares con distintos grados de especialización y combinaciones variables de paredes celulósicas y lignificadas, organizadas en múltiples tejidos dentro de un mismo órgano. Estos tejidos mantienen continuidad a través de distintos órganos, configurando una organización multiescala en la que los procesos biológicos involucran simultáneamente niveles organográficos, tisulares, celulares y micromorfológicos. A esta complejidad estructural se suma la dimensión ontogenética, ya que el desarrollo de órganos vegetativos y reproductivos, y procesos asociados a ellos como la esporogénesis y la gametogénesis, implican cambios progresivos y coordinados en la organización celular y tisular a lo largo del tiempo. En numerosos sistemas botánicos, esta complejidad se ve además amplificada por la interacción simultánea de más de un organismo, como ocurre en asociaciones planta-hongo, planta-insecto o planta-planta (en hemi- y holoparásitas), que generan reorganizaciones anatómicas profundas, gradientes estructurales marcados y modificaciones tisulares localizadas. En conjunto, la heterogeneidad estructural, la dinámica ontogenética y la complejidad introducida por las interacciones bióticas, plantean desafíos metodológicos significativos para el análisis microscópico de muchos sistemas vegetales, limitando la capacidad explicativa de enfoques basados en una única técnica o en observaciones aisladas (Johansen, 1940; Ruzin, 1999).

La microscopía correlativa es un enfoque metodológico que integra observaciones obtenidas mediante diferentes técnicas microscópicas aplicadas a una misma muestra o región de interés, con el objetivo de combinar la información que cada técnica aporta a distintas escalas y niveles de resolución. Este enfoque se basa en cuatro principios fundamentales: (1) la identificación de una estructura, región o fenómeno biológico específico; (2) la contextualización de ese objetivo dentro de una escala tisular o estructural más amplia; (3) la obtención de información complementaria mediante diferentes sondas, tinciones o métodos de contraste; y (4) el aumento progresivo de la resolución mediante técnicas de mayor poder de resolución, como la microscopía electrónica (Caplan *et al.*, 2011). No obstante, la mayoría de los desarrollos en este campo se han concentrado en sistemas

biomédicos, celulares y en el análisis de materiales, con un énfasis predominante en la ultraestructura subcelular y una fuerte dependencia de equipamiento altamente especializado y protocolos complejos (Jahn *et al.*, 2012; de Boer *et al.*, 2015; Marshall *et al.*, 2023; Fukuda, 2025). En consecuencia, su aplicabilidad a materiales vegetales resulta limitada, principalmente debido al tamaño de las muestras y la heterogeneidad de los tejidos y células. A ello se suma la ausencia de un enfoque correlativo multiescala, reproducible y pragmático, específicamente orientado a los análisis anatómicos rutinarios de sistemas vegetales.

En botánica, aunque es frecuente la aplicación de estereomicroscopía, microscopía óptica, microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido, estas técnicas suelen emplearse de manera secuencial e independiente, sin un diseño metodológico explícito que garantice la integración de la información obtenida sin perder la correspondencia espacial entre observaciones. Trabajos previos del grupo de investigación han demostrado el potencial de la integración multiescala de forma correlativa para el estudio de materiales botánicos de forma comparativa y sistemas de interacción biótica, incluyendo ejemplos tales como la anatomía foliar comparada de material sano y con formación de agallas inducidas por insectos, descripción de estructuras secretoras internas y externas, el estudio de la anatomía y ontogenia floral, y el análisis de parasitismos vegetales y tejidos invadidos por hongos (Gonzalez *et al.*, 2019, 2023, 2024; Gonzalez & Hernández, 2025; Romero *et al.*, 2025a,b; Zini & Lattar, 2025). No obstante, estos estudios también pusieron de manifiesto la ausencia de un marco metodológico unificado que formalice de manera explícita la integración multiescala y la correspondencia espacial entre técnicas.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo presentar, describir y evaluar un enfoque de microscopía correlativa multiescala (MCME) basado en el procesamiento de los materiales vegetales a partir de un único bloque histológico y el uso de secciones seriadas como eje de integración espacial, articulando diferentes técnicas de microscopía (estereomicroscopía, microscopía óptica, microscopía confocal de barrido láser y microscopía electrónica de barrido) para lograr la localización de regiones de interés y el análisis estructural a diferentes escalas. A través de la integración de casos de estudio previamente publicados, se propone un flujo metodológico reproducible y transferible, orientado

a preservar la coherencia espacial y temporal del análisis microscópico y a fortalecer la interpretación estructural de muestras botánicas y de sistemas de interacción biótica más complejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material analizado

Para la implementación del enfoque MCME se seleccionó un conjunto acotado de muestras que incluyen: órganos vegetativos y reproductivos, tejidos sanos y patológicos, estructuras secretoras e interacciones bióticas entre plantas parásitas y sus hospedantes. Los detalles taxonómicos completos, la procedencia del material y los ejemplares de referencia se encuentran consignados en los trabajos previamente publicados:

- *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae): flores de líneas fértiles y androestériles (Gonzalez *et al.*, 2023).
- *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae): hojas sanas y con agallas en distintos estados de desarrollo inducidas por microhimenópteros (*Ophelimus maskelli* Ashmead y *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, Hymenoptera) (Gonzalez & Solís, 2015; Buyatti *et al.*, 2026; Gonzalez & Hernández, 2025).
- *Pilostyles berteroi* Guill. (Apodanthaceae) holoparásita de *Adesmia trijuga* Gillies ex Hook. & Arn. (Fabaceae): tallos sanos y parasitados del hospedante, con pimpollos y flores de holoparásita (Gonzalez *et al.*, 2024; Romero *et al.*, 2025a).

Las muestras fueron fijadas en FAA (formaldehído: etanol 70°: ácido acético, 5: 90: 5) y mantenidas en alcohol 70 % para su posterior estudio (Fig. 1).

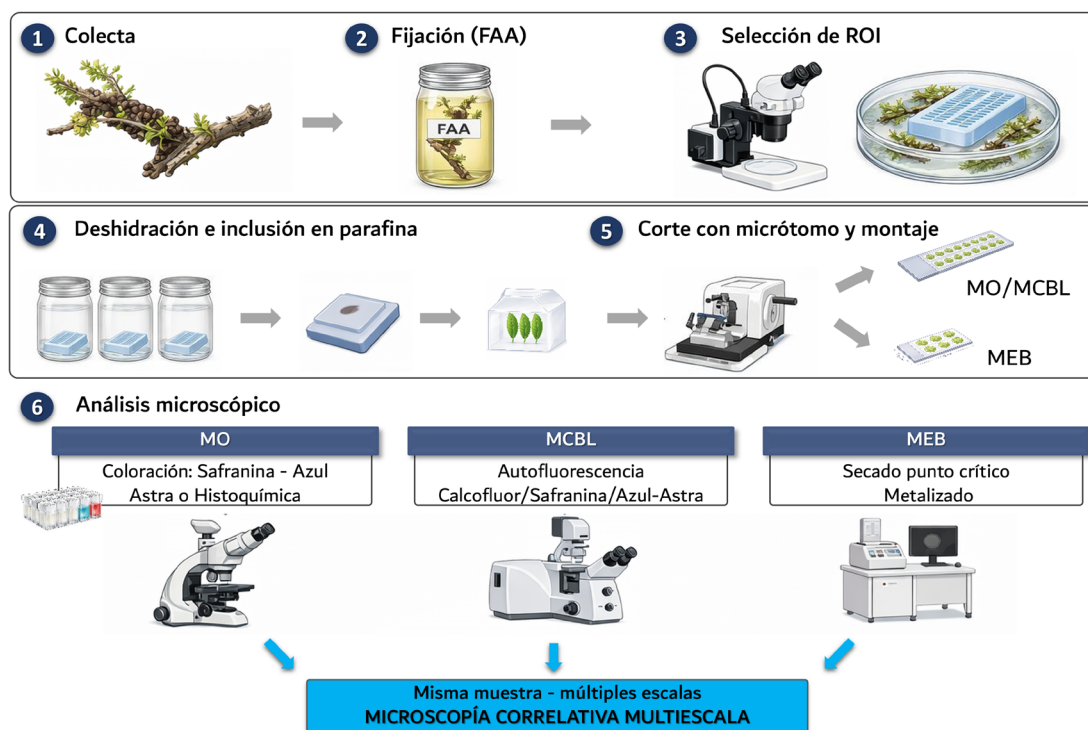


Fig. 1. Flujo metodológico de microscopía correlativa multiescala aplicado a muestras vegetales. El esquema muestra las etapas principales del proceso: (1) colecta del material, (2) fijación en FAA, (3) selección de regiones de interés (ROIs) mediante estereomicroscopía, (4) deshidratación e inclusión en parafina, (5) corte seriado y montaje, y (6) análisis microscópico integrado mediante microscopía óptica (MO), microscopía confocal de barrido láser (MCBL) y microscopía electrónica de barrido (MEB), manteniendo la correspondencia espacial entre escalas. Para la confección de esta figura se emplearon herramientas de inteligencia artificial únicamente en la generación de los íconos gráficos, no en el diseño ni en la elaboración integral del esquema.

