

## ESTUDO ANATÔMICO DE RAÍZES DE *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck, cv. PÊRA, DESENVOLVIDAS «IN VITRO» E EM VERMICULITA <sup>1/</sup>

Maria Olivia Mercante Simões <sup>2/</sup>  
Eldo Antonio Monteiro da Silva <sup>2/</sup>  
Silvio Lopes Teixeira <sup>3/</sup>

### 1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vem desempenhando lugar importante na citricultura. A cultura de embriões nucelares (3), meristemas apicais (4) e regiões isoladas de segmentos internodais (15) tem possibilitado a obtenção de explantes livres de colonização virótica. Tais técnicas têm levado a diversas pesquisas de explantes mais produtivos em brotações (1, 5, 7, 16, 17) e meios de cultura adequados ao cultivo de *Citrus* (3, 11, 12, 13). O cultivo de vários tecidos de *Citrus* tem sido feito com sucesso em meio solidificado com ágar, entretanto BUTTON e BOTHA (2) sugeriram possíveis alterações anatômicas, como aumento do espaço intercelular, em órgãos cultivados nesse tipo de meio.

Este experimento teve por objetivo comparar anatomicamente raízes originais de sementes e raízes adventícias desenvolvidas «in vitro» (em ágar) e em vermiculita (após desenvolvimento «in vitro»).

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de laranja-pêra foram colocadas para germinar em tubetes com 7 g de vermiculita e 30 ml de solução de Hoagland, à temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nove

<sup>1/</sup> Parte da tese de mestrado do primeiro autor, parcialmente financiada pelo CNPq. Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Aceito para publicação em 31-10-1989.

<sup>2/</sup> Departamento de Biologia Vegetal da UFV. CEP 36570 Viçosa, MG.

<sup>3/</sup> Departamento de Fitotecnia da UFV. CEP 36570 Viçosa, MG.

dias após o plantio, as raízes de 1,0 a 1,7 cm de comprimento foram coletadas em FAA 50% e preparadas segundo técnicas histológicas-padrão, para confecção de lâminas permanentes (8).

As raízes adventícias foram obtidas de brotações de segmentos nodais de laranja-péra, provenientes de experimentos em andamento no Laboratório de Cultura de Tecidos da U.F.V. As brotações foram cultivadas em 10 ml do meio composto de sais de MS (12), das vitaminas: 0,5 mg/l de perodoxina, 0,4 mg/l de tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 2,0 mg/l de glicina, 100 mg/l de i-enositol, 30 g/l de sacarose, 500 mg/l de extrato de malte, 0,3 mg/l de 1,0 mg/l de ANA e 5g/l de ágar Merck, com o pH do meio corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ . Durante o cultivo as brotações foram mantidas em regime luminoso de 16h de luz e 8h de escuro. Os explantes foram retirados dos tubos de ensaio, quando as raízes atingiram comprimento entre 0,5 e 2,6 cm, lavadas em água desionizada morna, para remoção do meio de cultura, retirando-se as folhas maiores, e plantados em tubetes de 30 x 125 mm, com 7,0 g de vermiculita autoclavada e 30 ml de solução de Hoagland. Cada tubete foi coberto com saquinho plástico transparente (formando uma câmara úmida), com a finalidade de evitar a rápida desidratação das plantas, que foram irrigadas periodicamente com solução de Hoagland, sob iluminação natural de dia e sob lâmpada incandescente à noite, para forçar a produção de fotoassimilados.

As raízes dos explantes foram seccionadas, para produzirem dois segmentos de 0,5 cm de comprimento: a) na região correspondente ao crescimento «in vitro» e b) na região correspondente ao crescimento na vermiculita. Os segmentos foram fixados em FAA 50% e preparados segundo técnicas histológicas-padrão, para confecção de lâminas permanentes (8).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes originadas de sementes (Figura 1 A) apresentaram, na superfície, células epidérmicas cobertas por uma mucilagem secretada pela própria raiz e pelos microorganismos da rizosfera, padrão também observado por SCHNEIDER (14) em *Citrus*, além de pêlos radiculares. Abaixo da epiderme estava a hipoderme, com células maiores que as da epiderme e com indícios de suberização nas paredes internas.

Internamente à hipoderme encontrava-se o córtex, composto de células com paredes finas e citoplasma mais denso, com substâncias ergásticas. Internamente ao córtex encontrava-se a endoderme, com Faixa de Caspary nas paredes anticliniais. A primeira camada do cilindro central, o periciclo, delimitava o tecido vascular. O câmbio diferenciava-se entre o metafloema e o metaxilema, unindo-se às células do periciclo, posicionadas em frente ao protoxilema, formando um cilindro completo, que diferenciava células de xilema secundário, para o interior, e floema secundário, para o exterior.

Nas raízes crescidas em ágar (Figuras 1B e 1C), observaram-se algumas variações, comparadas com raízes originadas de sementes. O córtex adquiriu aspecto frouxo, com células grandes, separadas uma das outras por grandes espaços vazios, formando uma espécie de aerênquima; pêlos radiculares não estavam presentes.

Primórdio de raiz secundária pode ser observado na Figura 1D, desenvolvido através de divisões periclinais e anticlinais do periciclo.

