

Estudio ultraestructural de la epidermis foliar de *Cajanus indicus* L.^{*1/} ANA M. ESPINOZA**, EUGENIA M. FLORES***

ABSTRACT

Scanning electron microscope studies on the foliar epidermis of Cajanus indicus revealed structural details not previously described. The abaxial and adaxial leaf epidermis show a single glandular and linear-cymbiform kind of trichome. Leaves are amphistomatic and have abundant stomata of anomocytic type. Ostioles are small and become reduced to the stomatic chamber. Venation is camptodromous; the areoles are polygonal-shaped and the deposition of leaf cuticle is irregular.

Introducción

CAJANUS *indicus*, conocido como gandul o frijol de palo, es una especie originaria de África que se introdujo en América después del Descubrimiento (4). Apreciada por el alto contenido proteico del frijol, esta planta es intensamente cultivada en países como la India y Puerto Rico. En algunas regiones es, además, empleada como forraje (4).

La información que encontramos acerca de la estructura foliar del gandul es bastante limitada; los estudios de Krauss (1), León (4) y Metcalfe y Chalk (5) sintetizan la información dispersa en libros de texto y en artículos referentes a esta planta.

En el presente trabajo se estudia la morfología foliar de *C. indicus*, empleando un microscopio electrónico de rastreo para tal efecto.

Materiales y métodos

El material empleado en este trabajo se colectó en la Estación Experimental Fabio Baudrit, Alajuela, y en los invernaderos de la Escuela de Fitotecnia, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, durante los meses de enero a marzo de 1977.

* Recibido para su publicación el 13 de junio de 1977.

1/ Esta investigación se llevó a cabo en el Centro de Virología y Fisiología Celular y la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

** Centro de Virología y Fisiología Celular y Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

*** Centro de Virología y Fisiología Celular y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

En la fijación y deshidratación del material se empleó el método descrito por Flores, Espinoza y Kozuka (3) para *Phaseolus vulgaris* L. Seguidamente, el material se colocó en un aparato de ultrasonido Sharp VT-52 durante 2 ó 3 segundos a fin de remover las impurezas de la superficie foliar. Los cortes se llevaron hasta el punto de secado crítico con CO₂ en una secadora Hitachi HCP-1 y luego se montaron en soportes de aluminio y pintura conductora de plata. Se usó un cobertor iónico EIKO modelo IB-3 para cubrir el material con una película de oro. En la observación microscópica se empleó un microscopio electrónico de rastreo Hitachi HHS-2R. Las fotografías se tomaron empleando película Verichrome Pan Kodak VP-120.

Resultados

Observaciones generales

Cajanus indicus es una planta anual, de cotiledones grandes, verdes y muy carnosos. La venación de los cotiledones es reticulada y la vena media se proyecta abaxialmente. En las axilas cotiledonares se observa una conspicua yema lateral con tres o cuatro primordios foliares. Los protofilos son opuestos, decusados respecto a los cotiledones, acorazonados, pubescentes, de lámina simétrica, margen entero, ápice ligeramente redondeado y venación pinnada y abierta. Las venas secundarias se curvan hacia arriba en el extremo distal pero no se fusionan. Esta venación corresponde al tipo camptódromo.