Selección de regiones de interés (ROIs) y estereomicroscopía (SM)

El material de cada muestra previamente fijado fue disectado bajo un estereomicroscopio Leica DM LV2, mediante cortes longitudinales o transversales realizados con hoja de afeitar de filo simple o bisturí.

En algunos sistemas, las regiones analizadas contenían naturalmente estructuras en distintos estadios (por ejemplo, agallas en distintos estados dentro de una misma hoja o tallos con flores de parásita en diversas fases de desarrollo), lo que permitió inferir secuencias ontogenéticas a partir del análisis comparativo de las secciones seriadas. En otros casos, se incluyeron múltiples muestras previamente seleccionadas mediante observaciones exomorfológicas, de modo que cada bloque histológico representara un estadio ontogenético específico.

Las observaciones macroscópicas y el registro fotográfico de alta resolución de las ROIs seleccionadas se efectuaron antes del procesamiento histológico, utilizando el mismo equipo equipado con una cámara Leica Flexacam. Las muestras se mantuvieron completamente sumergidas con alcohol al 70 % durante la captura de imágenes. Esta estrategia evita la deshidratación previa a la inclusión, preservando la integridad tisular y minimiza los brillos y reflejos generados por el sistema de iluminación sobre superficies húmedas, optimizando la calidad del registro macroscópico.

Procesamiento histológico: inclusión y seccionado seriado

Las ROIs previamente seleccionadas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales de deshidratación e inclusión en parafina, siguiendo el método clásico de Johansen (1940), con modificaciones basadas en el uso de deshidratantes histológicos comerciales (Gonzalez & Cristóbal, 1997) y preinfiltración con alcohol butílico terciario. El protocolo detallado se presenta en el Anexo I.

A partir del material incluido se obtuvieron secciones seriadas transversales, paradermales y longitudinales de 10-12 μ m de espesor utilizando un micrótomos rotatorio MICROM. Las secciones se montaron de forma seriada en portaobjetos destinados a las distintas técnicas microscópicas. Para el montaje se utilizó adhesivo de Haupt

(Bissing, 1974), y las cintas de parafina se estiraron mediante solución de formaldehído al 3 % sobre placa calefactora a 55 °C.

Para los preparados destinados a MEB, los portaobjetos fueron recortados previamente a una longitud aproximada de 3-4 cm, a fin de adecuar su tamaño al equipo de secado por punto crítico y facilitar su posterior procesamiento. Las secciones de parafina se montaron posteriormente sobre estos vidrios ya recortados (Fig. 1). Los portaobjetos con secciones adheridas se dejaron secar durante 48 h, garantizando una adecuada adhesión y estabilidad tisular durante los tratamientos posteriores.

Microscopía óptica (MO)

Las secciones destinadas a MO fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas mediante una serie alcohólica decreciente, siguiendo el procedimiento estándar detallado en el Anexo 1 (Johansen, 1940). Las secciones rehidratadas se sometieron a tinción doble utilizando Safranina-Fast Green (Johansen, 1940) o Safranina-Azul Astra (Luque *et al.*, 1996). En ambos casos, la Safranina tiñó de rojo las paredes lignificadas y los núcleos, mientras que el Fast Green o Azul Astra contrastaron los tejidos ricos en celulosa en tonos verde o azul, respectivamente. Tras la tinción, los preparados se deshidrataron nuevamente siguiendo la misma serie alcohólica en sentido inverso se montaron de forma permanente en bálsamo de Canadá sintético (Anexo I).

Para la realización de pruebas histoquímicas, las secciones seriadas obtenidas con micrótomos y montadas en portaobjetos fueron desparafinadas y rehidratadas siguiendo el procedimiento general descrito previamente (Anexo I). Se aplicaron ensayos histoquímicos con Lugol (almidón), Sudán III y Sudán Black (lípidos, suberina, ceras y cutina), cloruro férrico (taninos y polifenoles solubles) y floroglucinol (tejidos lignificados) (Johansen, 1940; Ruzin, 1999). Estas secciones se observaron directamente en medio acuoso o con solución reactiva residual. Dado la fijación y procesamiento previo del material, las pruebas histoquímicas estuvieron orientadas principalmente a evidenciar la presencia y distribución de compuestos relativamente estables. Las secciones se observaron en medio acuoso o con solución reactiva residual.

Las observaciones y microfotografías se efectuaron con un microscopio Leica DM LB2 equipado con cámara digital Leica ICC50 HD.

Microscopía confocal de barrido láser (MCBL)

Las secciones seriadas destinadas a MCBL fueron desparafinadas y rehidratadas (ver MO) y se sometieron a los siguientes procedimientos y fluoróforos:

- Autofluorescencia: Los cortes fueron montados en glicerol puro para observación directa sin tinción (Martini *et al.*, 2002). Las observaciones se realizaron utilizando tres ventanas espectrales de detección correspondientes a los rangos de emisión azul (413-489 nm), verde (508-633 nm) y rojo (635-750 nm). Las longitudes de onda de excitación se seleccionaron en 405 nm, 488 nm y 638 nm a partir del espectro del láser de luz blanca (White Light Laser: WLL) del equipo confocal. La autofluorescencia intrínseca de distintos componentes estructurales vegetales (*i.e.* paredes celulares lignificadas, compuestos fenólicos, alcaloides, entre otros) permite obtener información orientativa sobre su composición y distribución tisular. (García-Plazaola *et al.*, 2015; Talamond *et al.*, 2015; Donaldson *et al.*, 2020; DeVree *et al.*, 2021).
- Calcofluor White: se aplicó directamente una mezcla en partes iguales de Calcofluor White M2R al 0,1 % y KOH al 10 % a los cortes rehidratados. Las observaciones se realizaron con excitación a 405 nm (seleccionada del espectro del WLL) y detección de la emisión en la ventana espectral de 413-489 nm, de acuerdo con las propiedades espectrales del fluoróforo. Este marcador permite la identificación de paredes celulares celulósicas y de comunicaciones intercelulares (Hughes & McCully, 1975).
- Rojo congo: una solución al 0,1 % en etanol al 50 %, fue aplicada durante 5-10 min sobre secciones rehidratadas. Las observaciones se realizaron con excitación a 561 nm (seleccionada del espectro del WLL) y detección de la emisión en el rango rojo (~630 nm), de acuerdo con las propiedades espectrales del fluoróforo (Kitin *et al.*, 2020).

Por otra parte, las secciones previamente teñidas con Safranina-Azula o Safranina-Fast Green y montadas en bálsamo de Canadá sintético para MO fueron analizadas mediante CLSM con el objetivo de detectar señales fluorescentes derivadas

tanto de la safranina como de la autofluorescencia, empleando las mismas ventanas espectrales utilizadas para la autofluorescencia.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal invertido Leica Stellaris 8, utilizando objetivos HC PL APO 10× seco (NA 0,4), 20× de inmersión en agua/aceite/glicerina (NA 1,3) y 63× de inmersión en aceite (NA 1,4). Los cortes ópticos se obtuvieron en modo xyz y se apilaron y procesaron con el software Leica LASX Stellaris Compass para generar reconstrucciones y visualizaciones tridimensionales de las estructuras analizadas.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para MEB, los portaobjetos (previamente recortados) que contenían las secciones seriadas adheridas fueron desparafinados en xileno (ver MO y en el Anexo I) y deshidratados mediante una serie creciente de acetona (70 %, 80 %, 90 % y 100 %). Posteriormente, las preparaciones se sometieron a secado a punto crítico con CO₂ utilizando un equipo Denton Vacuum DCP-1. Una vez secos, los portaobjetos se fijaron con cinta adhesiva de doble faz sobre soportes de aluminio y se metalizaron con una capa de oro-paladio (30-40 nm) mediante un *sputter coater* Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y micrografías se efectuaron a 15 kV con microscopios JEOL 5800 LV y ZEISS EVO 15, en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enfoque de MCME se basa en la integración de estereomicroscopía (SM) para la localización inicial y selección de regiones de interés (ROIs), microscopía óptica (MO) para el análisis histológico general, microscopía electrónica de barrido (MEB) para la caracterización de la topografía superficial y de rasgos micromorfológicos y microscopía confocal de barrido láser (MCBL) para la detección de señales de fluorescencia estructural o inducida (Fig. 1).

El eje central del esquema metodológico es el uso de material incluido en un único bloque histológico de parafina. A partir de este bloque se obtienen secciones seriadas consecutivas destinadas a distintas

técnicas microscópicas, lo que permite establecer correspondencias espaciales entre observaciones realizadas a diferentes escalas y documentar de manera consistente una misma región tisular a lo largo de una secuencia continua de observación.

El análisis inicial con SM permitió seleccionar ROIs representativas y registrar su posición mediante imágenes de referencia (Fig. 1). En el material analizado, estas regiones fueron reconocidas sin ambigüedad en las secciones histológicas seriadas y seguidas a través de MO, MCBL y MEB. La correspondencia espacial entre técnicas se sostuvo en rasgos anatómicos intrínsecos de las muestras (disposición tisular, límites celulares, gradientes estructurales e interfases entre tejidos) que actuaron como referencias naturales durante el proceso de observación. Este enfoque permitió transitar desde una visión general del órgano o estructura hasta la caracterización detallada de tejidos y superficies, preservando la continuidad espacial entre escalas y evitando la fragmentación del análisis.

