

Caracterización morfoanatómica foliar de piñas del Amazonas venezolano y plantas obtenidas por organogénesis *in vitro*

Leaf morphoanatomical characterization of pineapple from the Venezuelan Amazonas and plants obtained by *in vitro* organogenesis

por

ADRIANA PINEDA¹, TERESA E. VARGAS¹, MARCIA ESCALA² y EVA DE GARCÍA¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

² Laboratorio de Morfoanatomía Vegetal, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, mescala2006@gmail.com

RESUMEN

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr es un fruto tropical de gran valor económico y social. Se reproduce vegetativamente y su tasa de crecimiento es lenta. La comunidad Piaroa de Betania del Topocho en el Amazonas reproduce la piña autóctona con baja tasa de multiplicación. Este cultivo presenta problemas fitosanitarios y genéticos, por ello, no obtienen el material necesario para nuevas plantaciones. La aplicación de métodos biotecnológicos a la propagación de las variedades autóctonas de piña, permitió proveer a dicha comunidad de material clonado, limpio de patógenos para satisfacer la demanda de material vegetal y el establecimiento de nuevas plantaciones. Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados en otras investigaciones, donde se evalúan plantas micropropagadas de variedades y ecotipos de piña, utilizando el análisis morfoanatómico foliar, entre otros. En el presente estudio se comparan los patrones morfoanatómicos de plantas madres del ecotipo Tabè Känä, con los de las plantas obtenidas en el proceso de propagación *in vitro*. Una vez establecidos los patrones de tipificación y comparación entre las plantas donadoras o madres y las obtenidas durante el proceso de micropropagación, se evaluaron los efectos de las condiciones del cultivo *in vitro* sobre las plantas micropropagadas. De esta manera se comprobó que el proceso no ocasionó ninguna alteración y se verificó que se trata de modificaciones fenotípicas temporales, asociadas con las condiciones del cultivo *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: Piña, morfoanatomía, hoja, cultivo *in vitro*, vitroplantas.

ABSTRACT

The pineapple is a tropical fruit of high commercial and social value. It is produced vegetatively and it has a slow growth rate. The Piaroa community of Betania del Topocho in the Amazonas reproduces the native pineapple with a low multiplication rate. This culture presents phytosanitary and genetic problems; therefore they do not obtain the necessary material for new plantations. By means of biotechnological methods for the native pineapple varieties propagation, it was possible to supply the aforementioned community with cloned pathogen-free material to meet the demand of vegetal material and set the establishment of new plantations. The obtained results match other investigations, where micropropagated plants of pineapple varieties and ecotypes have been studied by means of the leaf morphoanatomical analysis, among others. In this study, the Tabè Känä ecotype mother plants morphoanatomical patterns were compared with those of the plants obtained by the process of *in vitro* propagation. Being established the patterns for classification and comparison between the donors or mother plants and those obtained in micropropagation, the effects of the *in vitro* culture conditions were evaluated on the micropropagated plants. Thus, it was confirmed that the process did not produce any alterations and it was verified that it is about temporary phenotypical modifications produced by the *in vitro* culture conditions.

KEY WORDS: Pineapple, morphoanatomy, leaf, *in vitro* culture, vitroplants.

INTRODUCCION

El cultivo de la piña en Venezuela es uno de los más importantes, por la gran demanda y consumo de sus frutos. A nivel mundial, nuestro país se encuentra dentro de los principales productores, siendo la producción nacional de 452.654 toneladas métricas para el año 2016 (FAO 2016). Por esta razón, se ha desarrollado un gran interés por la investigación de métodos de propagación que aceleren la producción de propágulos para la siembra en el campo, entre los cuales cabe señalar el cultivo *in vitro* de yemas que permite mejorar sustancialmente el proceso de multiplicación. Casale y De García (1987) y García *et al.* (2008), trabajando con las variedades Española Roja, Brecheche y Nacional, y Saucedo *et al.* (2008) en Puerto Rico, trabajando con las variedades Hawaiana y Champaka lograron la supresión de latencia de yemas axilares de plantas adultas, utilizando los mismos reguladores de crecimiento a una proporción de 4:1 auxina: citoquinina. En otras investigaciones se encontraron algunas variedades como la Queen Australia quien requería para la brotación concentraciones de citocininas 100 veces mayor que las de auxinas (Mogollón *et al.* 2004). García *et al.* (2008) obtuvieron altas tasas de multiplicación de brotes de piña Española Roja, utilizando concentraciones iguales de auxinas y citocininas en un sistema de inmersión temporal. En esta misma línea de investigación, Pineda *et al.* (2012), Pineda *et al.* (2014) y Blanco *et al.* (2017) establecen el proceso de la organogénesis para la clonación de plantas de Española Roja y de los ecotipos Tabë Känä y Gobernadora, estos dos últimos provenientes del Amazonas y utilizan para ello, secciones de hojas de la planta en el establecimiento del sistema de propagación, lo cual permite una mayor eficiencia del método.

