

# ESTUDIO ANATÓMICO DE LA ORGANOGENESIS *in vitro* EN *Gerbera jamesonii* Bolus. I. ORIGEN ONTOGENÉTICO DE LOS BROTES ADVENTICIOS

M.V. Hernández-Pimentel

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Depto. de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.  
Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, C.P. 11340, D.F., México, MÉXICO.

## RESUMEN

Con el propósito de determinar el origen ontogenético de los brotes adventicios de *Gerbera jamesonii* Bolus se realizó un estudio histológico de las inflorescencias inmaduras. Se analizaron capítulos de 8 a 12 mm de diámetro y cero días de cultivo, así como explantes cultivados *in vitro* durante 30 días. En los primeros, no se observaron yemas vegetativas entre las brácteas y los microesporocitos y macroesporocitos no habían iniciado la meiosis. No hubo desarrollo normal de gametos en los explantes cultivados y los brotes adventicios se originaron *de novo* a partir de células somáticas de las flores.

**PALABRAS CLAVE:** morfogénesis, yemas adventicias, desarrollo, centros meristemáticos, ontogenia, cultivo de tejidos.

## ANATOMIC STUDY OF THE *in vitro* ORGANOGENESIS IN *Gerbera jamesonii* Bolus. I. ONTOGENIC ORIGIN OF THE ADVENTITIOUS SHOOTS

### SUMMARY

Histological studies of immature inflorescences from *Gerbera jamesonii* were carried out, with the purpose of to determine the ontogenic origin of the adventitious shoots. No cultivated capitulum of 8 - 12 mm and *in vitro* cultivated explant of 30 days were analyzed. In immature inflorescences we observed that the explant did not have vegetative buds and there was no presence of meiosis microsporocytes and macrosporocytes. In the cultivated explants, the adventitious shoots were differentiated *de novo* from flower somatic cells.

**KEY WORDS:** Morphogenesis, adventitious shoots, development, meristematic centers, ontogeny, tissue culture.

## INTRODUCCIÓN

La gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) es una especie ornamental que en el mercado florícola internacional está catalogada entre los primeros 10 lugares de mayor valor comercial. Las gerberas están clasificadas dentro de la familia Compositae, y son plantas con el eje principal corto y grueso, con distancias internodales pequeñas y con las hojas dispuestas en roseta. En los ángulos que forman los peciolos con el tallo se encuentran las yemas axilares que dan origen a los brotes vegetativos laterales, los que al desarrollarse forman otras rosetas con raíces propias, y que al crecer dan origen a matas compactas o colonias de plantas. Las hojas son pecioladas, elípticas, alargadas, de forma lanceolada, con los bordes lisos o dentados, a veces con el envés rugoso y siempre aterciopelado (Franco, 1995). Presentan inflorescencias en capítulo, localizadas en la porción terminal del pedúnculo floral. El primer botón floral tiene su origen en el meristemo apical del vástago principal de las plantas jóvenes; los siguientes se originan en los meristemos apicales de

las yemas axilares. El pedúnculo floral sostiene al receptáculo, en el cual están insertados los dos tipos de flores que forman la inflorescencia, además de las brácteas que se disponen en una o varias hileras periféricas y cuyo conjunto constituye el involucro. Tanto las flores liguladas periféricas, como las tubulares que ocupan la porción central del disco y que se ordenan en forma espiralada, presentan ovario ínfero. Cada unidad floral tiene cinco pétalos unidos dorsal o radialmente (Franco, 1995); el androceo, presenta los estambres unidos al tubo de la corola por medio de sus filamentos, también presentan un cáliz modificado o papus el que puede ser escamoso o con tricomas pluricelulares (Weier *et al.*, 1970).