Desde un punto de vista operativo, la combinación de SM, MO, MCBL y MEB generó una lectura continua de la organización estructural, en la cual cada técnica aporta información complementaria sobre una misma región tisular. Este patrón se repitió de manera consistente en todos los sistemas analizados, independientemente del tipo de estructura anatómica, del grado de lignificación o de la complejidad tisular involucrada, y constituye la base empírica sobre la cual se organizan los casos presentados.

A continuación, se presentan distintos sistemas botánicos seleccionados para ilustrar la aplicabilidad del enfoque MCME en escenarios descriptivos y comparativos, incluyendo tejidos foliares, estructuras secretoras, mecánicas y reproductivas altamente especializadas. En cada caso se presentan los principales resultados obtenidos mediante el flujo MCME (sin entrar en el detalle anatómico exhaustivo de cada sistema, el cual puede consultarse en los trabajos específicos previamente publicados) y se discuten en relación con estudios previos que han abordado sistemas biológicos comparables.

Tejidos glandulares: nectarios florales de Allium cepa (Fig. 2)

Las estructuras glandulares representan uno de los escenarios más exigentes para el análisis microscópico, debido a su reducido tamaño,

elevada fragilidad tisular y bajo o nulo grado de lignificación (Smets *et al.*, 2000; Nicolson *et al.*, 2007). En estos tejidos, la información estructural relevante se distribuye entre la micromorfología superficial (usualmente revelada mediante MEB) y la organización celular interna asociada a la actividad secretora, lo que dificulta su interpretación mediante técnicas aisladas o a partir de observaciones parciales.

En *Allium cepa*, la aplicación del flujo MCME permitió una caracterización integrada del tejido nectarífero floral, correspondiente a nectarios septales o ginopleurales (Gonzalez *et al.*, 2023). Estudios anatómicos previos, basados en cortes aislados del ovario, habían conducido a descripciones incompletas o imprecisas del nectario, particularmente en lo referido a su extensión real, disposición tridimensional y relación con los tejidos carpelares adyacentes (Fritsch, 1992). En este trabajo, la obtención de cortes seriados continuos del ovario completo permitió reconstruir con precisión la organización espacial del nectario, clarificando su correcta posición, continuidad y zonación funcional a lo largo del gineceo. La MO permitió diferenciar con claridad el tejido nectarífero de los tejidos circundantes, identificando células secretoras (Fig. 2A-C). La MEB, aplicada sobre secciones histológicas seriadas, aportó información complementaria sobre la micromorfología del tejido glandular y su relación con la estructura del gineceo (Fig. 2D-F). Finalmente, el análisis correlativo mediante MCBL, de las mismas regiones, permitió reforzar la delimitación del tejido secretor y reconocer con precisión la presencia y continuidad de la cutícula que cubre la epidermis secretora (Fig. 2G-H), integrando así la anatomía interna con los rasgos micromorfológicos superficiales.

El uso combinado de múltiples técnicas de microscopía ha demostrado ser clave para comprender en profundidad la estructura y función de nectarios florales y otros tejidos secretores en plantas. A modo de ejemplo, estudios en *Pseudobombax argentinum* (R. E. Fr.) A. Robyns (Malvaceae-Bombacoideae) integraron MO, MEB e histoquímica para caracterizar la estructura de los nectarios florales a partir de material incluido en parafina (Zini & Lattar, 2025), mientras que en *Ekebergia capensis* Sparrm. (Meliaceae) se analizaron nectarios extraflorales mediante secciones en resina glicol-metacrilato combinando

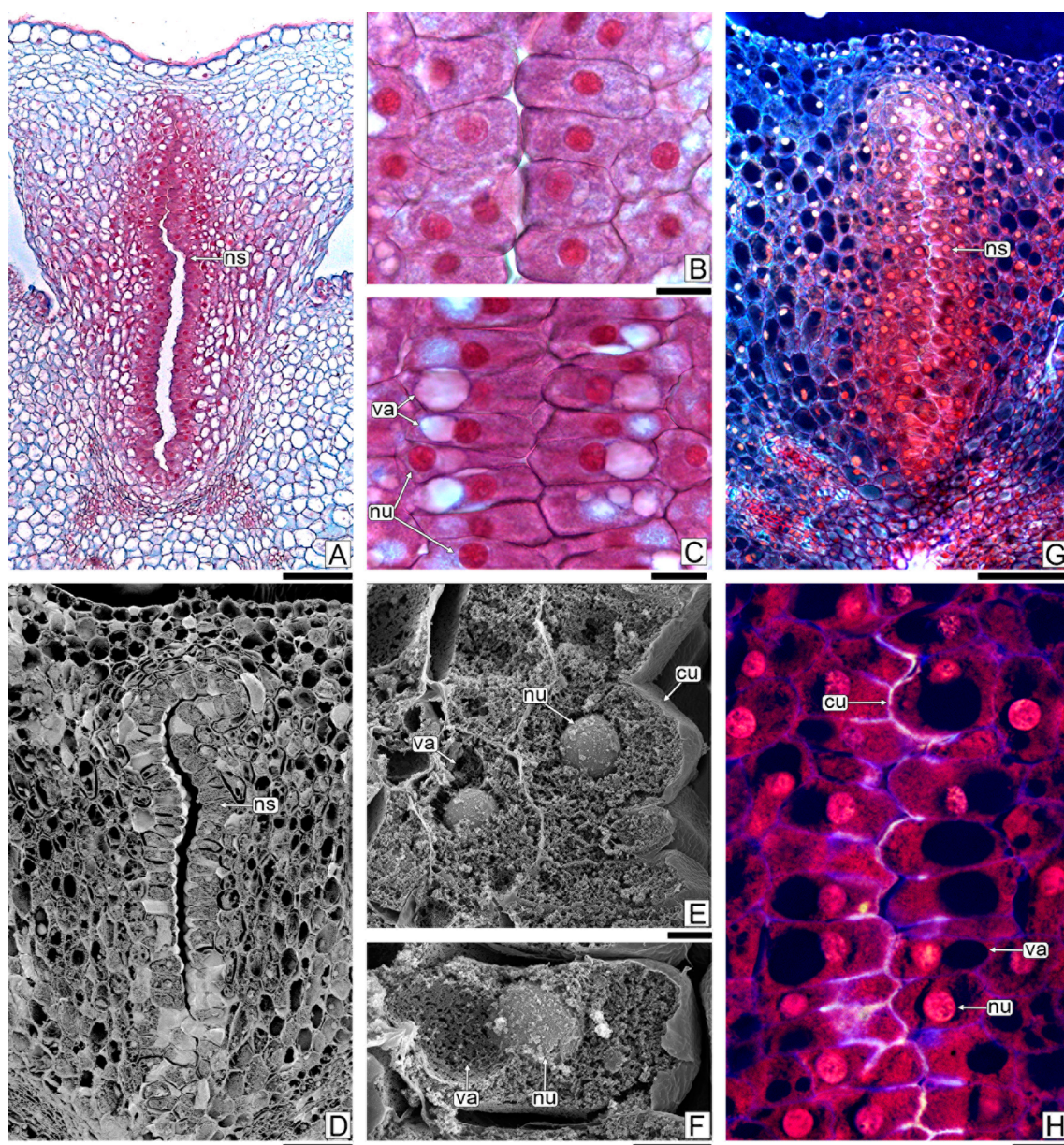


Fig. 2. Nectarios septales de *Allium cepa*. **A-C:** MO. **D-F:** MEB. **G-H:** MCBL. **A, D, G:** vistas generales del nectario septal en sección transversal de ovario. **B-C, E-F, H:** detalles del tejido secretor, evidenciando células con citoplasma denso, núcleos conspicuos (nu), vacuolas (va) y cutícula (cu). Escalas= A, D, G: 100 μ m; B-C, H: 25 μ m; E-F: 10 μ m.

técnicas histológicas y microscópicas (Tilney *et al.*, 2018). En ambos casos, la MEB se empleó para observación de superficies, mientras que la MCBL permitió delimitar el tejido glandular, cutícula e identificar gradientes estructurales asociados a la actividad secretora.

