

## ESTUDO ANATÓMICO DA INICIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES EM REBENTOS DE CASTANHEIRO REGENERADOS *in vitro*

Gonçalves, J.C. <sup>(1)</sup>; Diogo, G. <sup>(1)</sup> & Amâncio, S. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Lab. de Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Portugal

<sup>(2)</sup> Dep. de Botânica e Engenharia Biológica, I. Sup. de Agronomia, Lisboa, Portugal

### Resumo

A fase de enraizamento continua a ser um passo chave em todo o processo de micropropagação, podendo de alguma forma condicionar o seu sucesso, com particular destaque para as espécies lenhosas. Daí que uma melhor compreensão dos aspectos biológicos envolvidos na formação de raízes adventícias, possa contribuir de uma forma decisiva para resolver algumas das frequentes dificuldades.

Neste trabalho descrevem-se as alterações anatómicas durante a formação de raízes adventícias em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro*. A indução foi feita em meio de MS, com os macronutrientes reduzidos a metade e os nitratos a um quarto, e com 3 mg l<sup>-1</sup> de AIB durante 5 dias, seguidos de transferência para igual formulação mas sem auxina.

As primeiras divisões celulares detectaram-se 24 h após os rebentos serem induzidos a formar um sistema radicular adventício. Estas divisões ocorrem em células derivadas do câmbio vascular e localizadas muito próximas deste. O posterior processo de diferenciação evolui no sentido de um incremento das taxas de divisão celular com a formação de meristemóides. Entre os dias 4 e 6 são já visíveis primórdios radiculares bem diferenciados, que se desenvolvem radialmente ao córtex com a posterior rotura de toda a camada epidérmica. Estes primórdios evoluem para raízes adventícias que podem ser observadas macroscopicamente entre o dia 10 e 12. Em simultâneo assiste-se a uma progressiva diferenciação do sistema vascular que acaba por se conectar com o sistema vascular do rebento. O aspecto anatómico destas raízes em corte transversal parece em tudo normal.

### Introdução

A indução e o desenvolvimento de um sistema radicular adventício é um passo fundamental em qualquer método de propagação vegetativa, incluindo a micropropagação.

Esta fase, a rizogénese, tem tanta maior importância quanto mais difíceis são as espécies de multiplicar, e com particular destaque para as espécies lenhosas.

A compreensão das vias metabólicas que estão envolvidas no processo de enraizamento é, de certo modo, ainda insuficiente, provavelmente como resultado da grande diversidade de factores que o controlam, e não existe uma teoria única que consiga explicar a diversidade de respostas que se observam (Halperin, 1986).

Uma abordagem possível consiste na utilização de métodos citológicos que permitam avaliar alguns dos acontecimentos que levam à formação de primórdios radiculares (Molnar e Lacroix, 1972a, b) e têm vindo a ser utilizados por diversos autores em diferentes espécies (Zhou *et al.*, 1992; Pluss e Schmid, 1988; Berthon *et al.*, 1987).

No castanheiro está totalmente assumido que a utilização de auxinas, em especial do ácido indol butírico (AIB), é indispensável para a indução radicular, onde o método de aplicação, concentração e tempo de exposição são factores que podem afectar significativamente os resultados experimentais (Vieitez *et al.*, 1986; Gonçalves *et al.*, 1994).

Com este trabalho pretendemos apresentar a sequência de alterações citológicas e histológicas que levam à formação de raízes em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro*.

#### **Material e métodos**

##### ***Material vegetal e condições de cultura***

Foi utilizado um clone adulto híbrido de *Castanea sativa* x *C. crenata*, designado por M3. Os rebentos utilizados foram obtidos a partir de culturas stock, cujas condições de estabelecimento e multiplicação foram descritas em trabalhos anteriores (Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993). Rebentos provenientes do alongamento, com 3 a 5 cm de comprimento e 4 semanas de cultura, foram utilizados para o enraizamento. A indução foi feita utilizando 3 mg l<sup>-1</sup> de AIB no meio de cultura, durante 5 dias, após o que os rebentos foram transferidos para igual formulação, mas sem auxina. O meio base de enraizamento continha os macronutrientes de Murashige e Skoog (1962) (MS) reduzidos a metade com os nitratos reduzidos a um quarto, micronutrientes também de MS e suplementados com tiamina, piridoxina, ácido pantoténico e ácido nicotínico todos na concentração de 1 mg l<sup>-1</sup>, 100 mg l<sup>-1</sup> de inositol, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g l<sup>-1</sup> de agar comercial. O pH dos meios de

cultura foram ajustados a 5.5/5.6 antes de autoclavar. As culturas, durante o enraizamento, foram mantidas na sala de cultura com condições standard de 16 h de luz e 8 horas de escuro, com uma intensidade luminosa de  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes branco frio e com temperatura de 25 °C dia e 20 °C noite.

