

# CAMBIOS ANATÓMICOS EN HOJAS DE *Vitis vinifera* L. OBTENIDAS *in vitro*

F. Cruz-Pizarro<sup>1</sup>; H. González-Rosas<sup>2\*</sup>; G. Espinosa-Osornio<sup>3</sup>; J. Velázquez-Mendoza<sup>2</sup>; M. T. Colinas-León<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>FES-Cuautitlán, UNAM. Ciencias Agrícolas, D. F. México.

<sup>2</sup>Especialidad en Fruticultura, Colegio de Posgraduados, Montecillos Estado de México. C. P. 56230. México. (\*Autor responsable)

<sup>3</sup>Especialidad Botánica, Colegio de Posgraduados. Montecillos Estado de México. C. P. 56230. México.

<sup>4</sup>Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. México.

## RESUMEN

Las plantas desarrolladas *in vitro* presentan modificaciones anatómicas en comparación con las de campo, que pueden llegar a limitar su supervivencia. En la presente investigación se realizaron observaciones anatómicas mediante microscopía de luz sobre las modificaciones en la anatomía de hoja de brotes de vid (*Vitis vinifera* L.) 'Málaga Roja' cultivadas en el medio (WPM), en comparación con plantas de campo. Se tomaron muestras de hojas que se fijaron en FAA y se procesaron en microtecnia de parafina, realizándose tinciones safranina-verde fijo y rojo de aceite 7B. Se encontraron diferencias anatómicas: un menor grosor de la hoja y de la cutícula para las hojas provenientes del cultivo *in vitro*, en cuanto a la organización del mesófilo se determinó la ausencia de parénquima en empalizada en las hojas *in vitro*, menor desarrollo tejido vascular y una mayor densidad estomática en plantas obtenidas *in vitro*.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** propagación, cultivo de tejidos, histología, uva, vid, hoja.

## ANATOMICAL CHANGES IN *Vitis vinifera* LEAVES PRODUCED *in vitro*

## SUMMARY

Plants grown *in vitro* have anatomical modifications compared to those grown in the field. These modifications can limit their survival. In this study, anatomical observations were made with light microscopy to compare modifications in the anatomy of the leaves of grapevine shoots (*Vitis vinifera* L.) 'Malaga Roja' grown in "woody plant medium" (WPM) culture medium with the anatomy of leaves from field plants. Samples of leaves were fixed in FAA and processed with the paraffin microtechnique and dyed with fixed safranin green and red 7B oil. Anatomical differences were found: thinner leaves and leaf cuticle in *in vitro* plants; in the organization of the mesophyll there was an absence of palisade parenchyma in the *in vitro* leaves, the vascular tissue was less developed, and there was a higher stomatic density in plants grown *in vitro*.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** propagation, tissue culture, histology, grape, leaf.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas que crecen en condiciones del cultivo *in vitro*, pueden presentar alteraciones anatómicas y morfológicas, estas modificaciones pueden ser las responsables de una baja supervivencia al ser transferidas a condiciones de campo. En forma limitada existen trabajos realizados con plantas procedentes del cultivo *in vitro* sobre aspectos específicos de anatomía de estas plantas.

Larrea (1980), Weaver (1981) y Reyner (1989) señalaron que la hoja de vid madura procedente del campo presentó una epidermis superior formada por una capa de células rectangulares recubierta exteriormente por una cutícula y cinco estratos en el mesófilo; de los cuales, el

inmediato a la epidermis adaxial está diferenciado como parénquima en empalizada y cuatro estratos de parénquima esponjoso con espacios intercelulares y la epidermis abaxial formada por una capa de células rectangulares con presencia de estomas y carente de cutícula.

Leshem (1983) señaló que las hojas de las plantas de clavel obtenidas *in vitro* pueden presentar un número reducido de estratos de parénquima en empalizada, espacios intercelulares abundantes en el mesófilo, defectos en el tejido epidérmico, incluyendo una menor superficie de ceras, o bien, ceras con una estructura cristalina diferente, así como una cutícula con un bajo nivel de cutina, pectina y celulosa además de una conexión vascular defectuosa entre las raíces y el tallo.