Anatomía foliar y estructuras patológicas complejas: agallas en Eucalyptus (Fig. 3)

Diversas avispa microhimenópteras (especialmente *Ophelimus maskelli* y *Leptocybe invasa*) inducen la formación de agallas (cecidogénesis) en las hojas de *Eucalyptus*. Estas

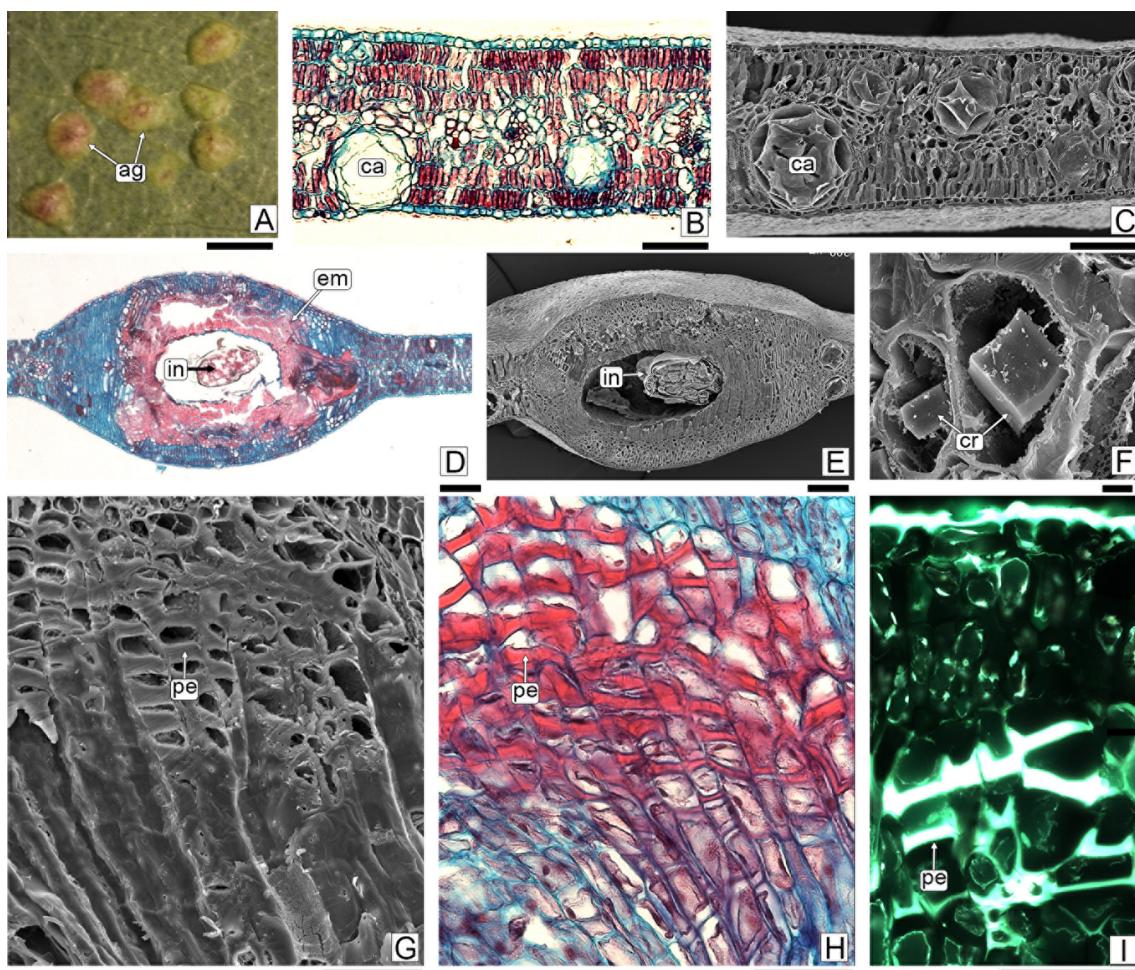


Fig. 3. Agallas foliares en *Eucalyptus tereticornis*. **A:** SM. **B-D, H:** MO. **C, E-G:** MEB. **I:** MCBL. **A:** Vista superficial de la lámina foliar mostrando agallas (ag). **B-C:** Transcorte de hoja sana con cavidades secretoras (ca). **D-E:** Secciones transversales de agallas mostrando la cavidad con insecto (in) rodeada por estrato mecánico (em). **F:** Células con cristales prismáticos (cr). **G-I:** Detalles del estrato mecánico con paredes diferencialmente engrosadas (pe) en la región de la agalla, documentado de forma correlativa mediante MEB (**G**), MO (**H**) y MCBL (**I**). Escalas= **A:** 2 mm; **B-C:** 100 µm; **D-E:** 200 µm; **F:** 5 µm; **G-I:** 50 µm.

estructuras anómalas resultan de la interacción insecto-planta y causan deformaciones foliares, enrollamiento, defoliación prematura e incluso colapso de brotes, con el consiguiente impacto productivo en plantaciones comerciales (Pujade-Villar *et al.*, 2025). Las agallas constituyen un ejemplo de fenotipo extendido: aunque están formadas por tejidos vegetales del hospedante, su desarrollo y morfología son controlados en gran medida por la acción del insecto inductor, provocando crecimiento hipertrófico, colapso local

del sistema vascular y la aparición de nuevas estructuras anatómicas en la planta (Gonzalez & Solís, 2015; Buyatti *et al.*, 2026; Gonzalez & Hernández, 2025).

En este contexto, la SM permitió identificar las agallas y delimitar ROIs representativas, proporcionando el marco macroscópico para el análisis correlativo posterior (Fig. 3A). En las ROIs seleccionadas se reconocieron agallas en distintos estadios de formación, lo que permitió reconstruir la secuencia ontogenética hasta la morfología madura.

El análisis anatómico mediante MO de secciones seriadas permitió establecer con precisión las diferencias entre hojas sanas y agalladas, así como reconstruir la secuencia ontogenética de la cecidogénesis a partir de agallas en distintos estadios de desarrollo presentes en las ROIs seleccionadas. La hoja sana de *Eucalyptus* presenta la anatomía típica de una angiosperma esclerófila (Fig. 3B). En contraste, durante la cecidogénesis inducida por las avispas (*L. invasa* en pecíolo o vena media y *O. maskelli* en lámina), se observa inicialmente una intensa hiperplasia del parénquima adyacente a los tejidos vasculares, seguida por la reorganización tisular progresiva y la diferenciación de nuevos estratos concéntricos: un estrato nutritivo interno en contacto con la larva y un estrato mecánico externo constituido por esclereidas (Fig. 3D, H).

Igual que la MO, la MEB aplicada a secciones histológicas seriadas aportó mayor resolución micromorfológica del estrato mecánico, permitiendo visualizar el engrosamiento diferencial de las paredes secundarias de las esclereidas, carente de comunicaciones intercelulares, que conforman la “armadura” de la agalla (Fig. 3D-E, G-H). La estructura de cavidades secretoras e idioblastos cristalíferos también fue confirmada mediante MEB (Fig. 3C, E-F). Finalmente, la MCBL permitió reforzar esta interpretación anatómica al delimitar con claridad dominios tisulares con distinta composición de pared celular, a partir de contrastes de autofluorescencia asociados a la lignificación diferencial del estrato mecánico (Fig. 3I).

Gracias a la aproximación multiescala del MCME, basada en cortes seriados de un único bloque de parafina, fue posible vincular la morfología externa de las agallas con su organización interna a lo largo del desarrollo. En otras palabras, la SM proporcionó la vista general de *cómo* son las agallas en la hoja; la histología comparativa describió *qué cambios anatómicos* ocurren en los tejidos a medida que se desarrolla el insecto; la MEB descubrió *cómo* son las microestructuras especializadas (ej. paredes lignificadas, cristales, etc.); y la MCBL confirmó *la composición química* diferencial de esas estructuras (ej. lignina en paredes).

Estos rasgos estructurales confirmaron que la agalla constituye un órgano nuevo, fisiológica y estructuralmente diferenciado del tejido foliar original (Gonzalez & Solís, 2015; Gonzalez & Hernández, 2025). En este contexto, el enfoque

de MCME permitió interpretar de manera continua el proceso de cecidogénesis a través de distintas escalas de observación, mostrando cómo los insectos *Ophelimus/Leptocybe* manipulan el desarrollo foliar de *Eucalyptus* para generar esta estructura compleja que funciona como refugio y fuente de alimento para el insecto.

Otros estudios sobre agallas inducidas por insectos en sistemas leñosos han adoptado enfoques multitécnicos comparables para abordar la complejidad anatómica de estos órganos patológicos. A modo de ejemplo, Jankiewicz *et al.* (2021) analizaron agallas foliares inducidas por *Neuroterus quercusbaccarum* (Hymenoptera: Cynipidae) en *Quercus robur* L. (Fagaceae) mediante la combinación de MO, MEB y MCBL. En dicho trabajo, la MCBL se aplicó sobre cortes a mano alzada, mientras que la MEB se utilizó principalmente para la observación de superficies externas de las agallas. Estos abordajes, conceptualmente afines en su carácter multitécnico, ponen de manifiesto la utilidad de integrar distintas modalidades microscópicas para interpretar la cecidogénesis, así como la diversidad de estrategias metodológicas empleadas para abordar estos sistemas altamente reorganizados.

Análisis de estructuras reproductivas masculinas y femeninas

El desarrollo floral y los procesos reproductivos de las angiospermas constituyen un escenario particularmente adecuado para evaluar enfoques microscópicos integrados, debido a la coexistencia de tejidos altamente especializados, la rápida sucesión de estadios ontogenéticos y la necesidad de articular información estructural a múltiples escalas. No existe una sola técnica de microscopía capaz de capturar todos estos niveles; por ello, las últimas décadas han visto un “enfoque multitécnico y multiescalar” para estudiar gametogénesis, fecundación y embriogénesis (Prunet & Duncan, 2020; Gallegos-Cerda *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024).

