

Anatomía del desarrollo de brotes en hojas de *Saintpaulia ionantha* Wendl cultivadas *in vitro*

MA. VICTORIA HERNANDEZ-PIMENTEL, JOSE FRANCO-RODRIGUEZ
y MA. TERESA GARCIA-CASTAÑEDA

Laboratorio de Fisiología Vegetal
Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
Prol. Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás
Apartado Postal 42-186
11340 México, D.F.

HERNÁNDEZ-PIMENTEL, MA. V., J. FRANCO-RODRÍGUEZ y M.T. GARCÍA-CASTAÑEDA, 1995. Anatomía del desarrollo de brotes en hojas de *Saintpaulia ionantha* Wendl cultivadas *in vitro*. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **40**: 95-105.

RESUMEN: Los cambios morfológicos sucesivos que ocurren durante la organogénesis *in vitro* a partir de explantes foliares de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (violeta africana) se inician con la división de células subepidérmicas y perivasculares, que dan origen a centros meristemáticos, que se diferencian hasta formar el meristemo apical del brote adventicio. Las técnicas citoquímicas probadas demuestran que el proceso organogenético involucra una actividad metabólica elevada.

INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivo de tejidos vegetales ha sido satisfactoriamente utilizada para la propagación de la "violeta africana", *Saintpaulia ionantha* Wendl. Se han empleado como explantes segmentos de hoja, peciolo, anteras, polen, pétalos y tejido epidérmico foliar (Cooke, 1977; Bilkey *et al.*, 1978; Hughes *et al.*, 1975; Vázquez *et al.*, 1977). Se estudió el efecto de *Agrobacterium tumefaciens* en el cultivo de peciolos (Rao y Morel, 1973); se han obtenido plantas haploides (Hughes *et al.*, 1975), así como también se ha estudiado la variación somaclonal de los cultivos y la producción y propagación de quimeras de interés ornamental (Peary *et al.*, 1988; Smith y Norris, 1983). Asimismo, se ha logrado su multiplicación *in vitro* por homogeneización de los cultivos (Molgaard *et al.*, 1991). En la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se ha logrado la propagación de más de 10 variedades de violeta africana (J. Franco, comunicación personal).

Las investigaciones sobre el desarrollo morfológico de los explantes de violeta africana cultivados *in vitro* son pocas. Naylor y Johnson (1937) hicieron un estudio histológico de su propagación vegetativa. Se realizaron investigaciones sobre el origen de los brotes vegetativos en violetas tratadas con colchicina (Arisumi y Frazier, 1968); Vázquez *et al.* (1977) complementaron su investigación sobre organogénesis con un estudio histológico,

pero no profundizaron en la anatomía. El estudio más reciente es un análisis histológico y estereológico de la formación de brotes a partir de callos obtenidos de hojas de *Saintpaulia ionantha*, var. "Raving Red", que trata sobre la formación de centros meristemáticos, los primeros estadios del desarrollo de los brotes, y su relación con la disminución de almidón dentro de las células (Redway, 1991).

El objetivo de esta investigación es contribuir al conocimiento del proceso de organogénesis *in vitro* en hojas de violeta africana, realizando un estudio anatómico y algunas pruebas citoquímicas. Se considera un complemento de las publicaciones antes citadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se hicieron cortes transversales manuales, temporales y en fresco de hojas de "violeta africana", *Saintpaulia ionantha* Wendl, var. Georgia, utilizando una hoja de afeitar nueva. Se colocaron sobre el portaobjetos con una gota de agua destilada.

Los cortes fijos se obtuvieron a partir de explantes en cultivo mediante el siguiente procedimiento: se lavaron con agua jabonosa hojas completas de "violeta africana", var. Georgia, después se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (5% de cloro activo) por 5 minutos, y posteriormente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se obtuvieron los segmentos de hoja y se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog (1962), adicionado con 1 mg/l de ácido indol-acético y 0.04 mg/l de cinetina, con fotoperiodos de 14 h de luz y 10 de oscuridad, y temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 55 días de cultivo, los explantes con brotes fueron fijados en una mezcla de formol-ácido acético-alcohol etílico (FAA) por 24 horas y procesados para su inclusión en parafina (Johansen, 1940) con objeto de obtener cortes de 8 μm que se tiñeron con la técnica de ácido peryódico reactivo de Schiff (PAS)-hematoxilina, con azul de toluidina (técnica de Sylven) y con ferricianuro de potasio-cloruro férrico (técnica de Chevrement) (citadas en Deleón, 1983 y en Sheehan y Hrapchak, 1980).