Fabbri *et al.* (1986), estudiaron los cambios anatómicos en hojas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivadas *in vitro*, las cuales presentaron un escaso desarrollo del parénquima en empalizada, menor grosor de la hoja (131  $\mu\text{m}$ ) y un mayor porcentaje de espacios intercelulares en el mesófilo esponjoso (32.8 %), comparado con las hojas de plantas de campo, en donde existen dos estratos en empalizada y mayor grosor de hoja (193  $\mu\text{m}$ ) con menor porcentaje ocupado por espacios de aire (26.7 %) en el parénquima esponjoso.

Cozza *et al.* (1997), establecieron la influencia del medio de cultivo con relación a la composición mineral y la histología en brotes de olivo (*Olea europaea* L.) cultivados *in vitro* donde observaron que el grosor de la hoja, los estratos de parénquima en empalizada, el diámetro del tejido vascular de la vena media, la cutícula sobre la epidermis abaxial, la densidad estomática, el desarrollo de parénquima esponjoso y los espacios intercelulares contenidos en él fueron menores para las plantas cultivadas *in vitro*, en comparación con plantas que crecen en campo; además de un menor número y diámetro reducido de elementos de xilema y floema.

En vid, Fila *et al.* (1998) analizaron plántulas obtenidas *in vitro* en cuanto a su fotosíntesis, conductancia estomática y relaciones hídricas ocurridos en su aclimatación, pero hasta ahora se desconoce sobre las principales características histológicas de estas plantas, información que ayudaría a establecer una mejor estrategia de aclimatación.

El objetivo de la presente investigación fue realizar observaciones anatómicas de los principales cambios que sucedieron en hojas de brotes de vid cultivadas *in vitro* así como su comparación de manera general con las plantas provenientes del campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Embriogénesis y de Anatomía Vegetal del Colegio de Postgraduados, en Montecillo Edo. de México, México.

Se utilizaron brotes provenientes del cultivo *in vitro* de ápices de vid (*Vitis vinifera* L.) 'Málaga Roja', los cuales se establecieron bajo condiciones asépticas. Empleando el medio WPM (Woody Plant Medium) propuesto por Lloyd y Mc. Cown (1980) en forma sólida sólo para su establecimiento, al cual se modificó su fuente de nitrógeno, empleando 17.5 mM de nitrógeno total, en una proporción 6:1  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ . Los brotes posteriormente fueron transferidos a un medio líquido.

Se tomaron muestras de hojas de plantas cultivadas *in vitro* y de plantas provenientes del campo con la lámina

foliar completamente extendida, del tercio superior de la caña. Se fijaron en FAA (formaldehído-ácido acético-alcohol) por 72 horas (Sass, 1968) y se procesaron en el cambiador automático de tejidos (Fisher tissuematon) con cellosolve y xileno, posteriormente se transfirieron a parafina (55 °C) permaneciendo 72 horas, dentro de la estufa. Se elaboró el taquete y pirámide de parafina correspondiente para cada muestra de acuerdo a la metodología sugerida por Sass (1968). En un micrótomoto rotatorio (marca American Optical modelo 820) se realizaron cortes transversales de un grosor de 10  $\mu\text{m}$ , los cuales se montaron con adhesivo Haup y formol al 10 %.

Se utilizó la tinción iónica de safranina-verde fijo modificada por (E. Mark Engleman; comunicación personal)<sup>2</sup>, que consistió en que los cortes hidratados se colocaron en safranina saturada en solución acuosa por 24 horas (tinción regresiva), posteriormente se lavó con agua, y se deshidrató gradualmente para utilizar el verde fijo con gotero (tinción progresiva), después se llevó hasta xileno y se le colocó una gota de resina, se colocaron en la platina de calor (50-55 °C) por 48 horas. Para tinción de cutículas (por solubilidad); el portaobjetos con el espécimen hidratado fue colocado en rojo de aceite 7B, por 24 horas, posteriormente se enjuagó con 2-propanol al 50 % y se montó en jalea de glicerol (E. Mark Engleman; comunicación personal)<sup>2</sup>. Se realizaron las observaciones y se tomaron fotomicrografías con un fotomicroscopio Carl Zeiss modelo 67791.

