

ESTUDIO HISTOLOGICO EN CALLOS DE PEJIBAYE (*Guilielma gasipaes*)^{1/*}

Roberto Valverde **
Oscar Arias **
Trevor Thorpe ***

ABSTRACT

Histological studies on calli of pejibaye palm (*Guilielma gasipaes*). Shoot tip explants of pejibaye palm were cultured in a modified MS (1962) medium, supplemented with 2,4-D and BAP. After 8 weeks under dark conditions the shoot apex gave rise to callus formation, but 4 weeks later the calli were totally oxidated. They were then transferred into the same medium but devoid of growth regulators and placed in a lighted area. Calli grew on the brown ones but plant regeneration was not obtained. The calli were then processed for histological study. Transverse sections showed many meristematic areas, also vascular tissue in non-continuous bundles. Conspicuous was the presence of lignified tissues. It was concluded that the loss of callus regeneration potential could be associated with an early sclerotization process.

INTRODUCCION

Los usos del pejibaye, así como su manejo agronómico, han sido ampliamente documentados por Mora (1983), quien también incluye aspectos sobre la reproducción asexual de esta palma. Sin embargo, este sistema ha sido poco exitoso, ya que la separación de los tallos basales ("hijos") es difícil y la cantidad que logra sobrevivir en el campo es baja.

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* son una alternativa en la reproducción vegetativa de esta y otras palmas de interés comercial (Paranjothy y Othman, 1982; Reynolds, 1981; Brackpool *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1987b; Arias y Huete, 1983).

Los procesos morfogénéticos por los que se logra la propagación *in vitro* son variables; entre ellos se encuentran la embriogénesis somática y la organogénesis, procesos que han sido descritos por varios autores (George y Sherrington, 1984).

En muchos casos, cuando se induce la formación de callo para su posterior diferenciación hacia la formación de plántulas, esto no ocurre. Sin embargo, no se sabe si el proceso se inició y no pudo continuar o si nunca ocurrió. Por esta razón, el análisis histológico de los tejidos se convierte en una herramienta de gran utilidad para dar respuesta a estas interrogantes.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar, histológicamente, los callos de pejibaye obtenidos a partir de ápices caulinares, para comprender los procesos que ocurren durante la morfogénesis.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó ápices caulinares de plántulas de pejibaye de 16 semanas, que crecieron en vivero en condiciones de campo. Luego de la desinfección se disectaron para obtener el ápice caulinar,

1/ Recibido para publicación el 28 de octubre de 1991.

* Esta investigación se llevó a cabo con la ayuda de una subvención otorgada por el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa, Canadá.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

*** Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, The University of Calgary. Alberta, Canadá.

el cual se cultivó en el medio básico de Murashige y Skoog (1962), suplementado con agua de coco al 15%, 30 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 5 mg/L de 6 BAP (N^6 benciladenina) y con 0,4 mg/L de tiamina, tal como recomienda Tisserat (1979).

El medio de cultivo fue renovado cada 4 semanas. Al cabo de 12 semanas los callos se transfirieron al mismo medio, pero desprovisto de reguladores de crecimiento y bajo condiciones de luz, donde se mantuvieron por 16 semanas, con la misma frecuencia de renovación del medio. Luego se fijaron en una mezcla de formaldehído (2%) y gluteraldehído (2%) preparada en una solución 0,05 M de amortiguador de fosfatos, con pH 6,8. Los tejidos fueron mantenidos en el fijador por 48 h, después de las cuales se procedió a la deshidratación en metilcelosolve por 24 h, seguido por 2 cambios de 24 h cada uno en alcohol absoluto. Posteriormente, se inició la serie de deshidratación con alcohol butílico terciario (TBA) para finalizar con TBA absoluto. Deshidratados los tejidos, se llevó a cabo la infiltración con Paraplast Plus, en una estufa a 56°C. El seccionamiento se realizó con un microtomo rotatorio y el grosor de los cortes fue de 5 micras. La tinción se realizó con safranina y verde rápido, de acuerdo con la metodología descrita por Yeung (1984).

RESULTADOS

Al cabo de 8 semanas de cultivo se obtuvo 2 tipos de callo que variaron en forma y textura. Sin embargo, la mayoría tuvo en promedio 0,8 cm de diámetro y apariencia compacta.

Aún cuando el crecimiento inicial de los callos ocurre en la oscuridad (Valverde *et al.*, 1987a) se observó una fuerte oxidación de éstos, por lo que fueron transferidos a un medio fresco, tal como se describió anteriormente (Valverde *et al.*, 1987b). Sobre el tejido oxidado se formó un nuevo callo, esta vez de color cremoso y de textura friable (Figura 1).