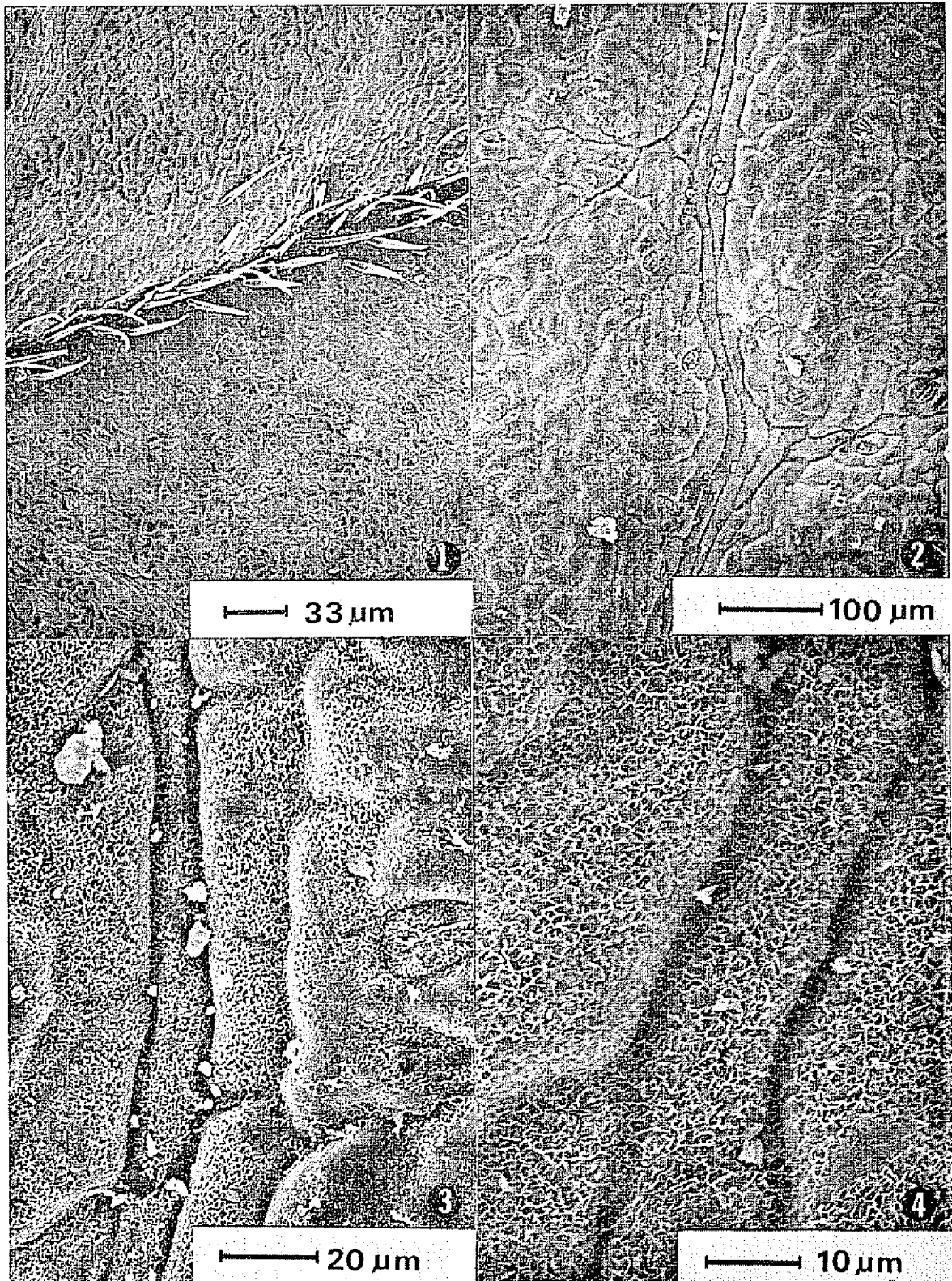


Fig. 1.—Vista de la superficie adaxial de la hoja de *Cajanus indicus*. La vena secundaria está hundida y es pubescente; las venas menores son glabras.

Fig. 2.—Vena menor, vista adaxialmente. Las células epidérmicas que la cubren son irregulares y largas.

Fig. 3.—Detalle de una vena menor en la superficie adaxial. La cutícula es gruesa, irregular y burda.

Fig. 4.—Detalle de la cutícula de la haz.