RESULTADOS

La hoja de violeta africana, var. Georgia, está constituida por epidermis superior y epidermis inferior, uniestratificadas con tricomas filamentosos pluricelulares y tricomas glandulares de cuatro células (lámina I a y b). El mesófilo dividido en dos zonas: hacia la cara superior presenta de tres a cuatro capas de clorénquima y hacia la cara inferior parénquima esponjoso. El mesófilo es atravesado por los haces vasculares.

Los cortes fijos de los explantes en cultivo mostraron que algunas células parenquimatosas presentan núcleo grande teñido con poca intensidad, con un nucléolo intensamente teñido y frecuentemente con vacuolas (lámina IIa). Además, se observaron células en división en dos zonas: a) en células subepidérmicas (lámina IIb y b') y b) en células parenquimatosas cercanas a los haces vasculares.

Posteriormente, estas células parenquimatosas que se han dividido constantemente, disminuyen de tamaño y forman grupos o agregados que se conocen como "centros meristemáticos" (Tran Thanh Van *et al.*, 1974) positivos a la técnica PAS, mas no presentan gránulos de almidón. También mostraron positividad a la técnica de Chevrement y baja metacromasia a la técnica de Sylven (lámina III a y b).

Estos centros meristemáticos se organizan y diferencian para formar un promeristemo.

La orientación de las divisiones celulares es de gran importancia para determinar la organización del meristemo y el surgimiento de los primordios foliares. Así, la zona del promeristemo que da lugar a la túnica, presenta divisiones anticlinales; las células que forman parte del cuerpo experimentan divisiones diagonales, periclinales y anticlinales, y las que van a dar origen a los primordios foliares se dividen periclinal o diagonalmente (lámina IV a y b).

Después ocurre el alargamiento celular y la diferenciación en el meristemo de los tres tejidos fundamentales: protodermo, meristemo fundamental y procambium (lámina V a y b).

La epidermis se diferencia tempranamente, se observan tricomas surgiendo del promeristemo o en los primordios foliares (lámina IIIb, IV a y VIa y a'). El procambium del brote presenta comunicación con el sistema vascular del explante (lámina Va).

El promeristemo conserva dentro del meristemo las características de sus células que permanecen pequeñas, con el núcleo grande y difuso y el nucléolo muy teñido. Las divisiones celulares no sólo continúan ocurriendo en el promeristemo, también se observaron en el meristemo fundamental y en el procambium. Los primordios foliares ya presentan la organización típica del parénquima (lámina VIb).

DISCUSIÓN

Los cortes transversales mostraron la estructura de la hoja de violeta africana, lo cual es importante para poder apreciar los cambios que ocurren en los explantes durante el cultivo y para no confundir estructuras originales de la hoja con posibles brotes. Los tricomas filamentosos y glandulares de la epidermis son semejantes a los descritos por Redway (1991) en el cultivar "Raving Red" de "violeta africana", cuyas hojas solamente presentan una capa de parénquima empalizada (clorénquima), mientras que en la variedad Georgia observamos de tres a cuatro capas de este tejido, abundante en cloroplastos.

La proliferación celular se inició en células subepidérmicas y en parenquimatosas cercanas a los haces vasculares. Bilkey y Cocking (1981) observaron la producción de brotes o yemas a partir de tejido epidérmico y subepidérmico. Vázquez *et al.* (1977) informaron que las yemas del brote se forman a partir de grupos celulares pequeños derivados de células epidérmicas de los segmentos de pétalos y hojas de violeta africana. En fragmentos de hoja y tallo de *Begonia rex* y *Torenia fournieri* cultivados *in vitro*, la formación de brotes y meristemas radicales generalmente involucra, desde un punto de vista morfológico, solamente a las células epidérmicas y a las del parénquima perivascular; en contraste, el parénquima situado entre las capas superficiales y las células perivasculares y el cambium mismo no están involucrados (Tran Thanh Van *et al.*, 1974). Nuestras observaciones sugieren en cambio, que hay una relación estrecha entre células subepidérmicas y del parénquima perivascular, en lo que a surgimiento de brotes se refiere, ya que a simple vista se observa que los brotes surgen por toda la superficie de las nervaduras en ambos lados de la hoja, hecho que se comprueba con las observaciones a nivel microscópico de cortes que mostraron células en división en estas dos zonas.