Al realizar los cortes transversales de cada uno de los 2 tipos de callo, se observó en los compactos que se formaron al inicio, tejido oxidado en la periferia (Figura 2). Hacia adentro y sólo en algunas zonas, se encontró una gran cantidad de sustancias ergásticas cristalinas, tipo rafidio (oxalato de calcio), luego el tejido vascular organizado



Fig. 1. Desarrollo de callos en el medio de Murashige y Skoog.

en una banda discontinua y en la región central del callo, tejido parenquimático en un arreglo laxo.

A las 24 semanas el nuevo callo había crecido hasta alcanzar aproximadamente 3 cm de ancho por 1 cm de alto, pero no se observó ningún proceso de diferenciación en él, por lo que a las 28 semanas se recurrió a su estudio histológico, utilizando para ello cortes transversales. La Figura 3 muestra el aspecto general del callo donde se observan los diferentes tipos de células, el estado de división y la orientación de éstas.

La división de las células epidérmicas y subepidérmicas es anticlinal centrípeta, formando así células alargadas que luego siguen su proceso de división bajo el mismo patrón, hasta formar líneas en cuyas células tienen lugar divisiones periclinales. Las células producto de estas divisiones se dividen a su vez en diferentes planos y forman los primordios foliares.

Cerca de los primordios no sólo hay bandas procambiales sino también elementos traqueales y elementos cribosos, acompañados por células con paredes muy lignificadas (Figura 4).

DISCUSION

Como lo informan Arias y Huete (1983) 2,4-D tiene un efecto estimulador en la formación de callo en pejobaye. Sin embargo, se desconoce



Fig. 2. Corte transversal de un callo compacto N (callo nuevo), O (oxidación), R (rafidios), V (tejido vascular), C (callo) (32 X).

Fig. 3. Sección del callo mostrando centros de origen organogénico (400 X).

Fig. 4. Tejido vascular diferenciado (400 X).

el motivo por el cual el crecimiento de éste cesa y el tejido se oxida aún bajo condiciones de oscuridad. Los cambios sucesivos de medio (cada 4 semanas) no disminuyen el proceso de oxidación. Este dato concuerda con las observaciones de Stein (1988), aunque en otros trabajos (Salazar, 1986) se informa de tiempos superiores a las 15

semanas para transferir los tejidos a un medio fresco. Otra explicación al fenómeno descrito sugiere que el 2,4-D en la dosis de 30 mg/L induce la formación de callo. Sin embargo, al cabo de 8 semanas tal concentración resulta tóxica o inhibitoria, pues se ha observado que cuando los tejidos se colocaron en un medio fresco y desprovisto de fitoreguladores, hubo un nuevo crecimiento de callo sobre el tejido oxidado. También, con referencia a la oxidación por causa de los reguladores, Salazar (1986), que trabajó con dosis de 2,4-D de 0 hasta 100 mg/L, encontró que la mayor oxidación ocurre en dosis inferiores a 10 mg/L. A concentraciones mayores no se presenta oxidación sea en condiciones de luz u oscuridad. Stein (1988) utilizó las mismas dosis de 2,4-D y no observó problemas de oxidación en ninguna de las concentraciones. Sin embargo, la autora indica que cuando se usan altas cantidades de 2,4-D y no se adiciona carbón activado al medio, el regulador resulta tóxico y el tejido muere.

En la presente investigación, aunque no se empleó carbón activado, la concentración de 2,4-D fue apenas de 30 mg/L, lo que explica que el tejido no haya muerto y por el contrario produjera un nuevo callo cuando se puso en un medio fresco y desprovisto de reguladores de crecimiento.

A nivel histológico, la diferencia entre los 2 tipos de callo es clara; uno compacto, con tejido oxidado y gran cantidad de oxalato de calcio y sin potencial de producción de estructuras organizadas. El otro, friable y cremoso, formado sobre el tejido oxidado del anterior, con estructuras organizadas pero que no logran desarrollarse, debido posiblemente, a que ha ocurrido una esclerotización temprana, lo cual limita su potencial de regeneración y su crecimiento.

La evidencia de este proceso de esclerotización en que las células de parénquima se lignifican, se encuentra en la aparición de elementos traqueales y elementos cribosos maduros, acompañados de gran cantidad de fibras (Figura 4). Flores (1989) informa que existe una gran relación entre la concentración de auxina y la esclerotización, según la cual la lignificación es menor con bajas concentraciones de auxina. También ocurre lignificación cuando los medios de cultivo contienen altas concentraciones de sacarosa, o bien dosis normales pero en mezcla con manitol.