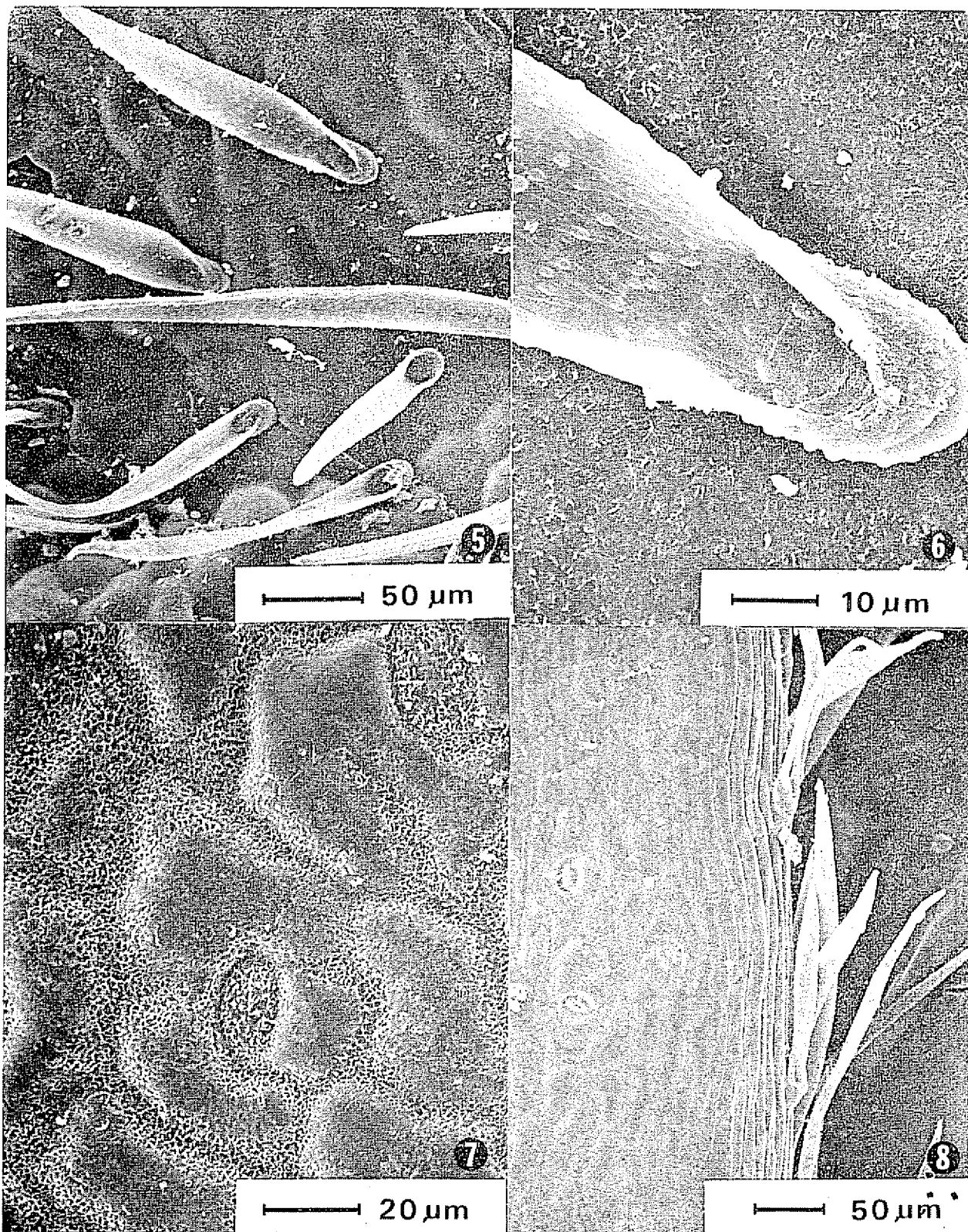


Fig. 5 —Tricomas glandulares, linca-cimbiformes de las venas y areolas

Fig. 6 —Detalle de un tricoma glandular, linca-cimbiforme mostrando retículas que cubren parcialmente su superficie y la concavidad basal