### **Histologia**

Foram recolhidas diariamente as partes basais dos rebentos, com 5 a 8 mm, até ao dia 11. A fixação foi feita em solução de álcool, ácido acético e formol (FAA) durante um mínimo de 24 h. A desidratação foi executada em série de etanol entre 60 a 95%, com permanência mínima de 1 h em cada, e a inclusão foi feita em resina sintética, LKB Historesin Kit®, de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram feitos sequencialmente num micrótomo rotativo com 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura e a coloração com ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) contrastado com azul de toluidina a 0.05%, ou só com azul de toluidina também a 0.05%. Em cada dia foram recolhidos e processados 4 rebentos.

### **Resultados e discussão**

No dia 0, as secções do caule mostram uma normal e típica organização dos tecidos caulinares, sob o ponto de vista anatómico (Fig. 1). O câmbio vascular, com as células dele derivadas que, gradualmente, assumem as características de elementos celulares de xilema e floema secundários, são facilmente visíveis, bem como um anel descontínuo de esclerênquima que delimita o floema primário.

A formação de raízes nos diferentes rebentos em cada uma das amostras não é totalmente sincronizada, isto é, em rebentos com igual tempo de indução encontram-se diferentes estados de evolução deste processo, no entanto não deixa de ser bem patente uma sequência muito similar em termos de alterações histológicas. A primeira divisão celular que pode pronunciar a reversão ao estado meristemático e início da formação de um futuro primórdio radicular, detectou-se às 24 h após contacto com o ácido indol butírico (Fig. 2) o que pode indiciar uma actividade metabólica bastante precoce. Estas células são derivadas do câmbio ou mesmo do parênquima vascular e apresentam citoplasma denso e núcleo bastante pronunciado. A partir do dia 3-4 as células em divisão aumentam rapidamente de número e podem agora ser detectadas ao longo de vários pontos do córtex

(Fig. 3). Progressivamente estas células originam formações meristemóides que se individualizam e começam a apresentar a sua forma tipicamente apontada, estando o primórdio radicular perfeitamente definido entre os dias 6 e 8 (Fig. 4). Assiste-se então ao crescimento através do córtex, que tem vindo progressivamente a sofrer uma certa desagregação em consequência da actividade meristemática das suas células que originam uma estrutura calosa que é facilmente detectada no exterior à vista desarmada (Fig. 6). Estes primórdios radiculares começam também a sofrer uma certa diferenciação interna, com muitas das células a contribuírem para a actividade meristemática que permite o crescimento do primórdio, mas com outras a diferenciarem-se em elementos vasculares, nomeadamente traqueídeos (Fig. 5). As divisões periclinais das células nas camadas mais externas do primórdio permitem a formação de uma camada de protecção. Entre os dias 10 e 12 após o início da indução, duas ou mais raízes adventícias emergem à superfície externa do caule (Fig. 6).

Esta sequência de alterações anatómicas acabadas de descrever, durante a indução e desenvolvimento de raízes adventícias formadas *in vitro*, parece em muito similar às referidas para outras espécies (Zhou *et al.*, 1992; Samartin *et al.*, 1986; San-José *et al.*, 1992) e também em relação às referidas por Vieitez *et al.* (1981) em *Castanea sativa* Mill, de características juvenis. As principais diferenças do nosso estudo com este último têm a ver com os tempos cronológicos da sequência descrita, que podem ser devidos às diferentes condições de enraizamento bem como ao genótipo, uma vez que aquele trabalho foi feito utilizando rebentos juvenis provenientes de plantas seminais com 3-4 meses de idade.

Assim, com os resultados observados, os acontecimentos anatómicos que levam à formação de raízes neste clone, podem ser descritos em 3 a 4 fases. A primeira consiste no aparecimento de células com citoplasma denso e núcleo bem visível localizadas muito próximas do anel cambial que revertem assim para o estado meristemático. A segunda consiste no rápido incremento das divisões mitóticas nestes centros de iniciação que permitem a formação do meristemóide radicular. A polarização das divisões celulares origina uma estrutura com uma forma tipicamente em ponta, o primórdio, e consiste na fase três. Finalmente, o primórdio radicular cresce em direcção ao exterior da caule, através do córtex, desenvolve o seu próprio sistema radicular, que se unirá de uma forma mais ou menos funcional ao sistema vascular caulinar, e acaba por se identificar exteriormente.

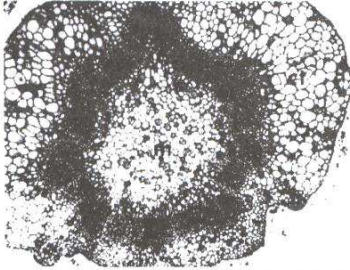


Fig. 1. Corte transversal do caule no dia 0 de indução; m - medula; x - xilema; c - câmbio; f - floema; e - anel de esclerênquima; ct - córtex; (40x).