Las características morfológica y citoquímicas de las células que forman parte de los centros meristemáticos indican que se lleva a cabo una elevada actividad metabólica. La técnica de PAS mostró que el citoplasma de las células de los centros meristemáticos contiene abundantes carbohidratos, mas no manifestó su acumulación en la forma de gránulos de almidón, lo que puede explicarse por el hecho de que los carbohidratos son

continuamente utilizados como fuente de energía para la realización de todos los procesos metabólicos relativos a la división y diferenciación celular. Redway (1991) informa que cuando se trata de organogénesis indirecta, el surgimiento de los brotes está relacionado con la presencia de almidón en las células, el cual disminuye en cantidad conforme el proceso organogenético avanza.

La técnica de Chevremont (ferricianuro de potasio-cloruro férrico) mostró elevada positividad en el citoplasma de estas células, hecho que indica que la síntesis de proteínas es muy activa. Con la técnica de Sylven (azul de toluidina) los centros meristemáticos se tiñeron de azul-morado indicando metacromasia baja, dada por la ausencia de grupos sulfato en los carbohidratos (Sheehan y Hrapchak, 1980).

La hematoxilina que tiñe al núcleo y nucléolo, mostró núcleos grandes y difusos que indican una elevada actividad nuclear respecto a la replicación y transcripción del DNA (Newcomb, 1980). Los nucléolos intensamente teñidos y con vacuolas también indican que su actividad es elevada, produciendo y procesando el RNA que será transportado por las vacuolas nucleolares hacia el citoplasma (Jordan *et al.*, 1980).

Sin embargo, la capacidad de formación de yemas por los centros meristemáticos, no solamente está dada por las características propias de cada célula, sino también por el contacto y la influencia directa o indirecta de las células vecinas (Tran Thanh Van *et al.*, 1974).

La transformación de los centros meristemáticos involucra la organización de las células y la dirección de sus divisiones celulares, de esta forma el centro meristemático se convierte en un promeristemo cuando se ha organizado la túnica y el cuerpo, y constituirá para toda la vida de la planta la zona más joven, formando parte del meristemo del brote, cuya anatomía y diferenciación se adapta a la teoría del cuerpo-túnica descrita en Fahn (1974) y Esau (1962).

SUMMARY

Using *Saintpaulia ionantha* Wendl. (african violet) foliar explants, it is possible to detect successive morphological changes in the *in vitro* organogenesis. These changes start with division of epidermic and perivascular cells that become meristematic centers, which continue differentiating until their transformation in the apical meristem or an adventitious shoot. The cytochemistry techniques used, showed that the organogenetic process involved high metabolic activity.