Fig. 7 —Estoma anómalo de la superficie adaxial

Fig. 8 —Borde de la lámina poblado de tricomas linca-cimbiformes

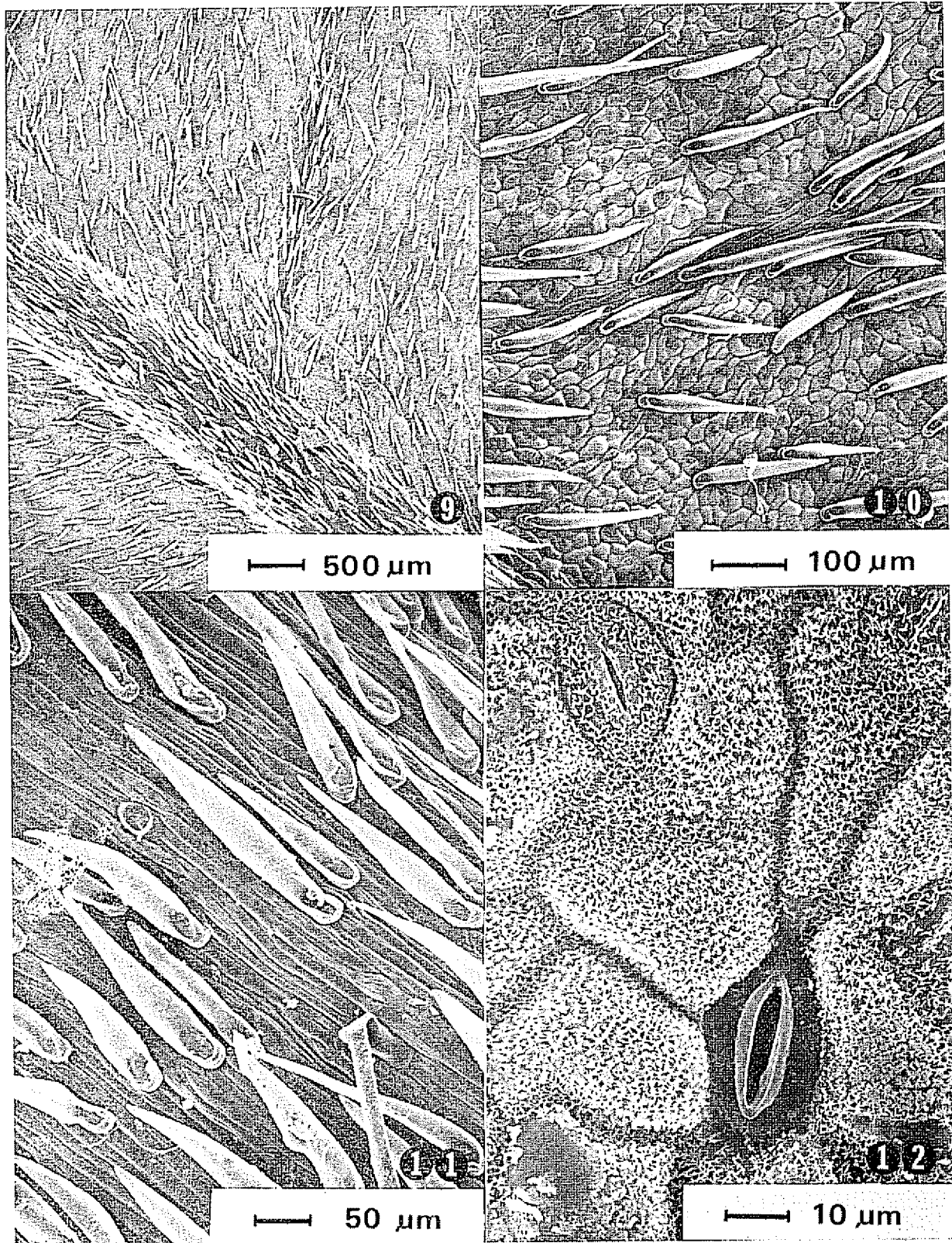


Fig 9 —Vista abaxial de la vena media

Fig 10 —Distribución de las tricomas linear-cimbiiformes en el envés.

