

LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS EN APOYO A LA INVESTIGACIÓN.

N. Vásquez M.

Introducción

Las plantas son organismos con complejos sistemas estructurales y funcionales.

El estudio de su estructura interna permite comprender los procesos fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en su interior. También, es posible establecer relaciones filogenéticas entre los distintos grupos de plantas, o lograr entender algunas de las relaciones hospedero-patógeno.

Es por ello que agrónomos, fisiólogos, fitomejoradores, fitopatólogos, etc., deben familiarizarse con la estructura interna de los materiales que trabajan ya que en muchos casos el éxito o fracaso de los resultados depende del conocimiento de la estructura y función vegetal.

Materiales y métodos

Los materiales se colocan en Glutaraldehído al 2.5% en Buffer de Fosfatos durante 24 horas. Luego, se deshidratan en una serie ascendente de alcohol (50-70-80-90/95-100-100) permaneciendo una hora en cada alcohol. Seguidamente se infiltran en parafina o resina, dependiendo de los objetivos y de la naturaleza del material para luego realizar cortes a 8 o 3 μ m respectivamente.

Resultados

Se presenta a continuación los resultados de estudios histológicos en apoyo al cultivo de tejidos, fitoprotección y fitomejoramiento.

Cultivo de Tejidos

*Respuesta de callos al extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis**

Los trabajos realizados con callos de Gran Enano y Calcuta 4 expuestos a diferentes dosis del extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis* permitieron determinar que con una dosis de 60 μ l de extracto, se inicia el deterioro de las células de la periferia del callo en el cultivar Gran Enano. Estas muestran una maceración de las paredes celulares y un citoplasma denso de color grisáceo, 72 horas después de inoculadas. Conforme aumenta la dosis, se establece una clara delimitación entre el tejido sano y el enfermo, llegando incluso a la degradación del núcleo.

En el clon Calcuta 4, no se observaron daños estructurales para ninguna de las concentraciones probadas. Lo único que se observó fue una reacción de oxidación a las concentraciones más altas del extracto.

Estos resultados permitieron verificar rápida y eficazmente el grado de resistencia de ambos cultivares, o sea, altamente susceptibles y altamente resistentes, prueba que podría ser aplicada con gran éxito en otros materiales.

Embriogénesis somática de Gran Enano a partir de inflorescencias masculinas.

Los cortes histológicos de manitas de banano cultivadas durante 30 días mostraron que existen diferentes respuestas al medio de cultivo. Algunos explantes iniciales entran en un proceso de envejecimiento y presentan células con una coloración negra y ruptura de las paredes. Estas son más frecuentes en la base de la manita.

Las células que permanecen vivas acumulan almidón pero no presentan signos de división celular. Las manitas que reaccionan positivamente al medio de cultivo se caracterizan por estar en muy buen estado, además de presentar

divisiones celulares frecuentes en la región de los dedos, formando callos. Así, a los dos meses de cultivo los dedos se caracterizan por la acumulación de almidón. Las células cercanas a la periferia empiezan a mostrar un cambio en la coloración del almidón pasando de violeta a pardo, que parece indicar utilización de reservas.

Esto se observa también en el callo que se formó. Algunas de éstas células se desprenden con facilidad del callo y originan células embriónicas. Algunas de éstas se encuentran formando grupos de hasta 4 y 5 células, originando pequeños proembriones, o bien estados más diferenciados donde se pueden observar embriones en diferentes etapas de su desarrollo.

Los callos de tres meses de edad mantienen la producción de gran cantidad de células embriónicas, además de la producción de embriones bien desarrollados formados a partir de células que se desprenden del callo inicial. Todo este proceso continúan en los callos de 4, 5 y 6 meses, donde la cantidad de embriones y células embriónicas es aún mayor.

Cultivo de Tejidos en especies forestales.

Los segmentos de hipocotilo de *Phithecellobium saman* (Cenizaro) permitieron observar el desarrollo de gran cantidad de brotes en los extremos terminales, 25 días después de colocados en medio de cultivo.

Veinte días después de este suceso, se produce un rompimiento longitudinal de la corteza del explante con la formación posterior de células de callo a partir del cual se forman numerosos brotes apicales que pueden ser desprendidos del explante madre y crecen de manera independiente.

En el caso de los hipocotilos de *Swietenia macrophylla* (Caoba) se favoreció el desarrollo de las yemas axilares a partir de la cual se realiza exitosamente la práctica de microestacas.

Fitoprotección

Estudios de resistencia y susceptibilidad a nematodos en café.

Las plantas susceptibles desarrollaron gran cantidad de agallas. El corte histológico de esas mostró numerosas hembras y masas de huevos cercanas al tejido vascular. Se observó además células gigantes bien formadas y abundantes, con contenido celular denso y presencia de muchos núcleos.

En plantas resistentes se formaron pocas agallas. En algunas hay un desarrollo normal de la hembra, pero en menor número, comparado con plantas susceptibles. Las masas de huevos son frecuentemente reducidas. En algunos casos se observan pequeños grupos de células gigantes, sin embargo, no se observan masas de huevos dentro de los tejidos del hospedero.

Detección de fenoles en vitroplantas inoculadas.

El análisis histológico del tejido foliar inoculado con conidios mostró que la mayor acumulación de compuestos fenólicos se localizó a nivel de células oclusivas en el clon "Calcuta 4" y en células epidérmicas vecinas en el cultivar "Gran Enano". Esto podría explicar parcialmente el comportamiento de los materiales a *M. fijiensis*.

En el análisis histológico de los tejidos foliares de los seis materiales inoculados con extracto crudo, los cultivares "Gran Enano" y "Currare" presentaron los mayores niveles de fenoles a las 96 horas después de la inoculación, seguidos por los materiales "Yangambi" y "Calcuta 4", donde se observó un aumento en la acumulación de fenoles con el tiempo. Los materiales "Saba" y "Embrapa-403", mostraron bajo contenido de fenoles.

Fitomejoramiento

Pruebas de viabilidad.

La prueba de varias tinciones para tratar de diferenciar entre embriones viables y no viables, procedentes del proceso de crioconservación, permitió establecer que la tinción de los materiales con DAPI da buenos resultados ya que los embriones viables fluorescen azul brillante, mientras que los no viables permanecen con una coloración amarilla - parduzca.

De igual manera, se pudo determinar la viabilidad de suspensiones celulares, donde inclusive se logró determinar presencia de carbohidratos, líquidos y sustancias fenólicas.

Estas observaciones nos permiten entonces una prueba rápida para medir el porcentaje de viabilidad de embriones criocongelados, así como de suspensiones celulares en un tiempo muy corto.

Finalmente, las pruebas de viabilidad efectuadas a polen de café y de flame, utilizando la tinción con el colorante de Alexander y la tinción con Iodo-Ioduro, permitieron observar la presencia de gran cantidad de polen estéril en todo los cultivares muestreados, lo que tiene gran significado en prácticas de fitomejoramiento.

Conclusión

Los estudios histológicos son de gran importancia ya que con ellos podemos entender mejor una serie de eventos que se llevan a cabo en las plantas o partes de ella.

Por otro lado, podemos dar respuesta a muchas incógnitas que se presentan durante la fase de experimentación, permitiéndonos una interpretación más exacta de los resultados.