Un método eficiente para la propagación vegetativa de gerberas es el cultivo *in vitro* o micropropagación, ya que ha permitido incrementar la producción de plantas sanas y genéticamente homogéneas. En 1972, Pierik y Segers (citado en Pierik *et al.*, 1973) iniciaron el cultivo *in vitro* de *Gerbera*. Estos autores utilizaron como explante segmentos de hojas, incluyendo la nervadura central y

obtuvieron formación de tejido calloso y raíces adventicias. Por su parte, Pierik *et al.* (1973) usaron como explante el capítulo floral maduro, eliminando las flores y sembrando solamente el receptáculo con las brácteas. Se logró el desarrollo de algunos brotes vegetativos adventicios en cada explante. Posteriormente, Pierik *et al.* (1975) optimizaron su método; sin embargo, surgió la interrogante sobre el origen histológico de los brotes.

El uso de capítulos florales como fuente de explante involucra la participación de estructuras relacionadas con la reproducción sexual, como son las anteras y el pistilo y con ello la posible intervención de los gametos en el origen de los brotes. Descartar este hecho y asegurar el origen somático de los mismos, justifica la importancia de conocer su origen histológico. No obstante de que Murashige *et al.* (1974) habían desarrollado un sistema óptimo para la propagación clonal de *Gerbera* a partir de ápices de brotes y meristemas, Laliberté *et al.* (1985) retomaron el uso de capítulos florales como fuente de explantes. En esa ocasión seleccionaron estructuras jóvenes (0.5 a 0.7 cm de diámetro), sin eliminar a las flores, pero sí a las brácteas y obtuvieron mayor número de brotes adventicios que Pierik *et al.* (1975). No obstante la necesidad de conocer el origen de los brotes adventicios, éste no fue determinado.

Franco (1995), retomó las experiencias anteriores y logró propagar masivamente tres variedades híbridas de *Gerbera*, utilizando como fuente de explante los capítulos florales jóvenes. La observación macroscópica de los explantes en cultivo mostró que los brotes surgen de las flores que forman el capítulo, pero no se puede determinar de esta manera su origen exacto. Con este trabajo se busca saber si los gametos tienen alguna relación con el desarrollo de los brotes adventicios o bien, establecer con bases histológicas que tienen un origen somático; de ser así podría entonces asegurarse que son genéticamente homogéneos. La presente investigación pretende resolver esta interrogante, planteándose los siguientes objetivos: describir los cambios anatómicos en las inflorescencias inmaduras de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María, como respuesta a su cultivo *in vitro*. Además definir el origen histológico de los brotes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