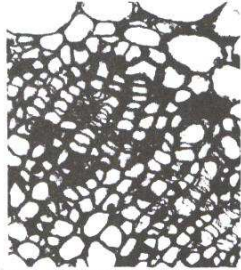


Fig. 2. Corte trasversal do caule no dia 1 de indução. São visíveis células que reverterem ao estado meristemático; c - câmbio; em - células meristemáticas; (100x).

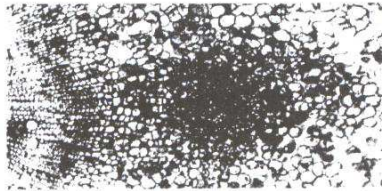
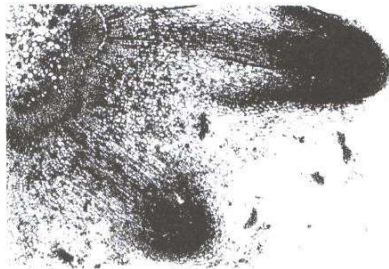


Fig. 3. Corte transversal do caule no dia 4 de indução. São visíveis células em divisão ao longo de vários pontos do córtex, com a formação e individualização de meristemóides (100x).

Fig. 4. Corte transversal do caule no dia 8 de indução. É visível o crescimento dos primórdios através do córtex, atingindo o exterior (40x).



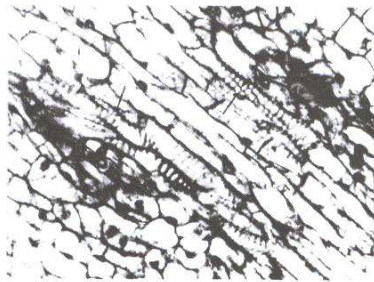


Fig. 5. Corte transversal do caule no dia 8 de indução, mostrando um primórdio radicular longitudinal, recém formado, onde se pode observar a progressiva diferenciação de elementos vasculares (setas) (400x).



Fig. 6. Aspecto da base do rebento após 12 dias de indução, onde são visíveis duas raízes adventícias recém formadas (barra = 1 cm).

#### Referências Bibliográficas

- Gonçalves, J. C.; Amâncio, S. & Pereira, J. S. (1994) Rooting and acclimatization of chestnut by *in vitro* propagation. In: Lumsden, PJ; Nicholas, JR ; Davies, WJ. (Eds) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (pp 303-308). Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- Gonçalves, J. C.; Amâncio, S.; Pereira & J. G. (1993) *In vitro* propagation comparative study of 7 chestnut hybrid clones (*C. sativa* x *C. crenata*). *Proceedings of the International Congress on Chestnut*: 211-214. Spoleto, Itália.
- Gonçalves, J. C. (1991) *Influência de Alguns Factores na Micropropagação de Castanheiro (Castanea Miller)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (113pp).
- Haissig, 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: Jackson, M. B. (ed) *New formation in plant and cuttings* (pp. 141-189). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Halperin, W. (1986) Attainment and retention of morphogenetic capacity *in vitro*. In: Vasil, I. K. (ed) *Variability Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Plant Regeneration and Genetic* Academic Press, Orlando, Florida.
- Hartman, H. T. Kester, D. E. & Davies, F. J. (1990) *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NY.

- Molnar, J. M. & Lacroix, L. J. (1972a) Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: enzyme changes. *Can J Bot* 50, 315-322.
- Molnar, J. M. & Lacroix, L. J. (1972b) Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: DNA and protein changes. *Can J Bot* 50, 387-392.
- Pluss, R. & Schmid, A. (1988) The anatomy of adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* L. *Bot Helv* 98, 97-102.
- Samartin, A.; Vieitez, A. M. & Vieitez, E. (1986) Rooting of tissue cultured camellias. *J Hort Sci* 61, 113-120.
- San-José, M. C.; Vidal, N. & Ballester, A. (1992) Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie* 12, 767-774.
- Vieitez, A. M.; Vieitez, M. L.; Vieitez, E. (1986) Chestnut (*Castanea* spp). In: Bajaj, Y. P. S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 1 (pp. 393-414) Springer-Verlag, Berlin.
- Vieitez, A. M.; Vieitez, M. L. & Ballester, A. (1981) *In vitro* chestnut regeneration. Anatomical and chemical changes during the rooting process. *Coll Int Culture In Vitro des Essences Forestières*. IUFRO-AFOCEL, France, 149-152.
- Zhou, J. Wu, H. & Collet, G.F. (1992) Histological study of initiation and development *in vitro* of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M26 and EMLA 9. *Physiol Plant* 84, 433-440.