Además, se realizaron réplicas de la epidermis abaxial con pegamento líquido de cianoacrilato ("kola loka") en un portaobjetos, los estomas se contaron con el microscopio de luz, con cámara clara o brazo dibujador marca Carl Zeiss.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

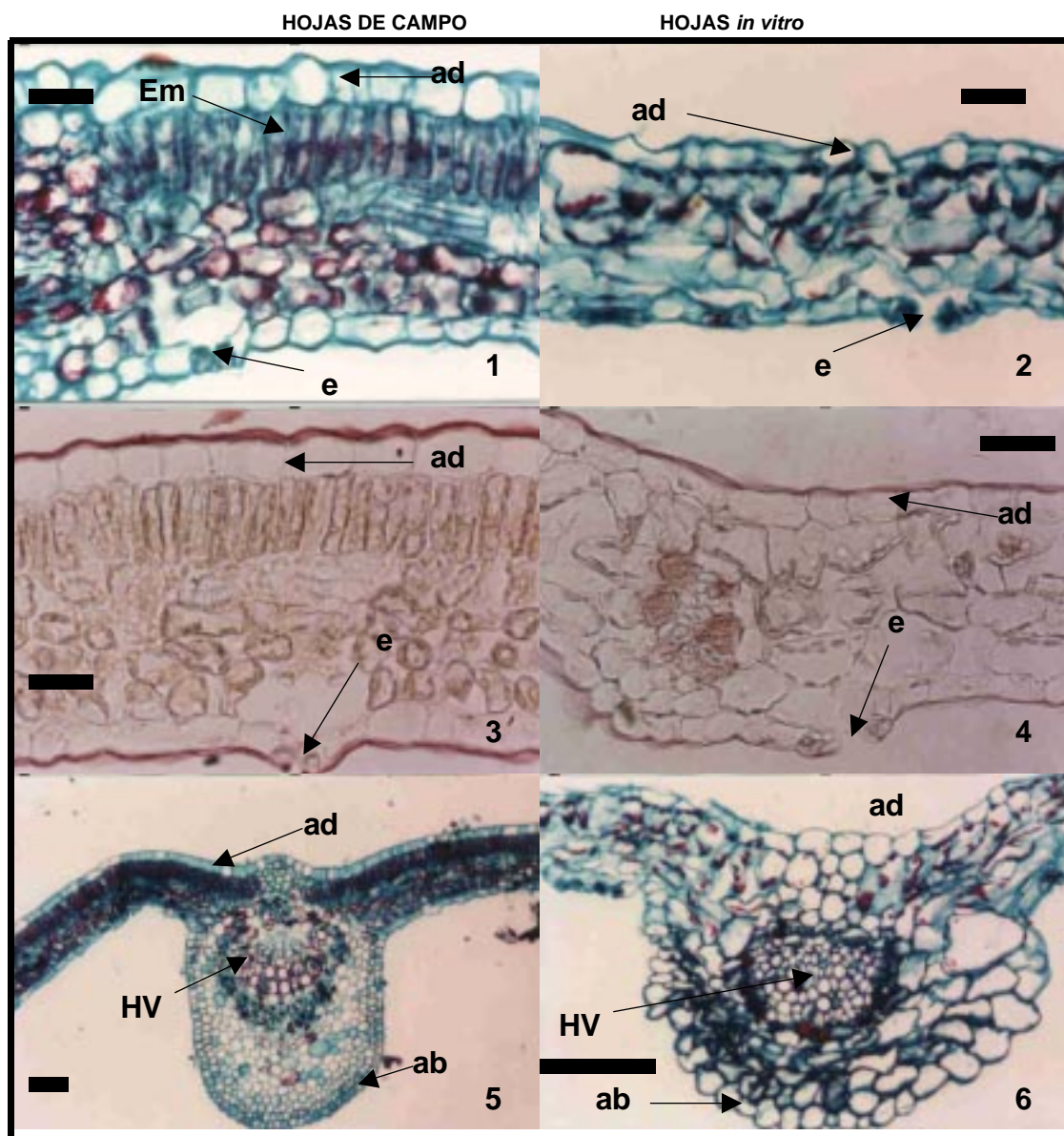
En los cortes teñidos con safranina-verde fijo se encontraron diferencias en la organización del mesófilo de la hoja de acuerdo a su origen (*in vitro* vs campo). Hojas provenientes de campo en corte transversal presentaron grosor de 100  $\mu\text{m}$  y cinco estratos de mesófilo, el más cercano a la superficie adaxial diferenciado claramente en mesófilo en empalizada (Figura 1) concordando con lo citado por Larrea (1980), Weaver (1981) y Reyner (1989). Los cuatro estratos de mesófilo esponjoso presentaron células con espacios intercelulares evidentes, pero pequeños. La epidermis adaxial carece de células oclusivas, todas sus células son cuboidales con una muy evidente cutícula (Figura 3). Las células de la epidermis abaxial fueron más pequeñas que las de la epidermis adaxial y algunas fueron cuboidales, mientras que otras fueron más alargadas en un sentido periclinal, su cutícula es evidente pero menos gruesa que la de la epidermis adaxial (Figura 3) lo cual no coincidió con algunos reportes

