

DETERMINACIÓN HISTOLÓGICA DE REGENERANTES DE *EUCHILE MARIAE* (AMES) WITHNER, (ORCHIDACEAE), OBTENIDOS A PARTIR DE PROTOCORMOS CULTIVADOS *IN VITRO*

IRIS SUÁREZ-QUIJADA^{1,2}, ESTELA SANDOVAL-ZAPOTITLA^{1,3},
MABEL HERNÁNDEZ-ALTAMIRANO¹ & VÍCTOR M. CHÁVEZ-ÁVILA¹

¹Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-614,
México D. F. 04510, México.

Authors for correspondence: ²iris_suarez82@yahoo.com.mx, ³esz@ibiologia.unam.mx

ABSTRACT. From the germination of seeds of *Euchile mariae* in modified MS medium, the formation of protocorms was achieved. Once these reached an average size from 2 to 5 mm long and the formation of his first leaf primordium, they were used like explants to induce a morphogenetic response. Through *in vitro* culture of top and bottom protocorms sections, were obtained differentiated structures from asexual origin. Their morphology was similar to protocorms obtained from the germination of seeds, in this way we call them protocorm like bodies (PLB's). Through of the histological analysis of these structures it was possible to reveal that these PLB's turned out to be somatic embryos. The histochemical tests demonstrate the presence of cellular contents like: proteins, lipids and starch; both in the cells of the embryos as well as in the cells of initial tissues.

PALABRAS CLAVE: orquídeas, cultivo de tejidos, protocormos, embriogénesis somática, histología, histoquímica

Introducción

Euchile mariae (Ames), Withner es una de las orquídeas endémicas de México que en la actualidad se encuentra catalogada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) como una especie amenazada (SEMARNAT 2002). Se distribuye en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro, Puebla y Veracruz, en México, a una altitud de 800 a 1350 metros sobre el nivel del mar (Soto 2002). Es una especie epífita apreciada como ornamental, motivo por el cual ha sido colectada de manera excesiva e ilegal y aunado a esto ha habido una disminución de sus poblaciones silvestres por la destrucción constante de su hábitat.

Los patrones de desarrollo en las plantas han sido estudiados a través de la interpretación histológica de su estructura, topografía y arquitectura del desarrollo llegando a establecerse una caracterización anatómica de sus tejidos y estructuras que presentan las plantas desde su embriogénesis, organogénesis hasta su conformación en una planta reproductivamente madura caracterizando cada una de estas etapas y conociendo las modificaciones o cambios en los contenidos celu-

lares durante estos procesos de desarrollo. Esto es posible a partir de la aplicación de diversas técnicas histológicas e histoquímicas. Las técnicas histológicas hoy en día son muy utilizadas en el cultivo *in vitro* para la determinación de la vía de desarrollo de los regenerantes, lo cual es de suma importancia para el entendimiento de los sistemas *in vitro* (Yeung 1999). Sin la aplicación de estas técnicas, resulta imposible determinar con certeza la vía de desarrollo obtenida. Por otro lado, resulta difícil especular acerca de la respuesta posible de un explante sin el conocimiento previo de las características de las células involucradas en el proceso regenerativo.

El propósito de este trabajo fue determinar la identidad de los regenerantes formados a partir de secciones apicales y basales de protocormos cultivadas *in vitro*, así como conocer los procesos de desarrollo que se llevaron a cabo.

Materiales y método

Se fijaron en Navashin muestras de los regenerantes formados de las secciones apicales y basales de protocormos a los 35, 65 y 120 días de su cultivo *in*