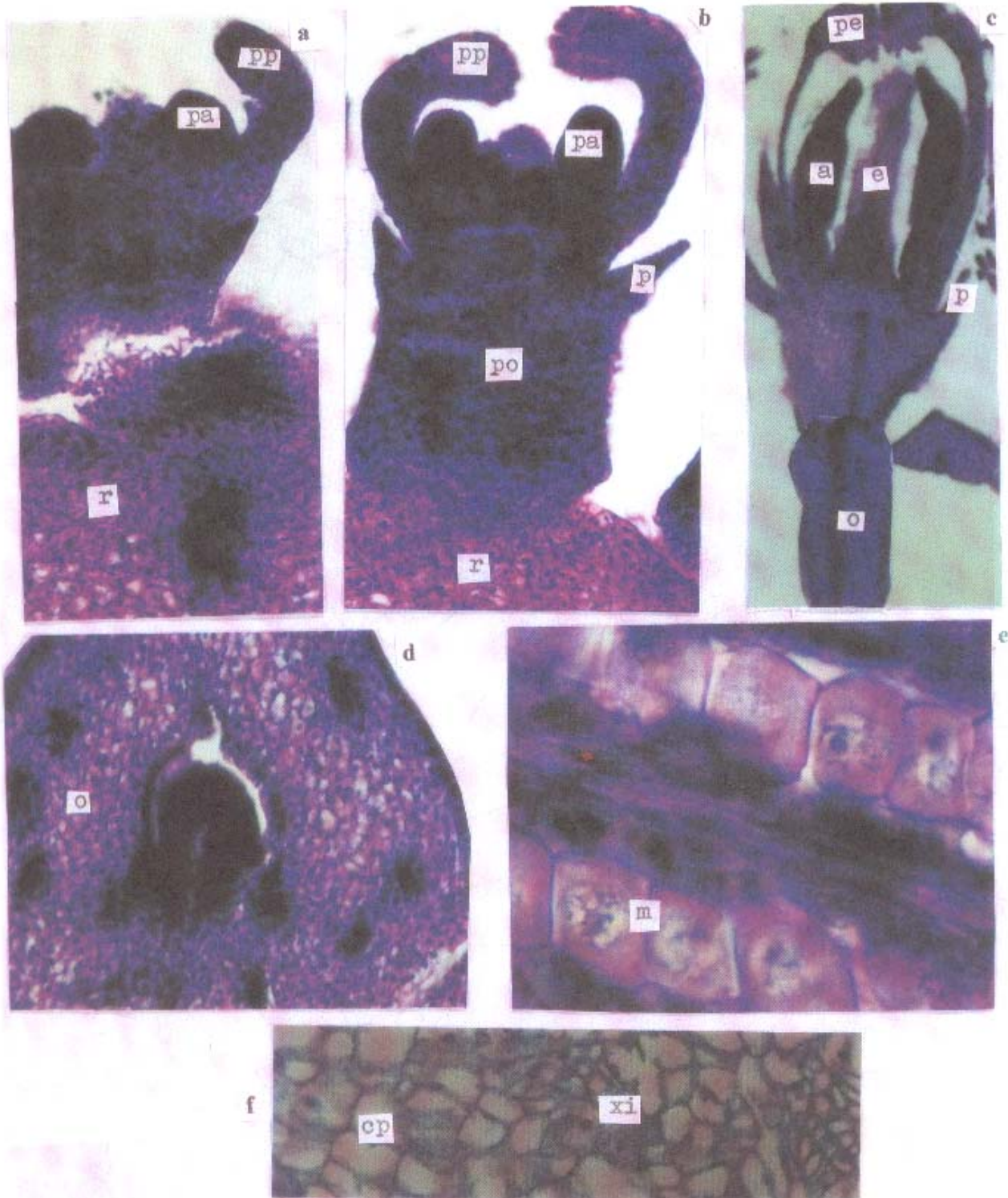
Se utilizó una planta de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María de la cual se obtuvieron los botones florales de 8 a 12 mm de diámetro. Las muestras de explantes en cultivo fueron proporcionadas por José Franco Rodríguez del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Cada botón floral fue dividido en ocho segmentos que se sembraron en un medio constituido por las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog (1962), más 85 mg·litro<sup>-1</sup> de fosfato de sodio monobásico, adicionado con mio-inositol 200 mg·litro<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 1.0 mg·litro<sup>-1</sup>, piridoxina 2.0 mg·litro<sup>-1</sup>, tiamina