Previamente a la micropropagación, se debe realizar la caracterización morfoanatómica de la hoja de las plantas madres o donadoras del explante, con el propósito de determinar posibles indicadores morfoanatómicos que permitan evaluar la homogeneidad de las plantas que se obtengan en dicho proceso Brito *et al.* (2016). En este orden de ideas, Pineda *et al.* (2012) también evalúan para la variedad Española Roja la existencia de posibles variaciones morfoanatómicas presentes en la estructura foliar de la población clonal obtenida mediante el proceso organogénico, con base en estudios realizados por Santa Cruz *et al.* (2006) y Hazarika (2006) quienes reportan algunas alteraciones en las plantas durante el cultivo. En el presente trabajo, es nuestro interés, complementar los estudios antes mencionados, mediante la caracterización morfoanatómica de la hoja de plantas del ecotipo Tabë Känä, obtenidas por el mismo proceso organogénico. Se comparan éstas, con las plantas donadoras de los explantes (plantas madres) y se determina, si se producen variaciones en la estructura foliar de la población clonal, como consecuencia de las condiciones del cultivo *in vitro*. Además, mediante la aplicación de los métodos de micropropagación se logra proporcionar a la comunidad indígena de plantas libres de patógenos, de mejor calidad y en mayor número en comparación a la multiplicación tradicional, las cuales pueden ser utilizadas para la producción de frutos destinados a la comercialización.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de los posibles cambios en la morfoanatomía de las hojas de plantas obtenidas por organogénesis *in vitro*, se realizó mediante una comparación de los caracteres cualitativos

con mayor valor diagnóstico de acuerdo con la metodología convencional y la bibliografía consultada. Los caracteres morfoanatómicos evaluados fueron: coloración de la hoja, presencia de espinas en el borde, presencia de escamas peltadas, grosor de la cutícula, epidermis, hipodermis mecánica, parénquima acuífero, presencia de cristales de tipo rafidio, tipos de haces vasculares, presencia de casquetes de esclerénquima en éstos, aerénquima, número de fibras extra vasculares.

MATERIAL VEGETAL

Se seleccionaron hojas de plantas de Tabë Känä creciendo en diferentes condiciones de cultivo: **a)** hojas de plantas madres mantenidas en vivero (a los 12 meses de cultivo), **b)** hojas de las plantas madres obtenidas por inducción de yemas pre-existentes *in vitro* y mantenidas *in vitro* (a los 8 meses de cultivo), **c)** hojas de las plantas hijas obtenidas por organogénesis y mantenidas *ex vitro* (a los 8 meses de cultivo) y **d)** hojas de las plantas hijas obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro* (a los 8 meses de cultivo). Se tomó aleatoriamente una hoja de tres plantas creciendo en cada una de las condiciones de cultivo. Se realizaron cortes a mano alzada y se verificó en la totalidad de éstos, la homogeneidad de las características observadas, dichos cortes fueron coloreados con azul de toluidina en solución acuosa al 1% y fijados en glicerina al 50%, siguiendo el protocolo de Roth (1964).

La morfología externa fue observada en un microscopio estereoscópico marca Zeiss KL1500, mientras que los cortes anatómicos fueron observados a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2 y un microscopio óptico con luz polarizada marca Nikon OPTIPHOT; se tomaron fotografías en cada caso

con una cámara digital CASIO EXILIM de 8.1 Mp acoplada a los mismos. El cálculo del aumento total de las fotografías fue realizado mediante la multiplicación del aumento del objetivo por el aumento del ocular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PLANTAS DE TABË KÄNÄ EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