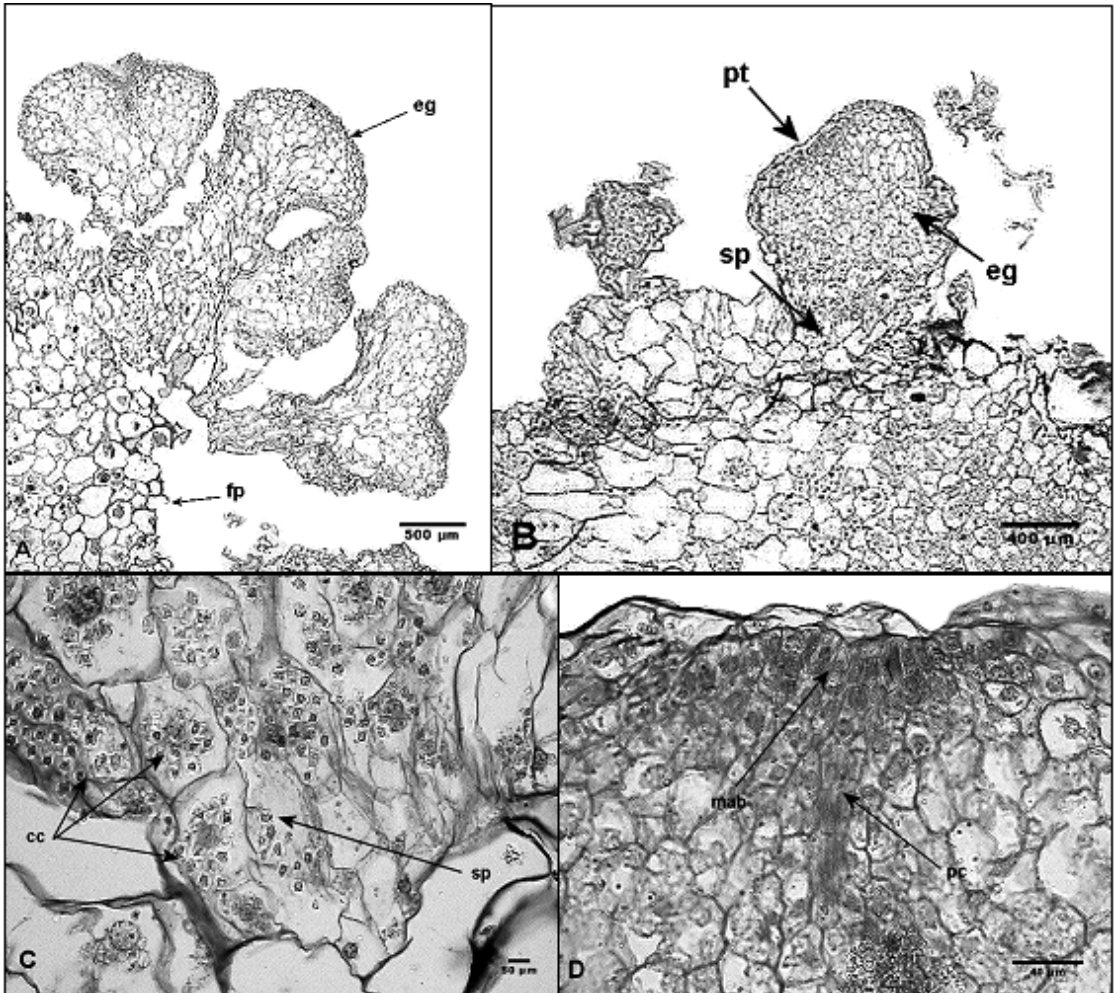


FIGURA 1. Secciones longitudinales de estructuras globulares, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos de *Euchile mariae* en medio MS modificado. **A)** Formación de estructuras globulares a partir de las células epidérmicas del tejido inicial. **B)** Formación de protodermis hacia la periferia y del suspensor hacia la zona basal. **C)** Suspensor y contenidos celulares. **D)** Formación del meristemo apical de brote y diferenciación del procambium. Fotomicrografías tomadas por la M. en C. Estela Sandoval Zapotitla. *Abreviaturas:* fp = fracción protocormo, eg = estructura globular, pt = protodermis, sp = suspensor, cc = contenidos celulares, mab = meristemo apical de brote, pc = procambium.

in vitro en medio MS modificado (Murashige & Skoog 1962). A través de las técnicas histológicas convencionales, se procesaron estas muestras deshidratando en series graduales de agua-alcohol etílico-alcohol butílico terciario (ABT), en las siguientes concentraciones: 35%, 50%, 60%, 70%, 85%, 95% y ABT absoluto, infiltrando e incluyendo en parafina histológica (58 °C). Las secciones histológicas se realizaron con un micrótopo de rotación American Optical 820, a 5 µm de grosor. Se realizó una doble tinción con safranina-verde rápido. La toma de fotomicrografías,

así como la observación de las estructuras y tejidos se realizó con un fotomicroscopio Carl Zeiss-Axioskope. Se hicieron pruebas histoquímicas para la detección de contenidos celulares.