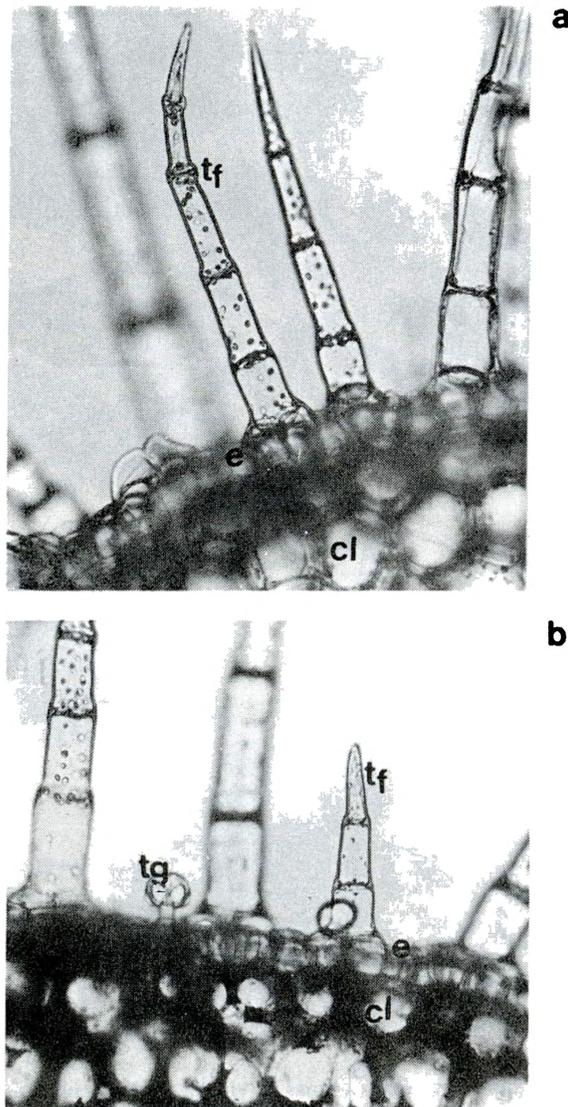


LÁMINA I. Cortes transversales en fresco de hoja de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (violeta africana) var. Georgia.

- | | |
|------------------|--------------------------|
| a) tricomas | filamentosos. 175×. |
| b) tricomas | glandulares. 100×. |
| e = epidermis | tf = tricoma filamentoso |
| cl = clorénquima | tg = tricoma glandular |

Fotografía: Hernández P., M.V.

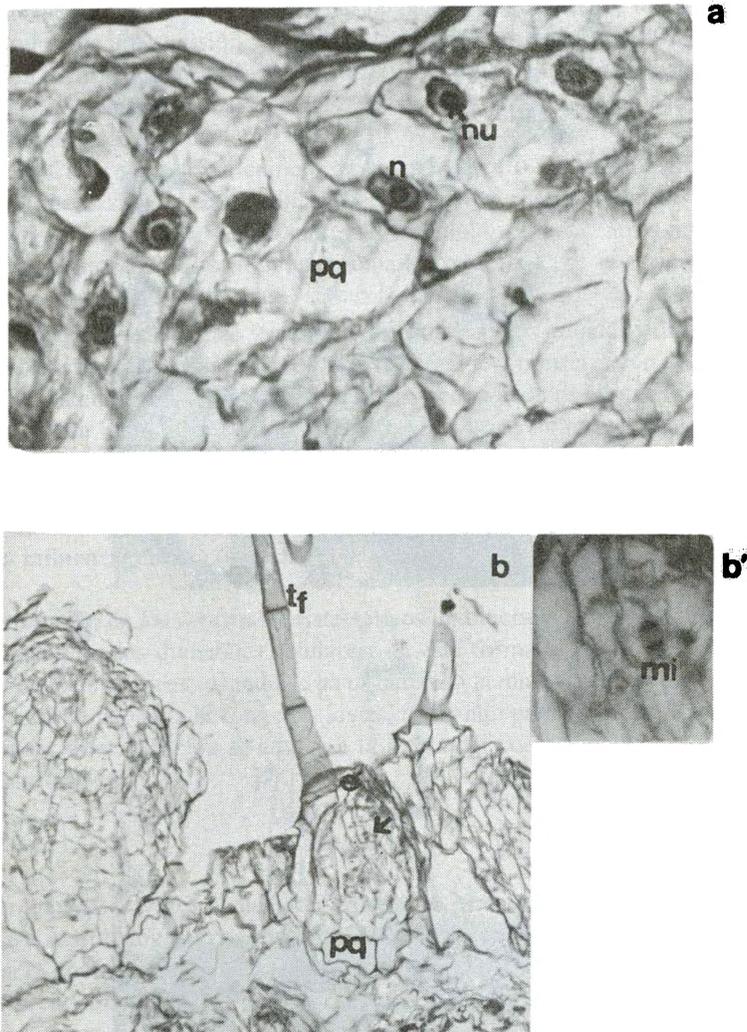


LÁMINA II. Inicio de la división celular en hojas de violeta africana cultivadas *in vitro* (técnica de tinción PAS-hematoxilina).

a) Células parenquimatosas cercanas a los haces vasculares muestran núcleos interfásicos muy activos que se preparan para la división celular. 400×.

b) Célula subepidérmica en división. 95×.

b') Acercamiento de b. 400×.