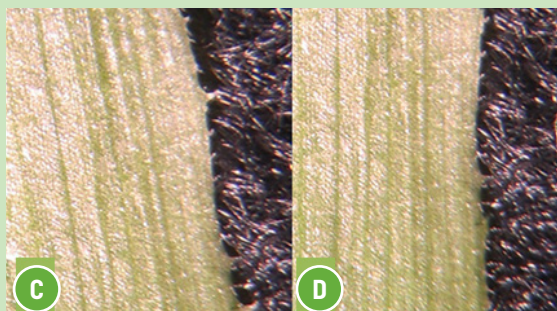
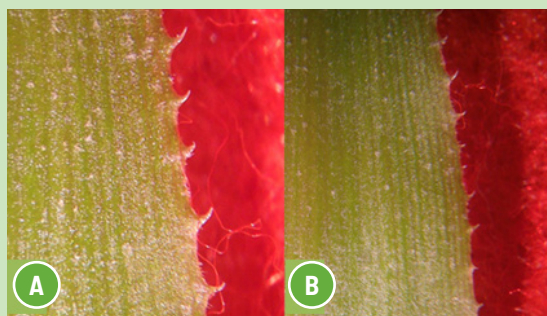
Los caracteres morfológicos y anatómicos cualitativos evaluados se presentan en el CUADRO 1. En éste se puede verificar al comparar la morfología y anatomía de la hoja de las plantas madres y de las plantas regeneradas, que existen algunas diferencias importantes entre ellas. Una de éstas, es la observación del color de la lámina el cual varía de intensidad, siendo verde intenso en las hojas de las plantas madres *ex vitro* e *in vitro* y verde pálido en las hojas de las plantas hijas, tanto *ex vitro* como *in vitro*.

En la FIGURA 1 también se muestra la morfología de las hojas de Tabë Känä, las cuales presentaron hojas con color verde y márgenes espinosos de tamaño variable en todas las condiciones, tanto *in vitro* como *ex vitro*, incluso en un estado de desarrollo temprano. Estos resultados contrastan con lo reportado para Española Roja, que bajo las mismas condiciones de cultivo descritas en este trabajo, presentan hojas con antocianinas solo en la planta madre *ex vitro* y márgenes con espinas en las hojas de las plantas en las diferentes condiciones de cultivo, excepto en las de las hojas de las plantas hijas obtenidas por organogénesis *in vitro* (Pineda *et al.* 2012).

Observando comparativamente algunos aspectos de la estructura foliar de las plantas en

CUADRO 1. Caracterización morfológica y anatómica de hojas de plantas de Tabē Kānā en diferentes condiciones de cultivo.

CARÁCTER		MATERIAL EXAMINADO			
		MADRE EX VITRO	MADRE IN VITRO	HIJA EX VITRO	HIJA IN VITRO
Lámina	Color				
	Verde intenso	+	-	-	-
	Verde pálido	-	-	+	+
Epidermis	Borde con espinas	+	+	+	+
	Escamas peltadas	+	+	+	+
	Cutícula gruesa	+	-	-	-
	Estomas epidermis inferior	+	+	+	+
	Estomas indiferenciados	-	+	+	+
Hipodermis	Hpodermis acuifera	+	+	+	+
	Hipodermis mecánica	+	-	-	-
Parénquima acuífero	Heterogéneo	+	-	-	-
	Cristales tipo rafidio	+	+	+	+
Aerénquima	Presencia	+	-	-	-
Haz vascular	Heterogéneo	+	-	-	-
	Homogéneo	-	+	+	+
	Casquetes de fibras	+	+	-	-
Fibras extravasculares	Dos filas	+	-	-	-

**FIGURA 1.**

Hojas de plantas de Tabē Kānā:

- A)** Planta madre *ex vitro*,
- B)** Planta madre *in vitro*,
- C)** Planta hija *ex vitro*,
- D)** Planta hija *in vitro* (10X).

las diferentes condiciones de cultivo (**CUADRO 1 y FIGURAS 2 y 3**), específicamente podemos destacar la epidermis inferior con cutícula engrosada en la planta madre *ex vitro*, mientras que bajo las otras condiciones, las plantas presentan una cutícula delgada. La hipodermis superior e inferior consiste de células redondeadas con paredes delgadas en todas las plantas, excepto en la planta madre *ex vitro* donde se observa una hipodermis mecánica con paredes engrosadas en ambas epidermis, una hipodermis acuífera y un parénquima acuífero mucho más desarrollado. Seguidamente, se observa el clorénquima con haces vasculares y se destaca la ausencia de casquetes de esclerénquima y la poca diferenciación de estos haces en las plantas *in vitro*. En plantas mantenidas *in vitro* de *Ananas comosus*