Resultados y discusión

La similitud morfológica de las primeras etapas del desarrollo, de las estructuras obtenidas con respecto a los protocormos de esta misma especie, nos permitió definirlos como PLB's. Mediante el análisis histológico de estas estructuras se pudo constatar que estos

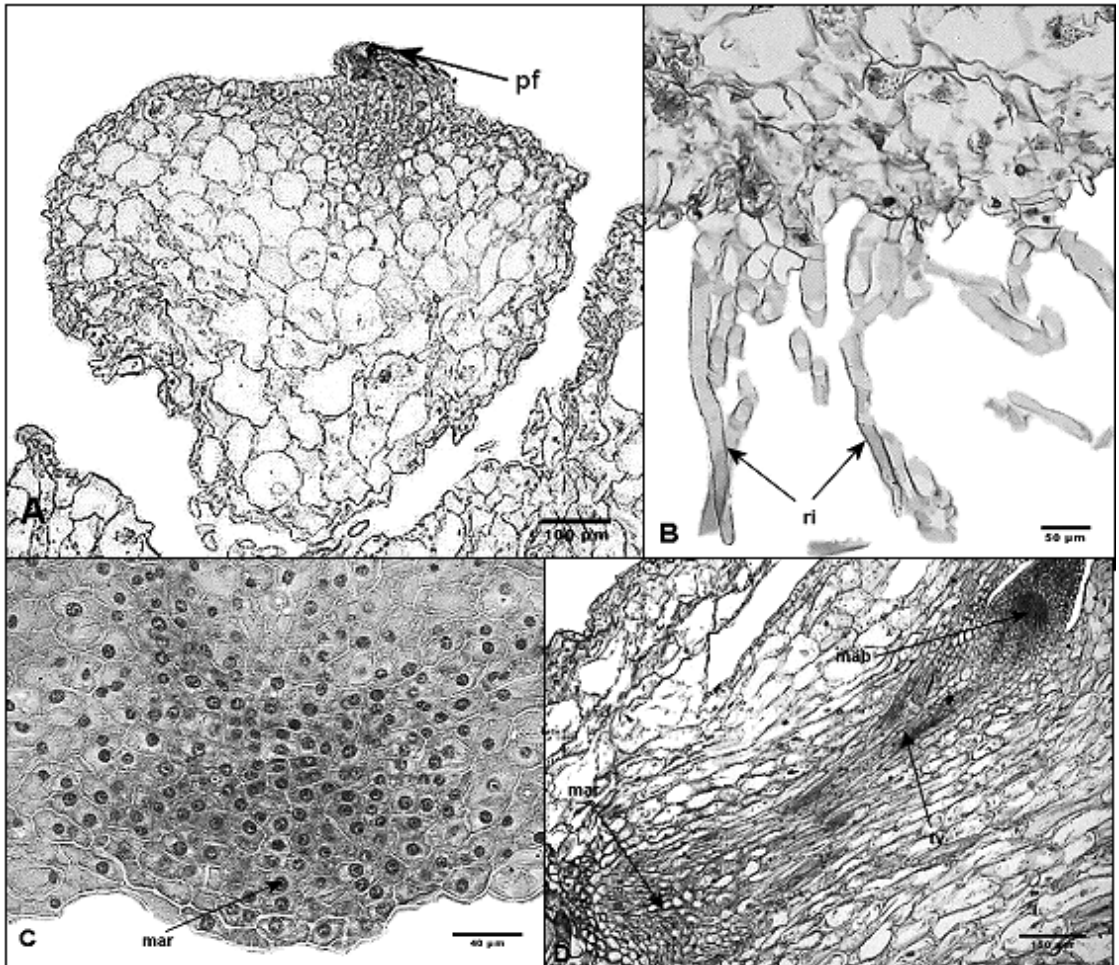


FIGURA 2. Desarrollo de plántula de *Euchile mariae*, a partir del cultivo *in vitro* de secciones de protocormos, en medio MS modificado. **A)** Formación del primer primordio foliar. **B)** Surgimiento de rizoides hacia la zona basal. **C)** Meristemo apical de raíz. **D)** Conexión del tejido vascular entre el meristemo apical de brote y el meristemo apical de raíz. Fotomicrografías tomadas por la M. en C. Estela Sandoval Zapotitla. *Abreviaturas:* pf = primordio foliar, ri = rizoides, mab = meristemo apical de brote, mar = meristemo apical de raíz, tv = tejido vascular.

PLB's resultaron ser embriones somáticos, por lo que la vía morfogenética seguida bajo las condiciones de este cultivo, fue embriogénesis somática directa.