1.0 mg·litro<sup>-1</sup>, adenina 125 mg·litro<sup>-1</sup>, tirosina 100 mg·litro<sup>-1</sup>, ácido naftalen-acético 1.0 mg·litro<sup>-1</sup>, benciladenina 5.0 mg·litro<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g litro<sup>-1</sup> y solidificado con agar 6.5 g litro<sup>-1</sup>; el pH del medio fue de 5.8. Las condiciones de incubación fueron 22-24 °C de temperatura y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad (Franco, 1995). Las muestras de cero y treinta días en cultivo fueron fijadas por 48-72 horas en FAA, que es una mezcla constituida por 10 ml de formaldehído, 5 ml de ácido acético glacial, 50 ml de etanol absoluto y 30 ml de agua destilada; posteriormente fueron procesadas mediante la técnica histológica de inclusión en parafina (modificada a partir de Johansen, 1940). La deshidratación se realizó mediante el paso de los explantes por soluciones de etanol al 30%, 50%, 70% y 80% durante una hora cada uno; después por etanol al 90% durante 18 horas, 96% durante 4 horas y etanol absoluto durante 2 horas. Después se sumergieron en una mezcla de etanol absoluto-xileno (proporción 1:1) por 30 minutos y xileno puro por 2-4 minutos, para después pasar a una mezcla de parafina (punto de fusión 56-58 °C)-xileno (proporción 1:1) por 40 minutos. Después se pasaron dos veces por parafina pura (punto de fusión 58-60 °C) por 5 horas cada vez y finalmente se incluyeron en parafina. Los cortes longitudinales de 10 a 12 µm se obtuvieron usando un microtomo rotatorio (American Optical 820). La tinción de laminillas se realizó según la técnica del ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y hematoxilina, la técnica de Sylven y la técnica de Chevrement (Deleón, 1983), para determinar carbohidratos, mucopolisacáridos y proteínas, respectivamente. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio compuesto en un sistema de campo claro. Las fotografías se obtuvieron con un fotomicroscopio marca Nikon (Labophot T-2) usando película Kodak-Gold 100-135.

## RESULTADOS

Previo a su cultivo *in vitro*, el explante presentó en el centro del disco a los primordios florales y hacia el exterior, flores con todos los verticilos bien diferenciados (papus, corola sin abrir, androceo y gineceo) (Figura 1a, b y c). En el ovario de las flores más desarrolladas, el óvulo (que contiene al macroesporocito) se observó como un primordio (Figura 1d). En las anteras había microesporocitos primarios (Figura 1e). El receptáculo estuvo constituido por tejido parenquimatoso con abundantes haces vasculares en cada flor (Figura 1f). No se observaron yemas vegetativas en la axila de las brácteas.

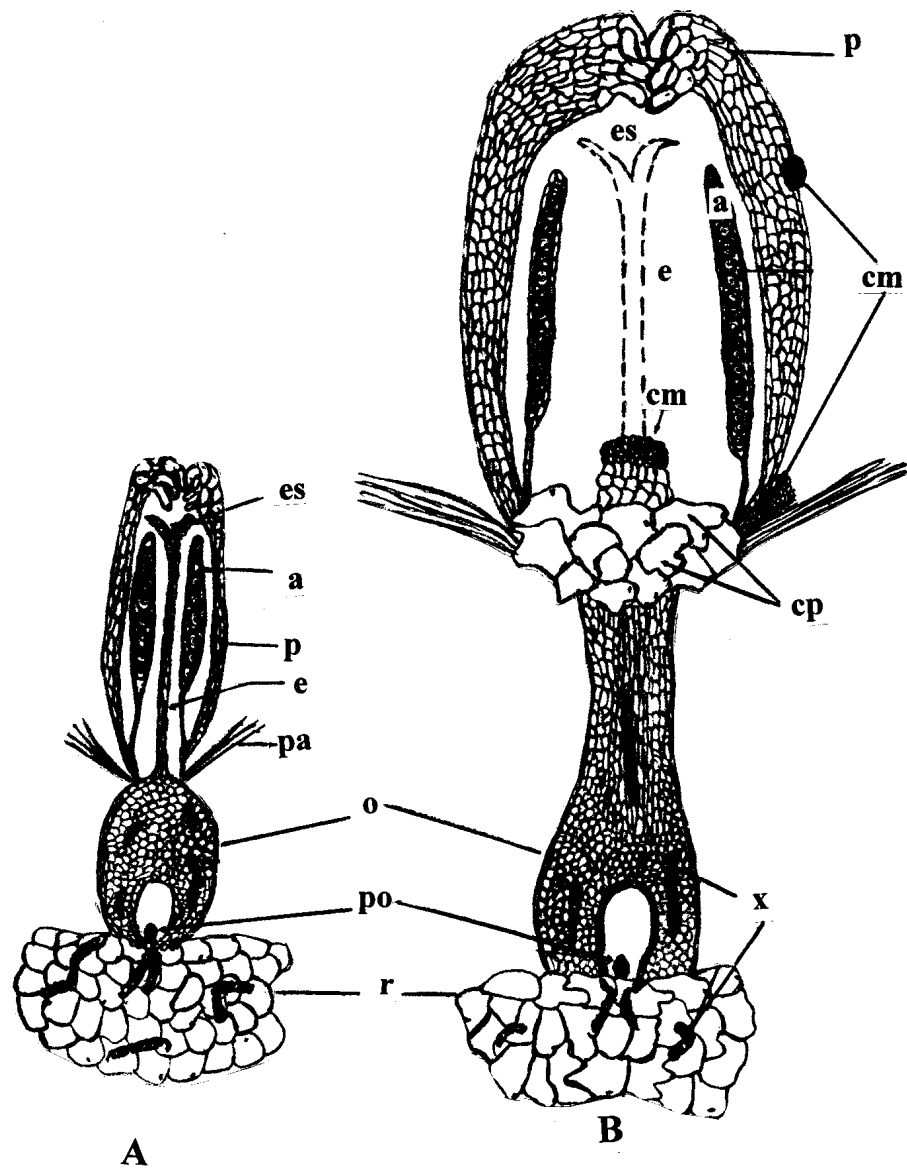
Los explantes cultivados *in vitro* presentaron un desarrollo diferente al de capítulos sin cultivar. Después de 30 días, los explantes cultivados *in vitro* presentaron los siguientes cambios anatómicos y morfológicos: el ovario se alargó particularmente por arriba de su cavidad y en la zona de origen del resto de los verticilos (papus, pétalos y estambres), diferenciándose grandes células parenquimatosas, vacuoladas y con el núcleo desplazado hacia la membrana citoplasmática (Figura 2).