cv. Perola, también se reporta la presencia de una hipodermis acuífera menos pronunciada y un mayor desarrollo en las plantas *ex vitro* (Santa Cruz *et al.* 2006). En el trabajo de Pineda *et al.* (2012) se señala que la presencia de hipodermis y parénquima acuífero, es un carácter fijado genéticamente que además muestra plasticidad fenotípica en el número de capas y tipos celulares. Es posible que el poco desarrollo de la hipodermis acuífera de las plantas *in vitro*, sea efecto de las condiciones de cultivo con iluminación controlada en comparación con las condiciones de vivero de las plantas madres. La presencia de hipodermis acuífera en las hojas de las plantas cultivadas *in vitro*, parece por otra parte, estar facilitando e incrementando la supervivencia de dichas plantas cuando son transferidas a las

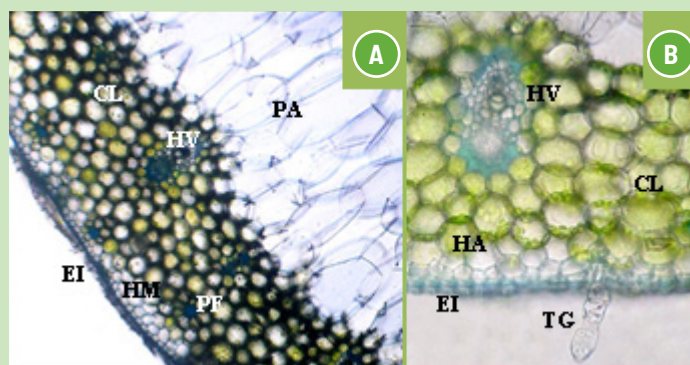


FIGURA 2.

Comparación de la anatomía de la hoja de Tabã Känä en las diferentes condiciones de cultivo:

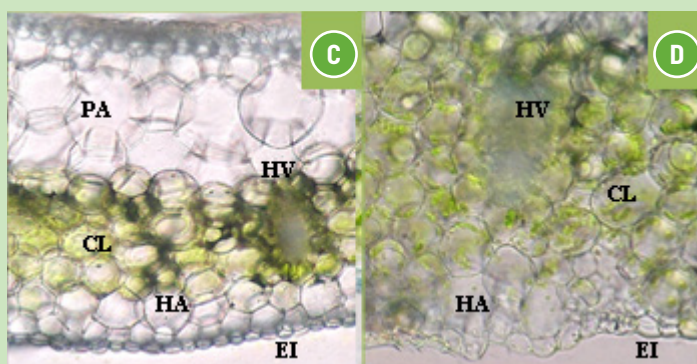
A) Planta madre *ex vitro*,

B) Planta madre *in vitro*,

C) Planta hija *ex vitro*

D) Planta hija *in vitro*, (200X).

Se observa parénquima acuífero (**PA**), clorénquima (**CL**), haz vascular (**HV**), paquetes de fibras extravasculares (**PF**), hipodermis mecánica inferior (**HM**), tricoma glandular (**TG**) y epidermis inferior (**EI**).



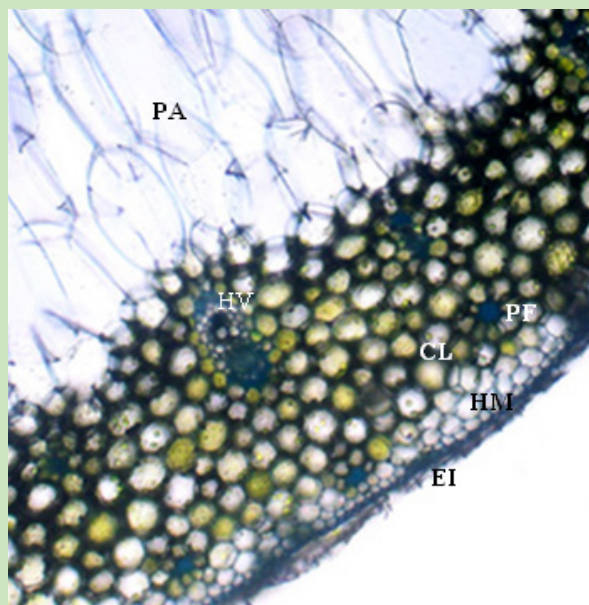


FIGURA 3.