Fig 11 —Detalle de las células epidérmicas sobre la vena (vista abaxial)

Fig 12 —Estomas anomocíticos localizados en el envés

de Troll (7) El pecíolo es acanalado, pulvinado y estipulado; las estípulas son largas, angostas, verdes y pubescentes. El primer par de metafílos es opuesto, trifoliado y presenta el mismo tipo de estípulas encontrado en los protofilos. Inicialmente, este par de metafílos ocupa una posición decusada respecto a los protofilos; más tarde, por torsión del tallo son desplazados de su posición original. Los metafílos subsecuentes aparecen en forma alterna; en tallos de cierto tamaño, esta posición no es clara debido a la torsión. Los folíolos son obovados y simétricos, de margen entero, ápice y base redondeados y peciolulos acanalados. La venación de los folíolos es reticulada abierta igual que en los protofilos.

Superficie adaxial (haz) de la lámina

La lámina de los protofilos y los folíolos de los metafílos muestran numerosas areolas, en general, de forma poligonal.

La vena media y las venas secundarias se proyectan abaxialmente, de tal modo, que en la haz se ven hundidas y cubiertas de tricomas (Fig. 1). Las venas terciarias, cuaternarias y menores son glabras. Las células epidérmicas de las areolas son de forma irregular (Fig. 2); sobre las venas, la epidermis se compone de células largas (Fig. 3). La cutícula que cubre las areolas y las venas es gruesa y se deposita en forma irregular (Figs 3 y 4). Hay un único tipo de tricoma que se localiza en las venas mayores (Fig. 1) y en las areolas (Fig. 5). Este tricoma es linear cimbiiforme, glandular y de talla variable (120 a 130 μm) (Fig. 5). Toda la superficie externa del tricoma se encuentra cubierta de vesículas. Se observaron numerosos estomas de tipo "ranunculáceo" o anomocítico (Figs. 2 y 7); las células guardianas están cubiertas por el mismo tipo de cutícula que caracteriza las areolas (Fig. 7). El número de estomas por mm^2 es de 100 a 120. En el borde de la lámina se localizan células epidérmicas alargadas y el tipo de tricoma descrito con anterioridad (Fig. 5, 6 y 8).

Superficie abaxial (envés) de la lámina

Las venas y las areolas del envés son intensamente pubescentes (Fig. 9). El tipo de tricoma linear-cimbiiforme descrito en la haz es también el único presente en la superficie abaxial (Fig. 10).

Las areolas de la superficie abaxial presentan el mismo tipo de células epidérmicas encontradas en la haz. Las células epidérmicas que cubren las venas son irregulares y muy largas (Fig. 11).

Los estomas son abundantes y del tipo anomocítico (Fig. 12). El ostiolo mide 25 a 28 μm de longitud, es ancho y se reduce hacia el interior. Los bordes internos y externos del ostiolo son lisos y están cubiertos por una cutícula gruesa. Las células oclusivas pueden encontrarse cubiertas por la capa de cutícula desorganizada descrita con anterioridad o mostrar una cutícula delgada y lisa (Fig. 12). El número aproximado de estomas por mm^2 es de 300 a 310.

Discusión

La superficie abaxial muestra una pubescencia más conspicua que la adaxial. Se observó un tipo único de tricoma glandular en toda la lámina foliar; en apariencia este tipo de tricoma no había sido descrito con anterioridad en *Phaseolae*. La concavidad que muestra este tricoma en su extremo proximal sugiere la posibilidad de que allí se acumule algún tipo de secreción. Los tricomas glandulares de cabeza esférica ("spherical headed glands") reportados por Metcalfe y Chalk (5) no fueron observados.

La hoja es anfiestomática y el número de estomas es mayor en el envés. La cutícula es muy irregular y difiere mucho del tipo cuticular encontrado en otras *Phaseolae* como *Phaseolus vulgaris* (3) y *Vigna unguiculata* (2). De acuerdo con Pieniazaek (6) las superficies cuticulares irregulares permiten mayor transpiración cuticular y son más permeables.