En este trabajo, estos desafíos se abordan mediante dos sistemas biológicos contrastantes: (i) *Allium cepa*, como modelo de reproducción convencional, y (ii) *Pilostyles berteroi*, un sistema extremo en el cual las primeras etapas de la ontogenia floral ocurren completamente inmersas en el tallo secundario de su hospedante,

Adesmia trijuga. Ambos casos ilustran cómo la integración correlativa de escalas facilita la interpretación estructural continua de los procesos reproductivos.

(i) *Allium cepa* (Fig. 4): la comparación entre flores fértiles y androestériles de cebolla constituye un modelo adecuado para analizar cómo las variaciones en la microgametogénesis impactan la funcionalidad reproductiva (Gonzalez *et al.*, 2023). Mediante MO se reconocieron anteras tetrasporangiadas con organización comparable de la pared anteral en ambos tipos florales; sin embargo, las anteras fértiles presentaron microsporas viables y desarrollo normal del lóculo,

mientras que en las líneas androestériles se observó colapso del tejido esporógeno (Fig. 4A, D, F, I). La MCBL permitió visualizar tridimensionalmente los esporangios y confirmar estas diferencias en la organización del tejido esporógeno (Fig. 4B-C, E). Por su parte, la MEB aplicada a cortes seriados del mismo bloque (Fig. 4G, H) aportó información micromorfológica adicional, particularmente sobre los engrosamientos secundarios del endotecio asociados al mecanismo de dehiscencia. Este enfoque multiescala también permitió integrar el análisis con estructuras femeninas funcionales del mismo sistema, como el saco embrionario y el obturador del óvulo (Fig. 3H-I).

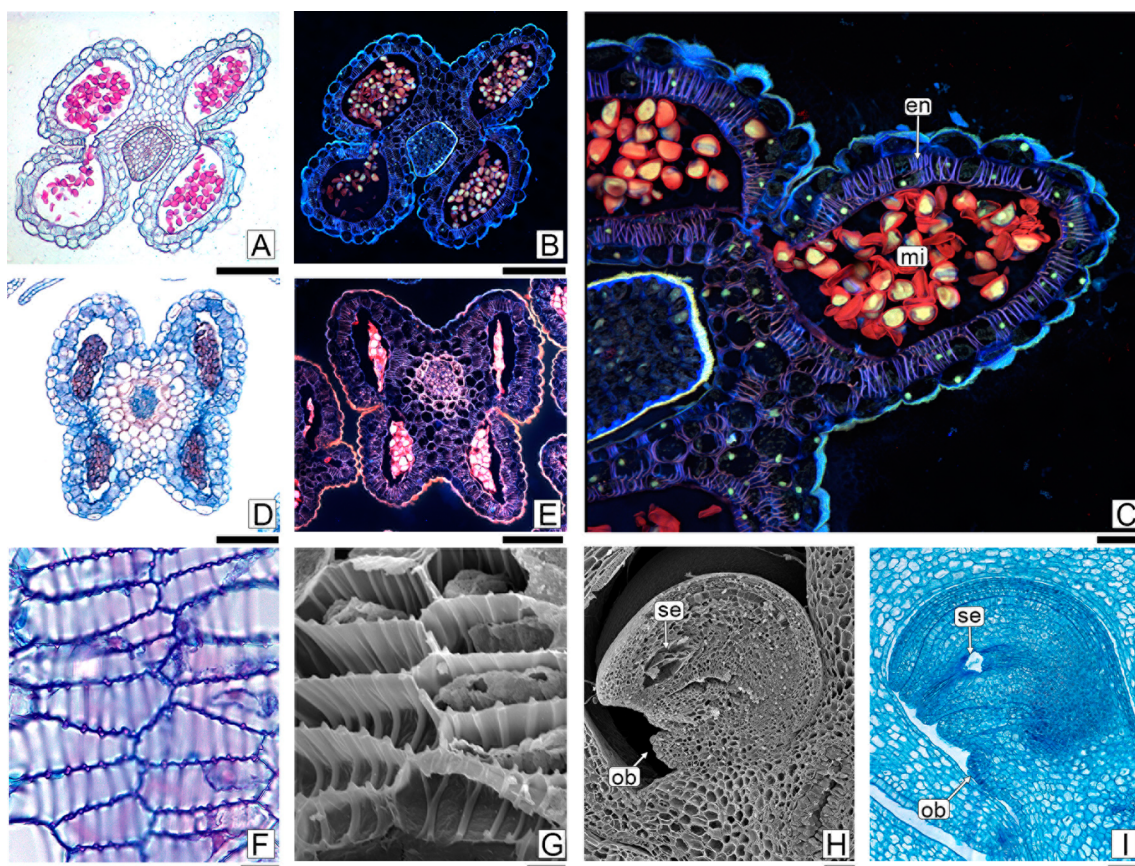


Fig. 4. Anatomía floral en *Allium*. **A, D, F, I:** MO. **B-C, E:** MCBL. **G-H:** MEB. **A-B:** Secciones transversales de anteras fértiles tetrasporangiadas, mostrando la organización general de los sacos polínicos. **C:** Detalle del esporangio con endotecio (en) diferenciado y microsporas (mi). **D-E:** Anteras estériles con microsporas colapsadas. **F-G:** Detalles del endotecio con engrosamientos secundarios de la pared celular. **H-I:** Sección del gineceo mostrando un óvulo con saco embrionario en desarrollo (se) y obturador (ob). Escalas: A-B, D-E: 200 µm; C: 20 µm; F-G: 10 µm; H-I: 100 µm.

Entre los múltiples trabajos dedicados al análisis del desarrollo de las estructuras reproductivas masculinas en angiospermas, varios estudios en especies modelo y cultivos han demostrado el valor de integrar análisis ontogenéticos y múltiples técnicas microscópicas. En *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Arabidopsidae), la combinación de histología seriada y MCBL se ha utilizado para analizar anteras en distintos estadios de desarrollo y caracterizar la dinámica de las capas de la pared anteral durante la ontogenia (Xue *et al.*, 2021). De manera complementaria, en *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) se han aplicado abordajes multitécnicos comparables para analizar

la diferenciación anteral, la microsporogénesis y los procesos de dehiscencia, integrando MO, MCBL y análisis histológicos detallados a lo largo del desarrollo floral (Chaban *et al.*, 2020). En esta misma línea, estudios previos del grupo en *Vaccinium corymbosum* L. ya habían puesto de manifiesto la utilidad de combinar histología seriada y MCBL para el análisis ontogenético de la pared de la antera y su relación con la funcionalidad reproductiva (Recalde *et al.*, 2025).

(ii) *Pilostyles berteroi*, ontogenia floral en un sistema holoparasítico (Figs. 5-6): esta parásita presenta un cuerpo vegetativo constituido por parches endófitos incluidos en el floema