**FIGURA 1. Anatomía del capítulo floral de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María cuando es tomado como explante (8 a 12 mm de diámetro).**

- a,b,c Etapas de desarrollo de las flores del disco. Primero aparecen los primordios de pétalos y de anteras, después se diferencia el gineceo y por último el papus. Tinción ácido peryódico-Schiff (PAS). 170X.
- d La pared del ovario de una de las flores más desarrolladas del disco. La cavidad ovárica no se ha formado por completo y el óvulo es un primordio. Tinción PAS. 430 X.
- e El interior de las anteras contiene microesporocitos primarios. Tinción PAS. 1700X.
- f El receptáculo del capítulo está constituido de células parenquimatosas y abundante venación. Tinción Sylven. 170X.

pp = primordio de pétalo, pa = primordio de antera, po = primordio de ovario, p = papus, pe = pétalo, a = antera, o = ovario, e = estilo, m = microesporocitos, cp = células, parenquimatosas, xi = vasos de xilema, r = receptáculo.



**FIGURA 2. Anatomía de los explantes de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María.**

- A) Flor tubular ubicada hacia el exterior del disco de un explante sin cultivar.  
 B) Flor de un explante cultivado *in vitro* por 30 días

r = receptáculo, o = ovario, e = estilo, es = estigma, pa = papus, po = primordio de óvulo, cp = células parenquimatosas, cm = centros meristemáticos, x = xilema.

En los explantes cultivados por 30 días, no se encontró desarrollo de gametos en las anteras, los microesporocitos apenas habían concluido la meiosis (Figura 3c) y en algunas flores las tétradas ya se habían separado, aunque el grano de polen aún no estaba maduro (Figura 3d).