<sup>2</sup> E. Mark Engleman, Profesor-Investigador. Especialidad de Botánica IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.

(Larrea, 1980; Weaver, 1981; Reyner 1989) respecto a la ausencia de cutícula en la superficie abaxial de hojas procedentes de campo aun cuando no reportaron la utilización de tinciones específicas, las células oclusivas fueron arriñonadas, de tamaño similar al resto de las células epidérmicas y cada estoma presentó dos células anexas.

Las hojas procedentes del cultivo *in vitro* presentaron 70  $\mu\text{m}$  de grosor, lo cual concuerda con lo establecido por Cozza *et al.* (1997), en lo relativo a una reducción notable en el grosor de hojas cultivadas *in vitro* comparada con las procedentes de campo; en las hojas provenientes de brotes *in vitro* se observaron cuatro estratos de mesófilo; sin embargo, ninguno se diferenció en estrato en empalizada

(Figura 2); es importante considerar lo propuesto por Hernández-Domínguez *et al.* (1998), en el sentido de que la hoja es considerada el órgano con mayor plasticidad en la planta, y si se toma en cuenta la alta humedad relativa en condiciones *in vitro*, junto con la consideración de que el parénquima en empalizada es una respuesta a condiciones xeromórficas (Esau, 1982), entonces se puede entender la ausencia de este estrato en hojas desarrolladas *in vitro*; las células del mesófilo mostraron un mayor volumen pero con menor densidad citoplasmática (del 30 a 40 %), los espacios intercelulares fueron más grandes (40 %) pero en menor cantidad que los observados en las hojas de campo (20 a 30 %). Por otra parte, ambas epidermis presentaron células con menor crecimiento en



Figuras 1-6. Cortes transversales de hojas de vid. Fig. 1 Lámina de hoja de campo. Fig. 2. Lámina de hoja *in vitro*. Fig. 3. Lámina de hoja de campo teñida con rojo 7B para mostrar cutículas. Fig. 4 lámina de hoja *in vitro* teñida con rojo 7B para mostrar cutículas. Fig. 5 vena media de hoja de campo. Fig. 6 vena media de hoja *in vitro*. Barra para Figs. 1-4= 20  $\mu\text{m}$ . Barra para Figs. 5 y 6= 100  $\mu\text{m}$ ; ab: epidermis abaxial ad: epidermis adaxial e: estoma Em: capa en empalizada; HV: haz vascular colateral de la vena media.

sentido anticlinal (menos cuboidales) y ambas cutículas son evidentes, aunque más delgadas (50-60 %) que en la hoja de campo, la de la epidermis adaxial sigue siendo más gruesa (Figura 4), contrastando con lo citado por Fila *et al.* (1998), en lo relativo a la ausencia de cutícula en hojas *in vitro* junto con anomalías de estomas. En cuanto a las células oclusivas se observó que conservan su forma arriñonada, pero no son simétricas, una es más grande que la otra y las células anexas se observaron poco colapsadas.