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica, establecida con el apoyo de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA) del Gobierno del Japón y financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Los autores agradecen al señor Takahisa Fukuoka por la cooperación brindada en la realización de este trabajo.

Literatura citada

1. KRAUSS, F. G. The pigeon pea (*Cajanus indicus*), its importance, culture and utilization in Hawaii. Hawaii Agricultural Experiment Station, Bulletin N° 64. 1932. 46 p.
2. FLORES, EUGENIA M., y ESPINOZA, ANA M. Ultraestructura de la morfología foliar de *Vigna unguiculata* L. Revista de Biología Tropical 26 (1): 159-169. 1977.
3. ———, ESPINOZA, ANA M. y KOZUKA, Y. Estudio ultraestructural de la epidermis foliar de *Phaseolus vulgaris* L. Turrialba 27 (2): 117-124. 1977.
4. LEON, J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Lima, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1968. 487 p.
5. METCALFE, C. R. y CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford, Clarendon Press, 1959. 1500 p.
6. PIENIAZAEK, S. A. Physical characters of the skin in relation to apple fruit transpiration. Plant Physiology, Lancaster 19: 529-536. 1944.
7. TROLL, W. Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen. Berlin, Gebrüder Borntraeger. 1938. 528 p.

Notas y Comentarios

Cultivo de células en bolitas

El uso de bolitas miniatura de celulosa para cultivar células de toda clase, incluso humanas, para la producción de vacunas, drogas y hasta plaguicidas víricos podría a la vez reducir los costos y reducir dramáticamente el tamaño del plantel de producción. Según investigadores del Massachusetts Institute of Technology, el proceso que ellos han desarrollado permitiría reemplazar 100 mil botellas de cultivo de un litro cada una, por 5 cilindros de 50 galones llenos de las bolitas. Además, la técnica puede hacer comercialmente posible la producción de proteínas complejas, tales como el interferón, una sustancia antivirótica natural.

Los virus para hacer vacunas se cultivan ahora en huevos de gallina o en botellas que contienen cultivos de células. En ambos casos, el coleccionar los virus es caro y toma mucho tiempo ya que ocupan un volumen considerable.

Las bolitas porosas, hechas de una celulosa sintética llamada dextran, tienen un diámetro de 150 micrómetros. Su principal ventaja es que forman un medio de cultivo que es compacto y sin embargo tiene una enorme área superficial. El grupo del MIT, dirigido por William Thilly, ha hecho cultivos en bolitas en medios líquidos convencionales y ha obtenido densidades de hasta 7,6 millones de células por mililitro de medio de cultivo. Un gramo de bolitas de dextran tratadas tiene un área superficial equivalente a unos 200 placas Petri (de 100 mm de diámetro) o 20 botellas estándar de cultivo.

La utilidad de las bolitas de dextran para cultivar células fue señalada primero por un investigador holandés, A. L. van Wezel, en 1967. Este encontró que las células podían prosperar sobre bolitas de la resina comercial para intercambio de iones, Sephadex, cuando las bolitas contenían un grupo dietilamino cargado positivamente. Los resultados posteriores no fueron satisfactorios porque las bolitas eran tóxicas a las células. El grupo de Thilly mostró que la densidad de la carga positiva en las bolitas es crítica ya que un exceso de carga en las bolitas inhibe el desarrollo de las células.

Thilly explicó cómo funciona la técnica a la revista *Chemical Week* (10 agosto 1977). "Todo lo que hay que hacer es poner los virus en la superficie de una suspensión en agitación y apagar el agitador. Las bolitas se hundieron en el fondo. Eventualmente, el líquido supernadante estaría lleno de virus." Thilly está negociando con una firma farmacéutica las licencias sobre el uso de esta técnica. Ha demostrado ya la producción de interferón por el método de las bolitas. Esto podría tener mucha significación ya que, hasta ahora, las compañías farmacéuticas no habían encontrado una técnica económica para producir interferón en masa, a pesar de su potencia como agente antivírico.