A los 30 días de cultivo *in vitro*, los explantes presentaron tres puntos de origen de centros meristemáticos, sin formación previa de tejido calloso: uno, en la zona que corresponde a la ubicación del estilo, por encima del ovario; otro poco frecuente, localizado sobre la corola y; el punto más frecuente estuvo ubicado en el ángulo que forman el papus con los pétalos (Figura 2). Estos centros meristemáticos están formados por la agrupación de células meristemáticas de tamaño pequeño, con citoplasma denso, núcleo grande y difuso y nucleolo teñido con intensidad; en estas células también se observaron figuras mitóticas frecuentes, presentando además una tinción ortocromática con la técnica de Sylven (dada por la presencia de mucopolisacáridos), elevado contenido de proteínas en el citoplasma, así como de carbohidratos, pero sin presentar gránulos de almidón (Figura 3c y d).

También fueron observados centros meristemáticos que habían iniciado su diferenciación a meristemos apicales de brote, cuyo proceso se describe a continuación: primero, las células del centro meristemático se organizan en un domo, constituido por la túnica (células superficiales alineadas) y el cuerpo (Figura 3e); posteriormente, se observó que del domo meristemático surgió el primer par de primordios de hoja, lo que marcó el inicio del desarrollo de un brote vegetativo adventicio (Figura 3f) de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María que se obtiene al cultivar *in vitro* capítulos florales inmaduros.

## DISCUSIÓN

Los resultados descartan la posibilidad señalada por Pierik *et al.* (1973 y 1975) de que los brotes se originaran a partir de yemas vegetativas preexistentes en el explante. Los cortes histológicos de capítulos sin cultivar no mostraron yemas vegetativas en la axila de las brácteas ni sobre el receptáculo.

El estado de desarrollo de las estructuras reproductoras en los explantes al momento de la siembra permite asegurar que todas las células poseían igual número cromosómico, incluyendo los microesporocitos y los macroesporocitos, que aún no habían iniciado la meiosis. Además, se confirmó que en el momento que se tomó el explante no había ocurrido la fertilización y por lo tanto, los brotes producidos *in vitro* no fueron originados por la germinación de semillas o del desarrollo de un embrión sexual. Los brotes desarrollados *in vitro* tampoco provienen de una autofecundación durante el tiempo de cultivo,

ya que en los explantes cultivados por 30 días, las anteras solamente habían formado tétradas separadas, pero el grano de polen aún no se diferenciaba como tal; en tanto que el óvulo no presentó mayor diferenciación. Esto representa una ventaja de este método de propagación ya que asegura el origen somático de los brotes y con ello, la poca o nula variabilidad genética de los mismos con respecto a la planta madre. Lo anterior es deseable cuando se pretende obtener cosechas de flores con características uniformes (Franco, 1995).

Los cambios anatómicos en las células somáticas del explante, particularmente en cada una de las flores, como efecto del cultivo por 30 días, condujeron a la diferenciación de centros meristemáticos, que se desarrollaron en los meristemos apicales de los brotes adventicios los cuales se originaron de células somáticas de las flores. Siendo así, este sistema constituye una opción complementaria al cultivo de ápices y meristemos propuesto por Murashige *et al.* (1974), pero con la ventaja de no perder a la planta madre al obtener los explantes. Se recomienda utilizar capítulos florales jóvenes como fuente de explante.

El desarrollo ontogenético de los meristemos adventicios es similar al que se ha detallado en otras angiospermas ornamentales como son: la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) (Hernández *et al.*, 1994), *Begonia rex* Putz (Tran Thanh Van *et al.*, 1974) y *Begonia x tuberhybrida* Voss (Hernández-Pimentel y Tavera-Martínez, 1996 y Tavera, 1997).

## CONCLUSIÓN

Los brotes vegetativos adventicios producidos a partir de inflorescencias inmaduras de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María cultivadas *in vitro* tienen un origen somático, resultado de la diferenciación de yemas vegetativas *de novo* en cada una de las flores que forman parte del explante, diferenciándose principalmente a partir de las células ubicadas en la axila que forma el papus con los pétalos.

## AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al M. en C. José Franco Rodríguez, por haber proporcionado el material vegetal para la realización de este trabajo, a la Dirección de Estudios Profesionales e Investigación de Instituto Politécnico Nacional por el apoyo al proyecto DEPI-932558, así como a María Guadalupe Aparicio Hernández por la captura de este escrito.



**FIGURA 3. Anatomía de explantes de *Gerbera jamesonii* Bolus var. María cultivados *in vitro* por 30 días y ontogenia del meristemo del brote vegetativo adventicio.**

- a Las anteras de flores de explantes cultivados por 30 días contienen microesporocitos en proceso de meiosis 1ª etapa y algunos han concluido la 2ª etapa, observándose las tétradas (cuatro células haploides producto de la meiosis) aún unidas. Tinción PAS. 1700X.
- b Las anteras de flores más externas del mismo explante mostraron las tétradas ya separadas. Cada célula haploide tiene un núcleo; todavía no es un grano de polen. Tinción PAS. 1700X.
- c Un centro meristemático en una zona ubicada entre los pétalos y el papus. Tinción Sylven. 430X.
- d Amplificación de la figura anterior. 1700X.
- e Proliferación y organización de las células de un centro meristemático llamado ahora promeristemo o domo meristemático. Tinción PAS. 430X.
- f Diferenciación del primer par de primordios foliares y constitución del meristemo apical de un brote adventicio de *G. jamesonii*. Tinción PAS. 430 X.

m = microesporocito en proceso de meiosis 1ª etapa; t = tétradas; mi = microesporas haploides, aún no diferenciadas; pe = pétalos; cp = célula parenquimatosas; d = domo meristemático; p = papus; o = ovario; cm = centro meristemático; pf = primordios foliares

## LITERATURA CITADA

- DELEÓN, R.I. 1983. Curso de Citoquímica, Manual de Laboratorio de Citología, Depto. de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. 48 p.
- FRANCO, R.J. 1995. Micropropagación de *Gerbera jamesonii* Bolus a partir de explantes de botones florales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. 106 p.
- HERNÁNDEZ, P.M.V.; FRANCO, R.J.; GARCÍA, C.M.T. 1994. Anatomía del desarrollo de brotes en hojas de *Saintpaulia ionantha* Wendl. cultivadas *in vitro*. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Mex. 40:95-105.
- HERNÁNDEZ-PIMENTEL, M.V.; TAVERA-MARTÍNEZ, S. 1996. Análisis histológico de callo producido por hojas de *Begonia x tuberhybrida* cultivada *in vitro*. Revista Chapingo Serie Horticultura 2(2): 171-175.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. Mc. Graw Hill Book Co. Inc. USA. pp: 27-47 y 126-154.
- LALIBERTÉ, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. 1985. *In vitro* plantlet production from capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. HortScience 20(1): 137-139.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J.B. 1974. Clonal multiplication of *Gerbera* through tissue culture. HortScience 8(3): 175-179.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; MARELIS, J.J. 1973. *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. Scientia Horticulturae 1: 117-119.
- PIERIK, R.L.M.; JANSEN, J.L.M.; MAASDAM, A.; BINNENDIJK, C.M. 1975. Optimization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. Scientia Horticulturae 3: 351-357.
- TAVERA, M.S. 1997. Organogénesis en *Begonia x tuberhybrida*. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores "Iztacala" Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 65 p.
- TRAN THANH VAN, M.; CHLYAH, H.; CHLYAH, A. 1974. Regulation of organogenesis in thin layers of epidermal and subepidermal cells. pp. 101-130. In: Tissue Culture and Plant Science H.E. Street (ed.). Academic Press. London and New York, USA.
- WEIER, T.E.; STOCKING, C.R.; BARBOUR, M.G. 1970. Botany. 4a. Ed. Wiley Editor. USA. pp. 290-295.