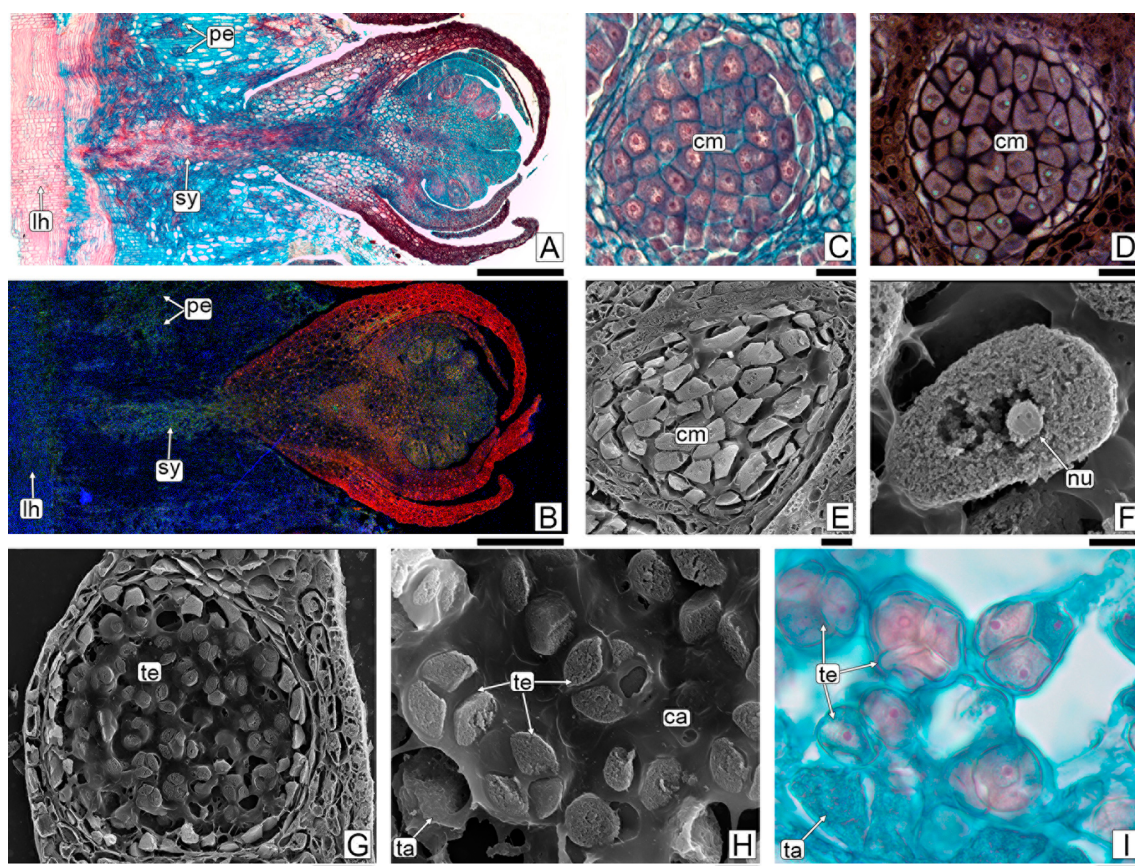


Fig. 5. Desarrollo floral de holoparásita *P. berteroi* en tallos de *A. trijuga*. **A, C, I:** MO. **B, D:** MCBL. **E-H** MEB. **A-B:** Corte longitudinal de tallo del hospedante con flor de *P. berteroi* parcialmente embebida y conectada por 'synker' (sy) al leño del hospedante (lh). **C-E:** Saco polínico con células madres de las microsporas (cm). **F:** Corte de célula madre de las microsporas mostrando núcleo y nucleolo (nu). **G:** Saco polínico con tétradas (te). **H-I:** Detalle de células tapetales (ta) y tétradas de microsporas (te) cubiertas por calosa (ca). Escalas= A-B: 500 µm; C-E: 20 µm; F: 5 µm; G: 50 µm; H-I: 10 µm.

secundario de *A. trijuga* (Gonzalez *et al.*, 2024; Romero *et al.*, 2025a). En estos parches se forman meristemas que desarrollan flores unisexuales, que emergen atravesando los tejidos corticales del tallo del hospedante, constituyendo la única manifestación visible de la presencia del parásito (Fig. 5A-B). En este contexto, la aplicación del enfoque de la MCME permitió resolver un problema metodológico central: la localización, el seguimiento y la caracterización de estructuras reproductivas inmersas en un sistema de extrema heterogeneidad tisular, como lo son los tallos secundarios de una leguminosa arbustiva. La SM resultó clave para identificar regiones del tallo con presencia del sistema endofítico y flores en desarrollo antes de su emergencia. A partir de estas áreas, la MO permitió distinguir con claridad los parches endofíticos y su relación espacial con el leño secundario altamente lignificado del hospedante, así como los tejidos reproductivos en diversas fases del desarrollo

(Fig 5A-B). La integración con MCBL permitió delimitar tridimensionalmente sacos polínicos, seguir la microsporogénesis hasta la formación del polen o apreciar la cubierta de calosa que rodea a las tétradas y su relación espacial con el tapete (Fig. 5C-D, I). La aplicación de la MEB sobre cortes histológicos seriados provenientes de un mismo bloque aportó una resolución micromorfológica adicional, permitiendo visualizar detalles de la microsporogénesis y microgametogénesis y de la pared anteral (Fig. 5E-H).

Durante la diferenciación floral, las flores de *P. berteroi* mantienen una conexión vascular funcional que vincula los pedicelos con el xilema de *A. trijuga* a través del cambium del hospedante, asegurando la provisión de agua y nutrientes. El análisis de esta interfase reveló la presencia de 'sinks', estructuras quiméricas donde la parásita forma un puente anatómico con el sistema vascular del hospedador (Fig 5A-B). Su organización sólo

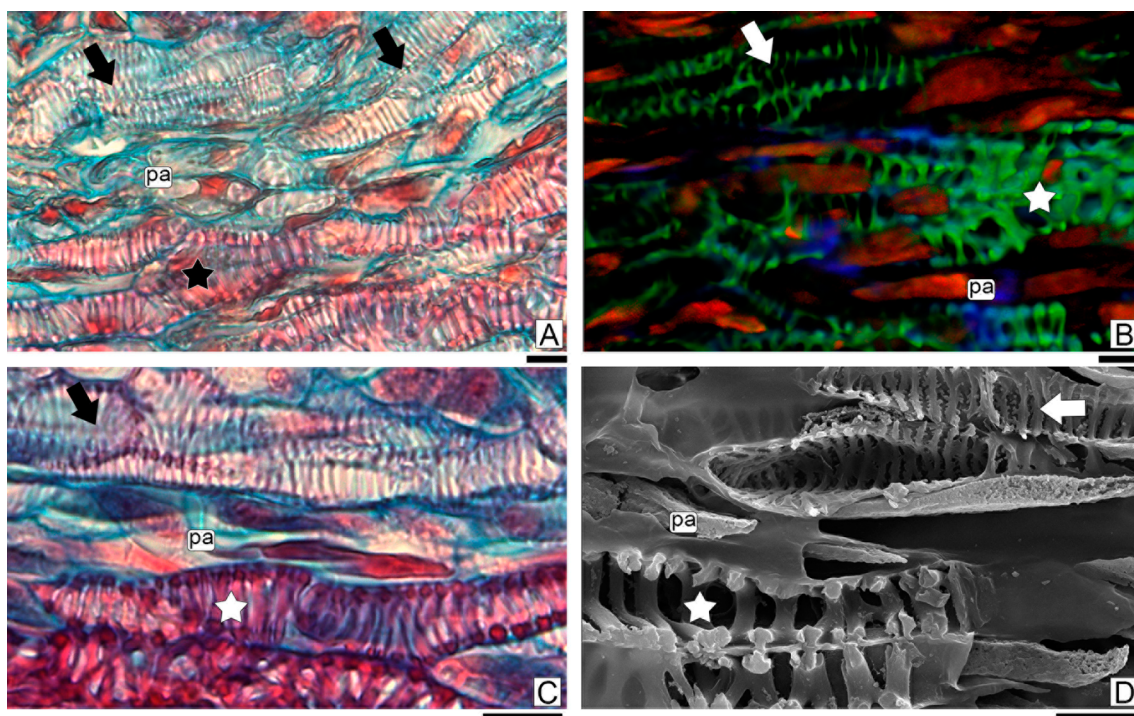


Fig. 6. Elementos xilemáticos en la interfase entre *P. berteroi* y *A. trijuga*. **A, C:** MO. **B:** MCBL. **D:** MEB. El xilema de la holoparásita *P. berteroi* está constituido por traqueoides con engrosamientos helicoidales a escalariformes, sin placas de perforación (estrellas). El xilema del hospedante *A. trijuga* está formado por miembros de vasos con paredes laterales escalariformes y punteaduras vestidas (flechas); entre los elementos traqueales de ambas especies hay células parenquimáticas (pa). Escalas= A-D: 10 µm.

pudo caracterizarse completamente mediante el enfoque de MCME: la MO de secciones seriadas permitió reconocer la continuidad general entre los elementos xilemáticos del hospedante y de la parásita, separados localmente por células parenquimáticas (Fig. 6A, C); la MCBL aportó una lectura tridimensional de la interfase mediante contrastes de autofluorescencia (Fig. 6B); y la MEB permitió caracterizar en detalle la asociación micrométrica entre los traqueoides de *P. berteroi* (con engrosamientos helicoidales a escalariformes y sin placas de perforación) y los vasos de *A. trijuga* (con vasos de paredes laterales escalariformes con puntuaciones vestidas, Fig. 6D).

Las plantas parásitas han constituido históricamente uno de los escenarios más complejos para el análisis anatómico y del desarrollo vegetal, debido a la extrema reducción morfológica, la heterogeneidad tisular y la íntima integración estructural con el hospedante (Heide-Jørgensen, 2008; Nickrent, 2020). Numerosos estudios recientes sobre holoparásitas vasculares pueden interpretarse como verdaderos ejercicios metodológicos, en los que la aplicación combinada de técnicas microscópicas resulta indispensable para acceder a distintos niveles de organización. Investigaciones en Rafflesiaceae, Balanophoraceae y Apodanthaceae, entre otras familias, han integrado con éxito microscopía óptica, distintas modalidades de microscopía electrónica, microscopía confocal, análisis histoquímicos y -en los últimos años- la microtomografía para desentrañar estructuras reproductivas altamente reducidas y complejas interfaces haustoriales (Nikolov *et al.*, 2014; Sato & Gonzalez, 2016; Gonzalez *et al.*, 2019; Teixeira-Costa, 2022).

En conjunto, los casos analizados demuestran que la integración correlativa de observaciones histológicas seriadas con MCBL y MEB permite reconstruir la organización tridimensional de los tejidos y seguir procesos de desarrollo a través de distintas escalas de observación. Este enfoque facilita interpretar estructuras y procesos anatómicos complejos como secuencias estructurales continuas, incluso en sistemas altamente reorganizados. Mientras que en *Allium cepa* permitió discriminar cambios ontogenéticos sutiles asociados a la funcionalidad reproductiva, en *Pilosyles berteroi* resultó esencial para localizar y caracterizar estructuras reproductivas inmersas en

una interfase planta-planta altamente heterogénea. En este último caso, la integración de MO, MCBL y MEB permitió visualizar tridimensionalmente la conexión vascular entre parásito y hospedante y documentar el desarrollo sincronizado de ambos, ampliando el potencial del enfoque correlativo multiescala para el estudio de sistemas vegetales estructuralmente complejos.