Con relación a la vena media y su tejido vascular, las observaciones mostraron que en las plantas provenientes de campo (Figura 5), el tejido fundamental de la vena media estuvo formado por abundantes y grandes células de parénquima que rodean un solo haz colateral, con xilema y floema bien desarrollados. En la epidermis abaxial las células fueron más cuboidales que en la lámina; mientras que en la epidermis adaxial sólo las células centrales (en número de 12) aumentaron o disminuyeron de tamaño con respecto a las de la lámina, pero conservaron su forma cuboidal.

Las hojas provenientes del cultivo *in vitro* (Figura 6) difieren de estas primeras, ya que existió un mayor desarrollo del xilema en relación con el del floema, pero presentaron un solo haz colateral en la vena media; existió una menor cantidad de células parénquimáticas en el tejido fundamental de la vena media, sin embargo, éstas fueron de mayor volumen y sus paredes, aunque celulósicas, fueron más gruesas y la mayoría de las células estuvieron colapsadas. La superficie de la epidermis abaxial se presentó irregular (no lisa) debido a tamaño y la forma desigual de las células epidérmicas.

Los estomas siempre se presentaron sólo en la superficie abaxial de la hoja, con una densidad promedio para la hoja procedente de campo de 150 (desviación estándar = 14) estomas por mm<sup>2</sup>, y para las hojas procedentes del cultivo *in vitro* fue de 200 (desviación estándar = 16) estomas por mm<sup>2</sup>, contrario a lo señalado por Cozza *et al.* (1997), quienes encontraron la menor densidad estomática en plantas cultivadas *in vitro* y esto puede ser determinante para la supervivencia en la aclimatación de esta especie.

## CONCLUSIONES

Las hojas de vid desarrolladas el cultivo *in vitro* no desarrollaron parénquima en empalizada, pero las hojas provenientes de campo sí lo presentaron. Las hojas de vid procedentes del cultivo *in vitro* presentaron menor número de estratos de mesófilo y menor grosor total de la hoja, que las hojas de campo. La cutícula es más delgada en hojas provenientes del cultivo *in vitro* que en hojas desarrolladas en campo, pero en ambas estuvo presente sobre las dos epidermis. Las hojas de brotes cultivados *in vitro* presentaron una mayor densidad estomática que las hojas de campo.

## LITERATURA CITADA

- COZZA, R.; TURCO, D.; BITONTI, M. B. 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 51: 215-223.
- ESAU, K. 1982. Anatomy of Seed Plants. Ed. John Wiley & Sons. New York. USA. pp. 299-323.
- FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Hort. 28: 331-337.
- FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. Physiol. Plant. 102: 411-418.
- HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E.; MAUST, B.; SANTAMARÍA, J. 1998. Efecto de diferentes fuentes carbonadas sobre la capacidad fotosintética de *Tagetes erecta* cultivada *in vitro*. In memories of 3rd. Latin-American Meeting on Plant Biotechnology. La Habana, Cuba. pp. 149.
- LARREA, R. A. 1980. Viticultura Básica. Ed. Aedos. Barcelona. España. pp. 22-26.
- LESHEM, B. 1983. Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. Ann. Bot. 52: 413-415.
- LLOYD, G.; Mc. COWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- REYNIER, P. 1989. Manual de Viticultura. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. pp. 96-105.
- SASS, J. E. 1968. Botanical Microtechnique. 3rd. Edition. The Iowa State University Press. Iowa, USA. 227 p.
- WEAVER, J. R. 1981. El Cultivo de la Uva. Trad. Marino, A. A. Ed. Continental Madrid, España. pp. 30-36.