Plásmido causa tumores en plantas

Los plásmidos bacterianos son círculos de DNA que se autorreproducen independientemente, que viven en las bacterias y que pueden ser pasados de una a otra, llevando consigo importantes genes como los genes que confieren resistencia a los antibióticos. Pero, según Mary-Dell Chilton y un número de colegas de la Universidad de Washington, los plásmidos son también responsables del tumor vegetal conocido como agalla de la corona. Este descubrimiento abre cuestiones interesantes sobre las posibilidades de la ingeniería genética, así como también sobre el posible papel de los plásmidos en la producción de tumores animales (*Cell*, vol 11, p. 263).

Los tumores de las agallas de la corona son causados por una bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, pero sólo cuando la bacteria lleva consigo un plásmido. Si la bacteria se "cura" de sus plásmidos, no causa ya tumores en las plantas. La conclusión obvia es que algo en el plásmido está transformando las células vegetales en la misma forma que los virus tumorigénicos transforman a las células animales.

Pero los virus de tumores animales se sabe que transforman las células insertando su propio DNA en el de la célula. Y hasta ahora, nadie había podido encontrar DNA de plásmido en las células de los tumores de agalla de la corona. Sin embargo, la búsqueda se había hecho tratando de aparear el DNA del plásmido entero con fragmentos de DNA de los cromosomas de la célula del tumor. Chilton adoptó un enfoque más refinado. Se cortó el DNA del plásmido, se marcaron los fragmentos con cantidades grandes de radiactividad, y se observó entonces si alguno de los fragmentos podía aparearse con pedazos de cromosomas. Se encontró que uno de los fragmentos no sólo estaba presente sino también en copias múltiples en los núcleos de las células que los tumores. Así, desde el punto de vista de un virologo de tumores, aquí parece estar el equivalente de un oncogen: un gen que puede insertarse él mismo dentro de una célula y causar que esa célula se multiplique sin control. Y esto abre dos posibilidades, primero, que los tumores vegetales puedan conducir a una comprensión de cómo funcionan los oncogenes, y segundo, que los plásmidos en las bacterias pueden tener algo que hacer con los tumores animales conocidos.

Desde el punto de vista del ingeniero genético, la cuestión crucial es si el DNA de plásmido está realmente ligado al cromosoma vegetal, ya que los ingenieros genéticos han estado sin éxito colocar genes fijadores de nitrógeno dentro de cromosomas vegetales, y no están seguros si eso es posible (Cf *Turrialba* 22:243; 23:127; 25:107).

Y finalmente, ¿qué hay desde el punto de vista de la bacteria? Es muy simple. Los genes bacterianos (o plásmidos) tienen dos efectos sobre las células vegetales. Causan que éstas produzcan octopina y nopalina, nutrimentos que la bacteria puede usar, pero la planta, no. Y las bacterias provocan una proliferación de células vegetales. Así, la bacteria está simplemente construyendo para sí misma una fábrica de alimentos que crece conforme aumenta su propia población. Y al hacer esto, ha resuelto el problema que todavía está atormentando los cerebros de sus varias veces superiores filogenéticamente, los hombres.*

* Para otro descubrimiento interesante sobre la agalla de la corona, véase *Turrialba* 27:142 [Ed.]

Publicaciones

Journal of Bioengineering. Esta nueva revista internacional intenta constituir un foro para la disseminación rápida de investigaciones originales en el campo de la bioingeniería. Abarcará campos de ingeniería química, eléctrica, de materiales y mecánica. Será publicada seis veces por año, por fotoduplicación de manuscritos listos para ser fotografiados. El primer número, de fecha noviembre 1977, contiene artículos sobre funciones nuevas del endotelio; un sensor de pH microelectrónico; microcápsulas biodegradables semipermeables que contienen enzimas, hormonas y vacunas; un nuevo concepto para preparar biomateriales de caucho silicón, y otros. El editor coordinador es J. D. Andrade de la Universidad de Utah, y hay otro editor para cada una de las otras secciones. La dirección es Pergamon Press, Headington Hill Hall, Oxford, England.