<i>n</i> = núcleo	<i>tf</i> = tricoma filamentos
<i>nu</i> = nucléolo	<i>e</i> = epidermis
<i>pq</i> = parénquima	<i>mi</i> = mitosis (-)

Fotografía: Hernández P., M.V.

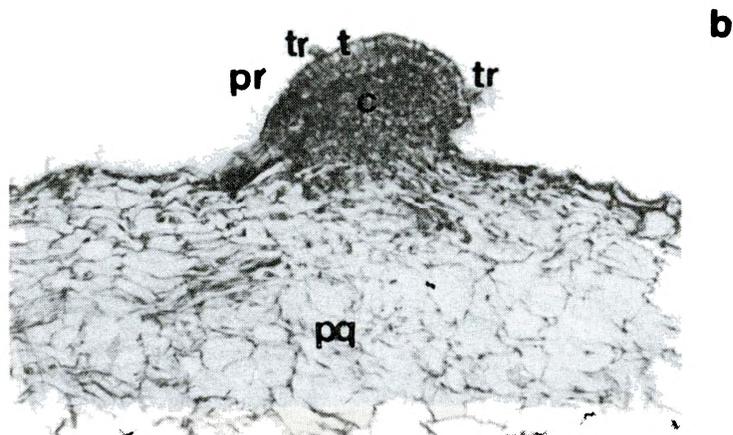
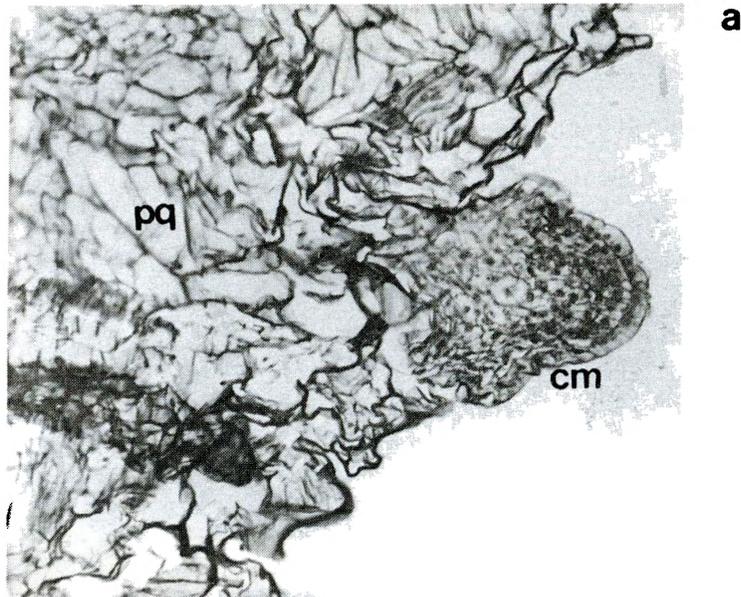


LÁMINA III. Centro meristemático y prómeristemo. (Técnica de tinción: PAS-hematoxilina.)

- a) Centro meristemático formado por células isodiamétricas pequeñas con citoplasma denso. 120×.
- b) El centro meristemático se organiza en la túnica y el cuerpo para formar el prómeristemo, cuya protodermis está diferenciando tricomas. 120×.

<i>cm</i> = centro meristemático	<i>pr</i> = prómeristemo
<i>t</i> = túnica	<i>pq</i> = parénquima
<i>c</i> = cuerpo	<i>tr</i> = tricoma

Fotografía: Hernández P., M.V.