A los 35 días de cultivo, las secciones histológicas obtenidas de los regenerantes mostraron la presencia de estructuras globulares en distintas etapas de desarrollo, que surgieron de manera directa a partir de las células epidérmicas del tejido inicial (secciones apicales y basales de protocormos) (Fig. 1A). Estos resultados concuerdan con los reportados por Morel (1974), quien al cultivar *in vitro* secciones de protocormos de *Cymbidium* en un medio nutritivo, observó la formación de nuevos protocormos a partir de la región epidérmica. Hacia la peri-

feria de las estructuras globulares identificadas, se observaron células en un estrato definido, evidenciando la formación de la protodermis y hacia la zona basal de éstas se observó un adelgazamiento y reducción de tamaño que muestra la formación del suspensor (Fig. 1B). Se encontró una polaridad de contenidos celulares, siendo éstos menos abundantes hacia la región apical y más abundantes hacia la región basal de los embriones somáticos y hacia la zona del suspensor (Fig. 1C). Hacia la región apical, se hizo evidente una zona meristemática, que corresponde al meristemo apical de brote, constituido por células pequeñas, densamente teñidas, en activa división celular y con una alta relación núcleo-

citoplasma (Fig. 1D). Posteriormente, comenzó a hacerse evidente una diferenciación celular interna como una columna central constituida por células densamente teñidas, de forma alargada lo que se define como el procámbium (Fig. 1D), el cual dará lugar a la formación del tejido vascular.

A los 65 días de cultivo, en la parte dorsal de las estructuras globulares formadas, se observó la formación de el primer primordio foliar (Fig. 2A), y hacia la región basal se observó la formación de rizoides (Fig. 2B). A los 120 días de cultivo en posición opuesta al meristemo apical de brote comenzó a evidenciarse otra zona meristemática que correspondió al meristemo apical de raíz (Fig. 2C), formado por células pequeñas, esféricas, con citoplasma denso y núcleos prominentes. Este meristemo continuó su desarrollo y dio lugar a la formación de la primera raíz. Fue posible observar la conexión del tejido vascular entre ambos meristemas formados (Fig. 2D). Muchas especies de orquídeas presentan un patrón de desarrollo similar al encontrado para *Euchile mariae*, el cual también es semejante al documentado por Nishimura (1981), para *Cattleya aurantiaca*, y por Leroux *et al.* (1995) para *Cypripedium acaule*, durante el desarrollo del embrión hasta la formación de una planta completa.

Mediante la aplicación de colorantes específicos que reaccionan y producen coloraciones determinadas, es posible reconocer microscópicamente la presencia de distintas sustancias presentes en los tejidos vegetales ya sean como metabolitos primarios, secundarios, formando parte estructural de la célula o como sustancias de reserva (Sandoval 2005). Con las pruebas histoquímicas realizadas, a los 35 días de cultivo se detectó la presencia de contenidos celulares, tales como: proteínas (azul negro de naftol), lípidos (sudán IV) y almidón (lugol); estos contenidos se encontraron al interior de las células del tejido inicial (secciones de protocormos), así como en las células de los embriones. De los tres contenidos celulares identificados en los embriones somáticos de *Euchile mariae*,

el más abundante fue el almidón, mientras que, las proteínas y lípidos se encontraron en menor cantidad.

En la presente investigación se reportan las diferentes etapas del desarrollo de los embriones somáticos obtenidos a partir de secciones apicales y basales de protocormos hasta su formación en una planta completa. Este es uno de los pocos estudios a nivel global, que determina fehacientemente la identidad de los regenerantes.

AGRADECIMIENTOS. A la M. en C. Estela Sandoval Zapotitla por la toma e interpretación de las fotomicrografías. a la Biól. Ma. Concepción Guzmán Ramos y la Biól. Bárbara Estrada Galván por su apoyo técnico.

LITERATURA CITADA

- Leroux G., D. Barabé & J. Vieth. 1995. Morphogenesis comparee de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre. *Can. J. Bot.* 73 : 1391-1406.
- Morel, G.M. 1974. Clonal multiplication of orchids. In: Withner, C. L. (ed.). *The orchids. Scientific studies.* Wiley-Interscience. USA. 604 p.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Nishimura G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (ORCHIDACEAE) seedlings. *Bot. Gaz.* 142 (3) : 360-365.
- Sandoval E.Z. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM. 278 p.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial (6 de marzo 2002). México, D.F.
- Soto A., M.A. 2002. *Euchile mariae* (Ames) Withner. In: E. Hágsater & M.A. Soto A. (eds.), *Icones Orchidacearum. Orchids of Mexico Part 2,3.* Asociación Mexicana de Orquideología. A.C. México. Lámina 584.
- Yeung, E.C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems- some practical comments. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35 : 137 – 143.

Iris Suárez Quijada es bióloga egresada de la Universidad Nacional Autónoma de México, dedicada al estudio, conservación y propagación *in vitro* de especies de orquídeas endémicas de México que se encuentran catalogadas en peligro de extinción. Sigue ligada a los programas de conservación del Jardín Botánico, del Instituto de Biología, de la UNAM. Continúa sus estudios de maestría en el Instituto de Geología de la UNAM, enfocándose al cultivo simbiótico y reintroducción de orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, en la Ciudad de México.