Detalle de la anatomía de la hoja de la Planta madre *ex vitro* de Tabã Kãnã. Se observa parénquima acuífero (PA), clorénquima (CL), haz vascular (HV), paquetes de fibras extravasculares (PF), hipodermis mecánica inferior (HM) y epidermis inferior (EI) (300X).

condiciones de vivero, ya que estos tejidos permiten una importante reserva de agua y aportan succulencia favoreciendo la aclimatación de las mismas a las nuevas condiciones.

En las hojas de las plantas madres de piña, en estudio (**CUADRO 1 y FIGURA 3**) los paquetes de fibras extravasculares en conjunto con la epidermis, hipodermis mecánica y casquetes de fibras perivasculares, aumentan la rigidez de la lámina foliar ofreciendo un sostén mecánico, posiblemente como agente de protección del mesófilo durante condiciones de estrés térmico e hídrico (Krauss 1949; Pyykkö 1966; Brighigna *et al.* 1984).

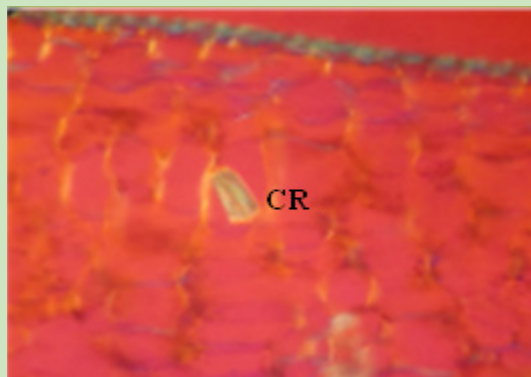
La reducción de las fibras extra y perivasculares, aparentemente es explicada por el mínimo estrés al que están sometidas las plantas de piña cultivadas *in vitro*. En el estudio realizado para el ecotipo Tabã Kãnã, las plantas mantenidas *in vitro* mostraron alteraciones anatómicas como: reducción del engrosamiento de las

paredes de células que intervienen en el sostén de la planta, presencia de tricomas glandulares, cutícula no distinguible, ausencia de acanalamiento en la epidermis inferior, reducción de las capas de hipodermis acuífera y parénquima acuífero y ausencia de aerénquima. Estas alteraciones anatómicas también fueron observadas en el cultivar de piña Española Roja (Pineda *et al.* 2012). Así mismo, Santa Cruz *et al.* (2006), evidencian ausencia de aerénquima en hojas de piña mantenidas *in vitro*. Aparentemente, las plantas de piña *in vitro* no requieren de las ventajas que ofrece el aerénquima como la flexibilidad y mayor circulación de aire en la lámina foliar, como fue sugerido por Mauseth (1988) para plantas crecidas en campo.

Proença & Sajo (2007) reportan idioblastos que contienen cristales de oxalato de calcio tipo rafidio, los cuales fueron encontrados en el parénquima acuífero de todas las especies de *Bromelia* estudiadas. Estos cristales también

FIGURA 4.

Cristales de oxalato de calcio tipo rafidio, vistos con luz polarizada en el parénquima acuífero de la hoja de Tabë Känä. Cristales tipo rafidio (CR) (200X).



observados en esta investigación, son particularmente abundantes en las hojas de las plantas cultivadas *in vitro*, lo cual puede corresponderse a la composición del medio de cultivo, el cual es rico en minerales como el calcio (**CUADRO 1 y FIGURA 4**). Tomlinson (1969), Sousa *et al.* (2005), Proença & Sajo (2007) y Pineda *et al.* (2012), reportan que dichos cristales pueden tener carácter diagnóstico para la familia Bromeliaceae.

También es interesante destacar la importancia de las escamas peltadas para este grupo de plantas, según Tomlinson (1969), las escamas peltadas representan una variación natural distintiva para la familia Bromeliaceae. Tales estructuras fueron encontradas en las plantas de todas las condiciones estudiadas (**CUADRO 1**).

En diferentes investigaciones, se ha reportado que el fenotipo de las plantas que crecen en condiciones *in vitro* está caracterizado por presentar, respecto a aquellas desarrolladas en ambientes *ex vitro*; tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de tejidos mecánicos de soporte, incremento de contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo

o mixótrofo (Denng & Donnelly 1993, citado en Agramonte *et al.* 1998).