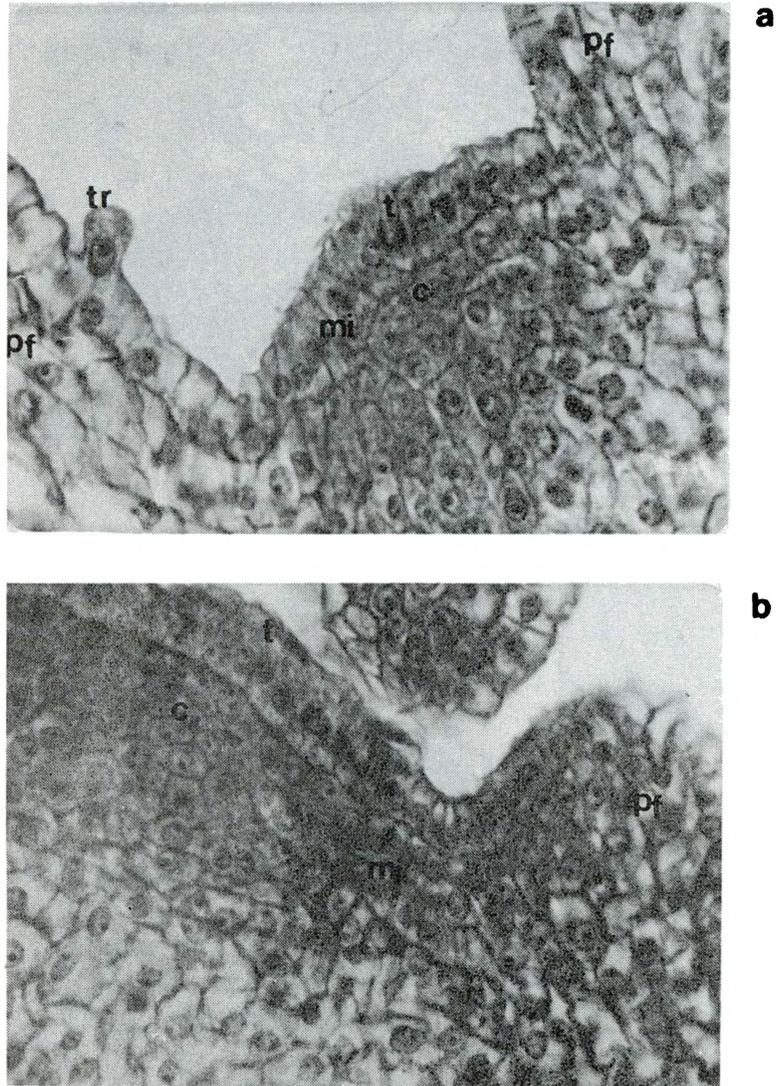


LÁMINA IV. Divisiones celulares en el promeristemo. (Técnica PAS-hematoxilina.)

- a) Mitosis con orientación anticlinal en célula de la túnica y surgimiento de un tricoma en un primordio foliar. 400×.
- b) Mitosis con orientación anticlinal en célula del cuerpo en relación con la aparición del primordio foliar. 400×.

t = túnica
c = cuerpo
mi = mitosis

pf = primordio foliar
tr = tricoma en desarrollo

Fotografía: Hernández P., M.V.

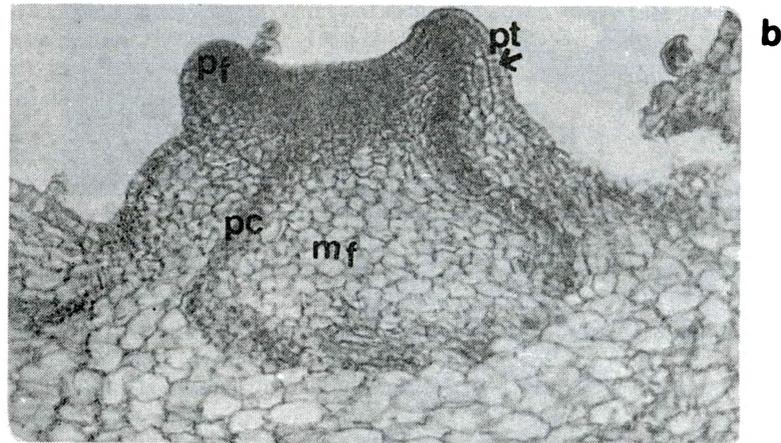
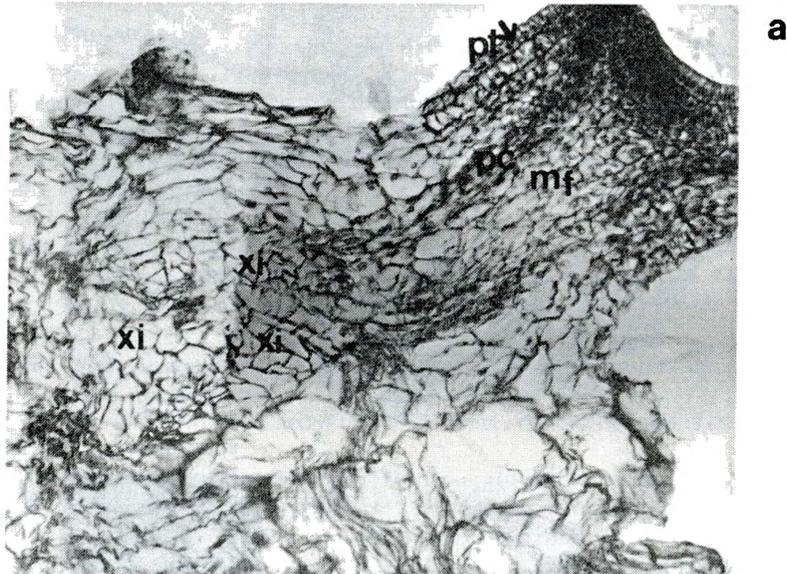