CONCLUSIONES

El enfoque de microscopía correlativa multiescala (MCME) propuesto en este trabajo se basa en el análisis de regiones equivalentes mediante cortes seriados obtenidos a partir de un único bloque histológico, lo que garantiza la correspondencia espacial entre observaciones realizadas con distintas modalidades microscópicas. Esta estrategia permite integrar información estructural desde la escala celular y tisular hasta la micromorfología superficial, evitando la fragmentación del análisis en registros no comparables.

A diferencia de los esquemas clásicos de microscopía correlativa centrados en la ultraestructura subcelular, el enfoque de MCME aquí propuesto prioriza escalas particularmente relevantes para la anatomía vegetal, integrando de manera progresiva la organización desde los tejidos hasta el nivel celular. Al apoyarse en procedimientos accesibles y reproducibles en laboratorios de anatomía vegetal, este enfoque recupera la tradición anatómica basada en cortes seriados y análisis comparativos, integrándola con herramientas contemporáneas de visualización tridimensional.

La evaluación del enfoque a partir de sistemas botánicos contrastantes demostró que el MCME permite (i) localizar y seguir regiones de interés a través de distintas escalas de observación, (ii) reconstruir e interpretar procesos estructurales dinámicos en secuencias ontogenéticas y (iii) analizar interfases funcionales complejas en interacciones biológicas. En este sentido, el enfoque facilita establecer relaciones entre organización anatómica, diferenciación tisular y función biológica que difícilmente podrían resolverse mediante técnicas aisladas.

El MCME no pretende reemplazar aproximaciones de ultra alta resolución ni constituir

un protocolo universal aplicable a cualquier tipo de muestra. Sus alcances dependen en parte del equipamiento disponible en cada laboratorio, aunque el esquema metodológico es adaptable y puede ampliarse mediante la integración con técnicas analíticas complementarias, como MEB-EDS, microscopía Raman confocal o microscopía infrarroja, así como con métodos de reconstrucción tridimensional como micro-CT.

En conjunto, el MCME constituye una estrategia metodológica pragmática y conceptualmente sólida para fortalecer la interpretación anatómica integrada en estudios comparativos, ontogenéticos y funcionales en botánica, particularmente en sistemas estructuralmente complejos o de difícil acceso microscópico.

AGRADECIMIENTOS

A mis coautores y colaboradores de los trabajos originales aquí integrados por sus aportes en la recolección del material vegetal, la preparación histológica de las muestras y las observaciones microscópicas, así como por las discusiones científicas que contribuyeron a la interpretación de los resultados. El presente manuscrito integra dichos estudios desde una propuesta metodológica común de microscopía correlativa multiescala, desarrollada a partir de la experiencia acumulada en dichas investigaciones, y busca poner en valor el trabajo colectivo que hizo posible la generación de los datos analizados. A la Universidad Nacional del Nordeste, CONICET y ANPCyT por los diversos proyectos que subsidiaron estas investigaciones. Asimismo, agradezco a los revisores por sus valiosos comentarios y sugerencias, que contribuyeron a mejorar la claridad y calidad del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- BISSING, D. R. 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Biotech. Histochem.* 49: 116-117. <https://doi.org/10.3109/10520297409116955>
- BUYATTI, R. A., C. M. HERNÁNDEZ, D. A. AQUINO, S. N. LÓPEZ, ... & M. F. BERRET. 2026. First record of the gall-inducing insect *Ophelimus mediterraneus* Borowiec & Burks (Hymenoptera, Chalcidoidea, Eulophidae) in *Eucalyptus* from America, including the first report of male specimens. *Neotrop. Entomol.* 55: 6. <https://doi.org/10.1007/s13744-025-01351-w>
- CAPLAN, J., M. NIETHAMMER, R. M. TAYLOR & K. J. CZYMEK. 2011. The power of correlative microscopy: Multi-modal, multi-scale, multi-dimensional. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21: 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.010>
- CHABAN, I. A., N. V. KONONENKO, A. A. GULEVICH, L. R. BOGOUTDINOVA, ... & E. N. BARANOVA. 2020. Morphological features of the anther development in tomato plants with non-specific male sterility. *Biology* 9: 32. <https://doi.org/10.3390/biology9020032>
- DE BOER, P., J. P. HOOGENBOOM & B. N. G. GIEPMANS. 2015. Correlated light and electron microscopy: Ultrastructure lights up. *Nat. Methods* 12: 503-513. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3400>
- DEVREE, B. T., L. M. STEINER, S. GLAZOWSKA, F. RUHNOW, ... & J. MRAVEC. 2021. Current and future advances in fluorescence-based visualization of plant cell wall components and cell wall biosynthetic machineries. *Biotechnol. Biofuels* 14: 78. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01922-0>
- DONALDSON, L. 2020. Autofluorescence in plants. *Molecules* 25: 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
- FRITSCH, R. M. 1992. Septal nectaries in the genus *Allium*. En: HANELT, P., K. HAMMER & H. KNUPFFER (eds.), *The genus Allium-taxonomic problems and genetic resources*, pp. 77-85. Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben.
- FUKUDA, T. 2025. Introduction to the CLEM technique developed in the field of neuroanatomy. *Anat. Sci. Int.* 100: 445-453. <https://doi.org/10.1007/s12565-025-00875-w>
- GALLEGOS-CERDA, S. D., J. D. HERNÁNDEZ-VARELA, B. ARREDONDO-TAMAYO & J. J. CHANONA PÉREZ. 2023. A review of advanced microscopy techniques for the development of nanotechnology in agriculture, food, and the environment. *Mundo nano* 16: e00062. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69723>
- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I., B. FERNÁNDEZ-MARÍN, S. O. DUKE, A. HERNÁNDEZ, ... & J. M. BECERRIL. 2015. Autofluorescence: biological functions and technical applications. *Plant Sci.* 236: 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010>

- GONZALEZ, A. M. & C. L. CRISTÓBAL. 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhostzkiana* (Sterculiaceae). *Bonplandia* 9: 287-294. <https://doi.org/10.30972/bon.93-41497>
- GONZALEZ, A. M. & C. M. HERNÁNDEZ. 2025. Morphogenesis of *Ophelimus maskelli* (Hymenoptera: Eulophidae) gall induction in *Eucalyptus tereticornis* and comparison with other eucalyptus gall-inducing insects. *Phytoparasitica* 53: 57. <https://doi.org/10.1007/s12600-025-01280-9>
- GONZALEZ, A. M., I. MALDONADO, C. GALMARINI & I. PERALTA. 2023. Floral nectary structure, nectar presentation and morpho-anatomical analysis of male-fertile and male-sterile anthers in onion (*Allium cepa*, Amaryllidaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 58: 477-489. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v58.n3.38251>
- GONZALEZ, A. M., M. F. ROMERO & H. A. SATO. 2024. Exploring hidden connections: endophytic system and flower meristem development of *Pilostyles berteroi* (Apodanthaceae) and interaction with its host *Adesmia trijuga* (Fabaceae). *Plants* 13: 3010. <https://doi.org/10.3390/plants13213010>
- GONZALEZ A. M., H. A. SATO & B. MARAZZI. 2019. Embryology in *Helosis cayennensis* (Balanophoraceae): Structure of female flowers, fruit, endosperm and embryo. *Plants* 8: 74. <https://doi.org/10.3390/plants8030074>
- GONZALEZ, A. M. & S. M. SOLÍS. 2015. Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de *Eucalyptus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50: 141-151. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v50.n2.11658>
- HEIDE-JØRGENSEN, H. 2008. *Parasitic Flowering Plants*. Brill, Boston. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004167506.i-438>
- HUGHES, J. & M. E. MCCULLY. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Biotech. Histochem.* 50: 319-329. <https://doi.org/10.3109/10520297509117082>
- JAHN, K. A., D. A. BARTON, K. KOBAYASHI, K. R. RATINAC, ... & F. BRAET. 2012. Correlative microscopy: Providing new understanding in the biomedical and plant sciences. *Micron* 43: 565-582. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.12.004>
- JANKIEWICZ, L. S., M. GUZICKA & A. MARASEK-CIOLAKOWSKA. 2021. Anatomy and ultrastructure of galls induced by *Neuroterus quercusbaccarum* (Hymenoptera: Cynipidae) on oak leaves (*Quercus robur*). *Insects* 12: 850. <https://doi.org/10.3390/insects12100850>
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co Inc., Nueva York.
- KITIN, P., S. NAKABA, C. G. HUNT, S. LIM & R. FUNADA. 2020. Direct fluorescence imaging of lignocellulosic and suberized cell walls in roots and stems. *AoB PLANTS* 12: plaa032. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plaa032>
- LUQUE, R. H., C. SOUZA & J. E. KRAUS. 1996. Métodos de coloração do Roeser (1972) Modificado-E Kropp (1972), visado a substituição do azul de astra por azul de alcão 8GS on 8GX. *Acta Bot. Brasil.* 10: 199-212. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061996000200001>
- MARSHALL, R. S., J. D. SEDAT & T. KIRCHHAUSEN. 2023. Correlative light and electron microscopy: From dynamic live-cell imaging to ultrastructure. *Trends Biochem. Sci.* 48: 129-142. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.05.003>
- MARTINI, J., K. HELLWEG, D. J. S. BIRCH & A. ZUMBUSCH. 2002. A new high-aperture glycerol immersion objective lens and its application to 3D-fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 206: 146-151. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01016.x>
- NICKRENT, D. L. 2020. Parasitic angiosperms: how often and how many? *Taxon* 69: 5-27. <https://doi.org/10.1002/tax.12195>
- NICOLSON, S. W., NEPI, M., & PACINI, E. (eds.). 2007. *Nectaries and nectar*. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- NIKOLOV, L. A., Y. M. STAEDLER, S. MANICKAM, J. SCHÖNENBERGER, ... & C. DAVIS. 2014. Floral structure and development in Rafflesiaceae with emphasis on their exceptional gynoeceia. *Am. J. Botany* 101: 225-243. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400009>
- PRUNET, N. & K. DUNCAN. 2020. Imaging flowers: a guide to current microscopy and tomography techniques to study flower development. *J. Exp. Bot.* 71: 2898-2909. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa094>
- PUJADE-VILLAR, J., G. MELIKA & V. CUESTA-PORTA. 2025. Structure and Function of Oak Gall Wasps. En: OLIVEIRA, D. C. D. & R. M. D. S. ISAIAS (eds.), *Plant Galls*, pp.313-347. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-80064-1_15
- RECALDE, J. M., M. F. GARAVELLO, P. ALAYÓN LUACES & A. M. GONZÁLEZ. 2025. Anther ontogeny and pollen development in Southern Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Horticulturae* 11: 1278. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11111278>