En esta investigación, observamos que en todas las plantas que crecieron en condiciones de cultivo *in vitro*, se presentaron las alteraciones en el fenotipo antes mencionadas, sin embargo se pudo constatar que éstas se revirtieron completamente, una vez que fueron trasladadas a condiciones de aclimatación y vivero. En consecuencia, tal como ha sido reportado previamente, los cambios fenotípicos presentados por dichas plantas, son inducidos por las condiciones del cultivo *in vitro*, es decir, como respuesta a la ausencia de factores estresantes que sí están presentes en los viveros y en el campo (Agramonte *et al.* 1998, Hazarika 2006, Pineda *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

- El patrón anatómico foliar observado en las plantas analizadas, es en general, el típico de la familia Bromeliaceae. Sin embargo, los canales de aerénquima y paquetes de fibras extravasculares que se observan entre los haces vasculares de las plantas donadoras, están ausentes en las vitroplantas.

- Los caracteres morfoanatómicos foliares alterados en las plantas de piña obtenidas *in vitro*, se revirtieron durante el proceso de aclimatación y posterior desarrollo en condiciones de vivero. En consecuencia, se podría inferir que los cambios fenotípicos observados no se deben a variaciones genéticas estables, sino que están determinados por las condiciones del cultivo *in vitro*.
- El análisis morfoanatómico foliar constituye una herramienta que permite evaluar los efectos de las condiciones del cultivo *in vitro* sobre las plantas de piña micropropagadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAMONTE, D., F. JIMÉNEZ & M. DITA. 1998. Aclimatización. In: J. N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. *Instituto de Biotecnología de las Plantas*, Cuba, 193-206.
- BLANCO, H., T.VARGAS & E. DE GARCÍA. 2017. Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19(1): 7-20.
- BRIGHIGNA, L., A.C. FIORDI & M.R. PALANDRI. 1984. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. *Phytomorphology* 34: 191-200.
- BRITO, A., H. BLANCO, M. ESCALA, T. VARGAS & E. GARCÍA. 2016. Morfoanatomía foliar de dos ecotipos de *Ananas comosus* (L.) Merr. del Amazonas venezolano: Amarilla y Yärä Känä. *Acta Bot. Venez.* 39(2): 158-179.
- CASALE, I. & E. DE GARCÍA. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEVIV* (2). *Colombia*: 3-18.
- FAOSTAT 2016 Documento electrónico disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#/QC>
- GARCÍA, E., A. GARAY, T. VARGAS & H. BLANCO. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). *MIBE*. 5: 181-184.
- HAZARIKA, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Hort.* 108: 105-120.
- KRAUSS, B.H. 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. II-The leaf. *Botanical Gazette* 110: 333-404.
- MAUSETH, J.D. 1988. *Plant Anatomy*. California, Benjamin/Cummings Publishing Company.
- MOGOLLÓN, N., J. DÍAZ & N. HERNÁNDEZ. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". *Revista Facultad Agronomía (LUZ)*. 21 Supl. 1:15-21.
- PYYKKÖ, M. 1966. The leaf anatomy of East Patagonian xeromorphic plants. *Annales Botanici Feniici*. 3: 453-622.

- PINEDA, A., T. VARGAS, M. ESCALA & E. DE GARCÍA. 2012. Organogénesis *in vitro* en piña Española Roja y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro* 24(3): 175-186.
- PINEDA, A., T. VARGAS & E. DE GARCÍA. 2014. Regeneración de Ananas comosus (L.) Merr, ecotipo Tabë Känä, mediante organogénesis indirecta. *Bioagro* 26(3): 135-142
- PROENÇA, S. & M. SAJO. 2007. Anatomia foliar de Bromélias ocorrentes em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 21: 657-673.
- ROTH, I. 1964. *Microtecnia Vegetal*. Ediciones UCV. Imprenta Universitaria, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 96 pp.
- SANTA CRUZ, S., D. GRACIANO-RIBEIRO, J. BATISTA, T. AQUINO & L. COPATI. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de Abacaxi. *Pesq. Agrop.* Brasil, Brasília, 41: 185-194.
- SAUCEDO S.G., E.L. RAMOS, E. VARAS & F. CARMIGNIANI. 2008. Propagación clonal in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana. *Ciencia y Tecnología* (1): 49-54.
- TOMLINSON, P.B. 1969. *Comelinales - Zingiberales*. pp. 193-294. In: C.R. Metcalfe (ed.). *Anatomy of the monocotyledons: III*. Oxford, Clarendon Press.