LÁMINA V. Diferenciación de los tejidos fundamentales; protodermo, meristemo fundamental y procambium. (Técnica: PAS-Hematoxilina.)

- a) Tejidos fundamentales y comunicación del *procambium* del brote con una haz vascular del explante. Los primordios foliares empiezan a surgir. 120×.
- b) El surgimiento de los primordios foliares y la diferenciación de los tejidos fundamentales. 120×.

pt = protodermo (→) *xi* = Xilema
mf = meristemo fundamental
pc = *procambium*

Fotografía: Hernández P., M.V.

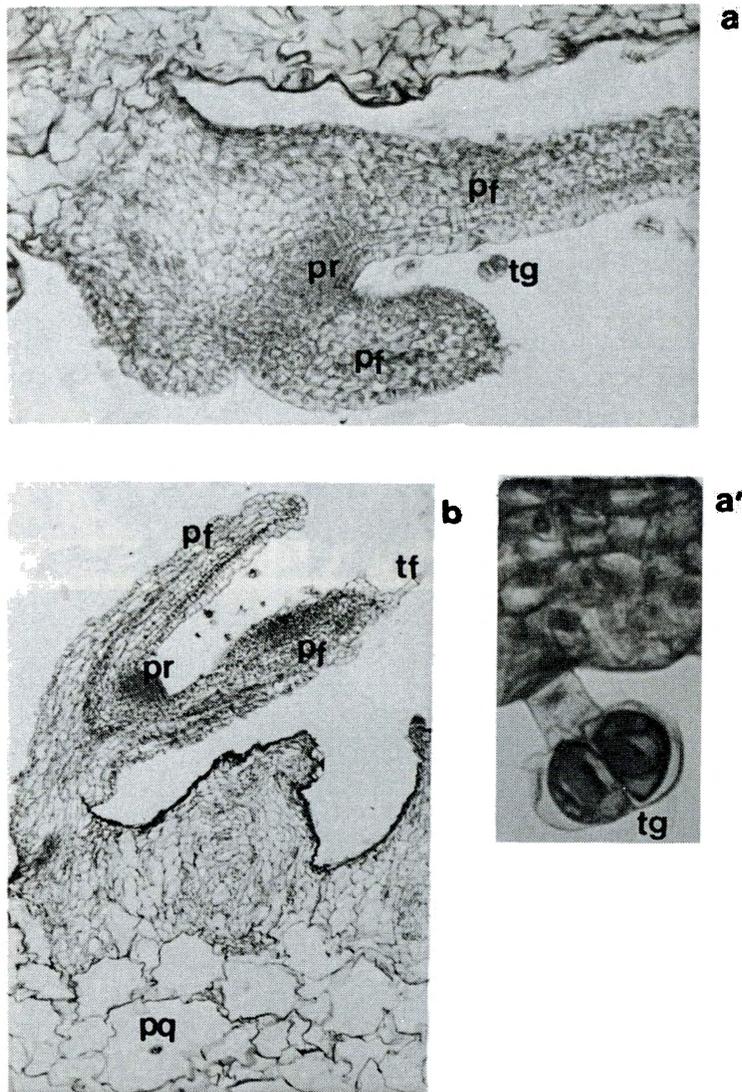


LÁMINA VI. El meristemo apical del brote adventicio de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (Técnica: PAS-Hematoxilina.)

a) Se observa el promeristemo, los primordios foliares con un tricoma glandular. 50×.

a') Acercamiento del tricoma glandular de a. 400×.

b) Muestra al meristemo apical de un brote adventicio de violeta africana, observándose el promeristemo, primordios foliares con un tricoma filamentoso, y los tejidos fundamentales.

pr = promeristemo *tf* = tricoma filamentoso
pf = primordios foliares *pq* = parénquima

Fotografía: Hernández P., M.V.