- ROMERO, M. F., H. A. SATO & A. M. GONZALEZ. 2025a. Comprehensive morphology and embryology of *Pilostyles berteroi* (Apodanthaceae): revisiting floral and seed anatomy in holoparasitic plants. *Flora* 324: 152684. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2025.152684>
- ROMERO, M. F., S. S. SAMOLUK, J. G. SEIJO & A. M. GONZALEZ. 2025b. Histopathology of *Thecaphora frezzii* colonization: a detailed analysis of its journey through peanut (*Arachis hypogaea* L.) tissues. *Plants* 14: 1083. <https://doi.org/10.3390/plants14071083>
- RUZIN, S. E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Nueva York.
- SATO, H. A. & GONZALEZ A. M. 2016. Floral development and anatomy of pistillate flowers of *Lophophytum* (Balanophoraceae), with special reference to the embryo sac inversion. *Flora* 219: 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.01.002>.
- SMETS, E. F., RONSE DECRAENE, L. P., CARIS, P., & RUDALL, P. J. 2000. Floral nectaries in monocotyledons: distribution and evolution. En: WILSON, K.L. & D. A. MORRISON (eds.), *Monocots: systematics and evolution*, pp. 230-240. CSIRO, Melbourne.
- TALAMOND, P., J. L. VERDEIL & G. CONÉJÉRO. 2015. Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* 20: 5024-5037. <https://doi.org/10.3390/molecules20035024>
- TEIXEIRA-COSTA, L. 2022. Leveraging micro-CT scanning to analyze parasitic plant-host interactions. *JoVE* 179: e63423. <https://dx.doi.org/10.3791/63423>
- TILNEY, P. M., M. NEL & A. E. VAN WYK. 2018. Foliar secretory structures in *Ekebergia capensis* (Meliaceae). *Heliyon* 4: e00541. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00541>
- XUE, J. S., C. YAO, Q. L. XU, C. X. SUI, ... & Z. N. YANG. 2021. Development of the middle layer in the anther of *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 12: 634114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634114>
- ZHONG, S., P. ZHAO, X. PENG, H-J. LI, ... & A. Y. CHEUNG. 2024. From gametes to zygote: Mechanistic advances and emerging possibilities in plant reproduction. *Plant Physiol.* 195: 4-35. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae125>
- ZINI, L. M. & E. C. LATTAR. 2025. Unveiling two types of reproductive nectaries in *Pseudobombax argentinum* (Malvaceae-Bombacoideae). *Protoplasma* 262: 1103-1115. <https://doi.org/10.1007/s00709-025-02044-2>

ANEXO I. Guía de mesada para inclusión en parafina y tinción histológica

Este protocolo resume el procedimiento estándar de deshidratación, infiltración en parafina, desparafinado, tinción y montaje permanente utilizado para el análisis histológico de tejidos vegetales (basado en Johansen, 1940; modificado por Gonzalez & Cristóbal, 1997).

Deshidratación e inclusión en parafina (materiales fijados en FAA)

El método clásico de Johansen (1940) consiste en deshidratar el material fijado en FAA pasándolo por una serie gradual de mezclas de Alcohol etílico 96 % (EtOH 96%), Alcohol absoluto (EtOH abs), Alcohol butílico terciario (ABT) y agua, lo que permite una transición progresiva hacia el medio de infiltración (Tabla 1, Protocolo A: serie de Johansen).

En la modificación propuesta por Gonzalez & Cristóbal (1997) se reemplazó la serie TBA por deshidratantes comerciales Biopur® (Tabla 1, Protocolo B). En la tabla se incluye además una tercera alternativa basada en deshidratantes histológicos de la marca Biopack® (Tabla 1, Protocolo C).

Los tiempos totales de deshidratación e infiltración podrán ajustarse según la naturaleza del material.

Tabla 1. Comparación de tres protocolos alternativos de deshidratación histológica. (Serie clásica de Johansen vs. deshidratantes comerciales Biopur® y Biopack®).

Paso	Protocolo A: Serie de Johansen	Protocolo B: Deshidratante Biopur® ¹	Protocolo C: Deshidratante Biopack® ¹	Tiempo
1	50 EtOH 96 : 10 ABT: 40 H ₂ O	Deshidratante	Deshidratante 80°	20 min
2	50 EtOH 96 : 20 ABT: 30 H ₂ O	Deshidratante	Deshidratante 90°	20 min
3	50 EtOH 96 : 35 ABT: 15 H ₂ O	Deshidratante	Deshidratante 90°	20 min
4	50 EtOH 96 : 50 ABT	Deshidratante	Deshidratante 100°	20 min
5	25 EtOH abs : 75 ABT	Deshidratante	Deshidratante 100°	20 min
6	ABT	ABT	ABT	8 h
7	ABT	ABT	ABT	2 h
8	Parafina pura	Parafina pura	Parafina pura	8 h
9	Parafina pura	Parafina pura	Parafina pura	8 h

¹ En cada paso se usan directamente del envase, sin diluir.

Desparafinado y coloración

Una vez que los materiales han sido incluidos en parafina y se han obtenido las secciones mediante microtomía, los cortes deben desparafinarse y rehidratarse progresivamente mediante una serie de solventes orgánicos y soluciones alcohólicas decrecientes (Johansen, 1940). Este proceso elimina la parafina de inclusión y restituye gradualmente el contenido acuoso del tejido, condición necesaria para permitir la correcta penetración de los colorantes hidrofílicos utilizados en la tinción histológica.

Paso	Solución	Tiempo
1	Xilol puro	10 min
2	Xilol puro	10 min
3	Xilol : EtOH abs (1:1)	10 min
4	EtOH abs	5 min
5	EtOH 96 %	5 min
6	EtOH 70 %	5 min
7	Safranina (solución EtOH 50 %)	Tiempo variable según material (5 a 30 min) ²
8	Azul Astra (solución acuosa)	Tiempo variable según material (1 a 10 min) ²

² Lavado posterior en agua hasta que salga clara. La combinación Safranina-Azul Astra corresponde a una tinción contrastada de uso en histología vegetal (Luque *et al.*, 1996). Alternativamente, pueden emplearse otras tinciones histológicas, colorantes metacromáticos (azul de toluidina) o pruebas histoquímicas basadas en soluciones acuosas, incorporando un paso adicional en alcohol al 50 % para completar la transición hasta agua.

Deshidratación final, aclarado y montaje

Esta serie de deshidratación final y aclarado se aplica a preparaciones donde se aplicó doble coloración Safranina-Azul Astra o Safranina-Fast Green. No corresponde su uso en tinciones metacromáticas o pruebas histoquímicas acuosas, cuyos reactivos o productos de reacción pueden no resistir una nueva deshidratación alcohólica; en esos casos, las secciones se observan directamente en medio acuoso.

Montaje: colocar bálsamo de Canadá sintético y cubrir inmediatamente con cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

Paso	Solución	Tiempo
9	EtOH 70 %	5 min
10	EtOH 96 %	5 min
11	EtOH abs ³	5 min
12	Xilol : EtOH abs (1:1)	5 min
13	Xilol puro	10 min
14	Xilol puro	10 min

³ En caso de utilizar la combinación Safranina–Fast Green, este último se prepara en etanol absoluto, por lo que debe aplicarse luego del paso correspondiente a alcohol absoluto, inmediatamente antes del aclarado con xilol: EtOH abs. Debido a su alta afinidad por los tejidos, el tiempo de exposición del Fast Green debe ser muy breve (≈ 20 s) para evitar la sobrecoloración (Johansen, 1940).