La presencia de este tipo de estructuras, propias de tejidos maduros, limita el transporte de sustancias nutritivas del medio de cultivo a

muchas áreas del callo, dado que en los tejidos que se cultivan *in vitro* es característica la ausencia de plasmodesmos, debido a que son básicamente heterótrofos. Por esta razón, en la mayoría de las plantas es necesaria una fase de endurecimiento antes de pasar a condiciones no estériles, con el fin de estimular una actividad autotrófica que asegure su sobrevivencia en el invernadero.

Finalmente, se puede concluir que existen varias explicaciones con respecto a la formación del nuevo callo y su potencial morfogénico, como ocurre en numerosas especies, cuando los callos pasan de la oscuridad a la luz. Entonces, su crecimiento se detiene debido a que las células son sensibilizadas a ésta por ciertas auxinas como el 2,4-D (George y Sherrington, 1984), de forma tal que no hay crecimiento. Si lo hay, se debe a los remanentes endógenos del fitoregulator. Aún así, el proceso de diferenciación no ocurre. Lo anterior, unido a que el callo nuevo se produjo sobre uno oxidado, explica aún más la falta de respuesta, pues el incremento en sustancias fenólicas interfiere con la actividad de los reguladores. Esto lleva finalmente a un proceso de "envejecimiento", caracterizado por una esclerotización temprana, la cual sucede posiblemente por la permanencia prolongada del tejido en el medio de cultivo. Esto a su vez induce una posterior habituación del tejido a las condiciones *in vitro*, sin que sea posible la regeneración de plantas a partir de los callos, los que pueden permanecer en esta situación casi indefinidamente. Este proceso también ha sido observado en otras palmas de interés comercial como *Elaeis guineensis* y *Eutherpe* sp. (George y Sherrington, 1984).

RESUMEN

Apices caulinares de pejibaye fueron cultivados en un medio modificado de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2,4-D y BAP. Después de 8 semanas de cultivo en condiciones de oscuridad dio inicio la formación de callo. A las 12 semanas los callos estaban oxidados en su totalidad; fueron transferidos a un medio sin reguladores y colocados a la luz, donde, sobre el tejido oxidado, creció un nuevo callo. Este se mantuvo en cultivo hasta las 28 semanas, sin que ocurriera la regeneración de plantas, por lo que se procedió a su estudio histológico. Los cortes en sección transversal mostraron áreas meriste-

máticas, tejido vascular en bandas discontinuas y la presencia de tejido lignificado.

Es posible concluir que una esclerotización temprana fue la causa de que los callos perdieran su potencial de regeneración.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la Dra. Eugenia Flores su aporte en la revisión del presente trabajo, así como sus comentarios, siempre acertados.

LITERATURA CITADA

- ARIAS, O.; HUETE, F. 1983. propagación vegetativa *in vitro* del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Turrialba 33(2):103-108.
- BRACKPOOL, A.; BRANTON, R; BLAKE, J. 1986. Regeneration in palms. *In* Cell Culture and Somatic Cell genetics of plants. Ed. by I. Vasil. New York, Academic Press. v.3, p. 207-222.
- FLORES, E. 1989. La planta: estructura y función. 1ª ed. San José, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
- GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. England. Exegetics. 709p.
- MORA, J. 1983. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): origen, biología floral y manejo agronómico. 1ª ed. Palmeras poco utilizadas en América tropical. Informe de la Reunión de consulta FAO-CATIE. San José, Costa Rica. 172p.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-487.
- PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. *In* Plant Tissue Culture. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo. p. 747-748.
- REYNOLDS, J. 1981. Asexual embryogenesis in callus derived from palm inflorescences. *Environmental and Experimental Botany* 21 (3/4):436.
- SALAZAR, S. 1986. The effect of 2,4-D, light and activated charcoal on offshoot culture of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). M.Sc. Thesis. Birmingham, U.K., University of Birmingham. 71p.
- STEIN, K. 1988. *In vitro* culture of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). M.Sc. Thesis. Iowa, EE.UU., Iowa State University. 187p.

- TISSERAT, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Experimental Botany* 30(119):1275-1283.
- VALVERDE, R.; GOMEZ, L.; ARIAS, O.; THORPE, T. 1987a. Respuesta morfogénica de los ápices de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados *in vitro* en condiciones de luz y oscuridad. *Agronomía Costarricense* 11(1):97-102.
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. 1987b. Picloram induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 10(2):149-156.
- YEUNG, E. 1984. Histological and histochemical staining procedures. *In* *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*. Vol.1. Laboratory Procedures and their Applications. Ed. by I. Vasil. Academic Press. p. 689-697.