BIBLIOGRAFIA

- ARISUMI, T. AND L.C. FRAZIER, 1968. Cytological and morphological evidence for the single-cell origin of vegetatively propagated shoots in thirteen species of *Saintpaulia* treated with colchicine. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **93**: 679-685.
- BILKEY, P.C. AND E.C. COCKING, 1981. Increased plant vigor by *in vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. From sub-epidermal tissue. *Hort. Science*, **16**: (5): 643-644.
- BILKEY, P.C.; B.H. McCOWN AND A.C. HILDEBRANDT, 1978. Micropropagation of african violet from petiole cross-sections. *Hort Science*, **13**: (1): 37-38.
- COOKE, R.C., 1977. Tissue culture propagation of african violets. *Hort Science*, **12** (6):549.
- DELEÓN, R.I., 1983. Manual de citoquímica. Lab. de Citología Depto. de Morfología. ENCB, IPN. México, D.F.
- ESAU, K., 1962. *Plant Anatomy*. 2nd ed. Wiley, New York. London and Sydney.
- FAHN, A., 1974. *Plant Anatomy*. 2nd. ed. Pergamon Press, New York.
- HUGHES, K.W.; S.L. BELL AND J.D. CAPONETTI., 1975. Anther-derived haploids of the african violet. *Can J. Bot.* **53**: 1442-1444.
- JOHANSEN, D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. Mc.Graw Hill Book Co. Inc. U.S.A
- JORDAN, E.G.; J.N. TIMMIS AND A.J. TREWAVAS., 1980. *The plant Nucleus*. The Biochemistry of plants. V 1: The plant cell. (Tolvert, N.E. Ed.). Academic Press. U.S.A.
- MOLGAARD, J.P.; N. ROULUND; V. DEICHMANN; L. IRGENS-MOLLER; S.B. ANDERSEN AND B. FARRESTREIT, 1991. *In vitro* multiplication of *Saintpaulia ionantha* Wendl. by homogenization of tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, **48**: 285-292.
- MURASHIGE, T. AND F. SKOOG, 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- NAYLOR, E.E. AND B. JOHNSON, 1937. A histological study of vegetative reproduction in *Saintpaulia ionantha*. *Am. J. Bot.*, **24**: 673-678.
- NEWCOMB, E.H., 1980. *The general Cell*. In: The biochemistry of plants. V 1: The plant cell. (Tolbert, N.E. ed.). Academic Press, U.S.A.
- PEARY, J.S.; R.D. LINEBERGER; T.J. MALINICH AND M.K. WERTS, 1988. Stability of leaf variegation in *Saintpaulia ionantha* during *in vitro* propagation and during chimera separation of a pinwheel flowering form. *Amer. J. Bot.*, **603-608**.
- RAO, A.N. AND G. MOREL, 1973. Effects of *Agrobacterium* ssp. on petiole cultures of *Saintpaulia*. *Phytomorphology*, **23**: 1-9.
- REDWAY, F.A., 1991. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet.) *Plant Science*, **73**: 243-251.
- SHEEHAN, D.C. Y B.B. HRAPCHAK. 1980. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2nd. ed. Mosby Co. U.S.A. St. Louis Missouri.
- SMITH, R.H. AND R.E. NORRIS, 1983. *In vitro* propagation of african violet chimeras. *Hort Science*, **18** (4): 436-437.
- TRAN THANH VAN, M.; H. CHLYAH AND A. CHLYAH, 1974. Regulation of organogenesis in thin layers of epidermal and sub-epidermal cells. In: tissue culture and plant science (H.E. Street Ed.). Academic Press. London and New York. pp. 101-139.
- VÁZQUEZ, A.M.; M.R. DAVEY AND K.C. SHORT, 1977. Organogenesis in cultures of *Saintpaulia ionantha*. *Acta Horticulturae*, **78**: 249-258.