As raízes crescidas em ágar, ao continuarem seu desenvolvimento em vermiculita (Figura 1D), passaram a desenvolver estrutura semelhante à de raízes de se-

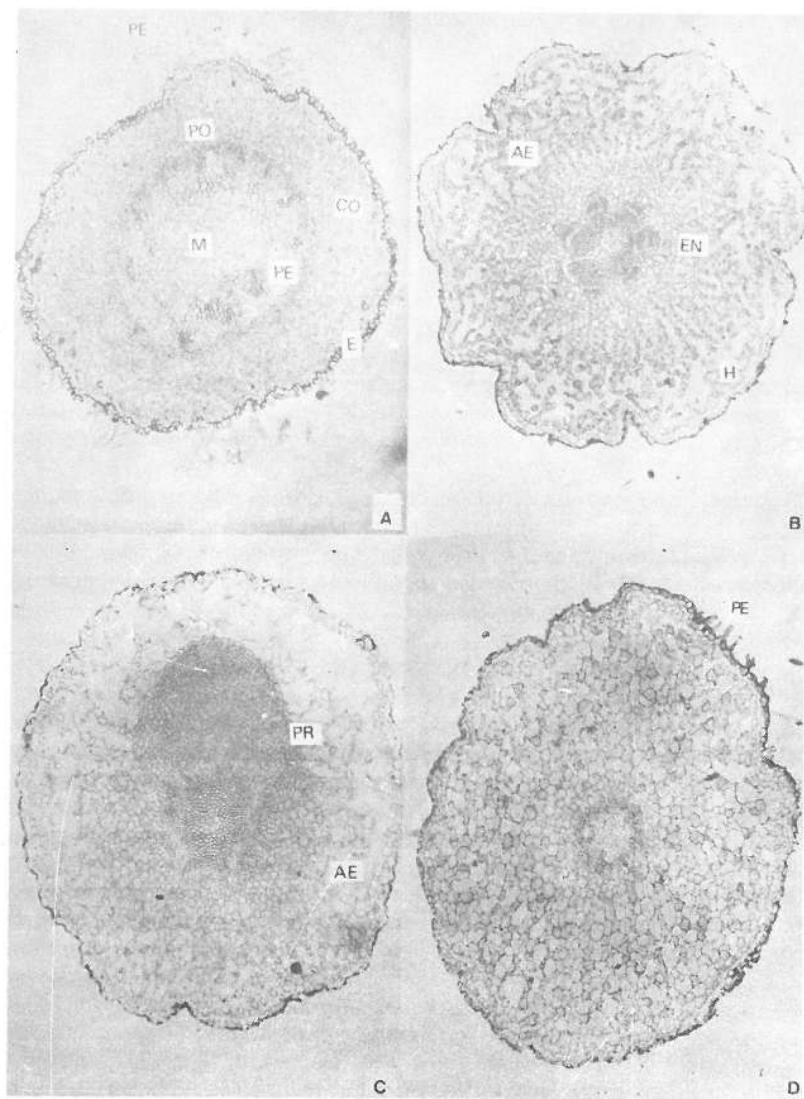


FIGURA 1 - Cortes transversais de raízes; A. raiz de embrião (280 x); B e C. raízes adventícias desenvolvidas em ágar (290 x); D. raiz adventícia desenvolvida em vermiculita (270 x). AE = aerénquima; CO = córtex; E = epiderme; EN = endoderme; H = hipoderme; M = medula; PE = pêlos radiculares; PR = primórdio radicular.

mentes. Surgiram pêlos absorventes, que não foram observados no ágar, e o córtex apresentou-se mais compacto, com espaços intercelulares menores.

A presença de aerênquima nas raízes desenvolvidas «in vitro», provavelmente, está relacionada com a falta de aeração, causada pelo ágar, acentuada ainda pela exigência de um substrato bem aerado. Para JONES e EMBLETON (9) e DREW *et alii* (6), em trabalhos com plantas de *Zea mays* L., submetidas à inundação, a formação de aerênquima seria devida à ação lisogênica do etileno, produzido sob anaerobiose, nas células corticais das raízes, o que constitui uma forma de sobrevivência em condições de inundação, pois permite o transporte de gases da parte aérea para o sistema radicular. KAWASE e WHITMOYER (10) chegaram aos mesmos resultados, trabalhando com *Helianthus annuus* L., cv. CM323 (girassol), *Lycopersicum esculentum* Mill., cv. 42-3 (tomate) e *Salix fragillis* L.

#### 4. CONCLUSÃO

Raízes adventícias desenvolvidas em ágar e, posteriormente, em vermiculita, «in vitro», apresentaram modificações na estrutura interna. As raízes crescidas em ágar desenvolveram uma espécie de aerênquima, o que favoreceu seu crescimento na condição de anaerobiose, devido ao ágar. Transferidas para vermiculita, esse padrão anatômico modificou-se, tornando-se semelhante ao das raízes provenientes de sementes germinadas em vermiculita. Conclui-se que o meio de cultura condicionou as modificações morfológicas observadas nas raízes crescidas nos dois meios de cultura.

#### 5. RESUMO

Raízes adventícias regeneradas em ágar, «in vitro», desenvolveram uma espécie de aerênquima e não apresentaram pêlos. Quando transferidas para vermiculita, reduziram-se os espaços intercelulares e teve início a emissão de pêlos absorventes, padrão de desenvolvimento semelhante ao observado nas raízes provenientes de sementes.

#### 6. SUMMARY

(ANATOMIC STUDY OF ROOTS OF *Citrus sinensis* (Linn) Osbeck, cv. PÉRA, DEVELOPED «IN VITRO» AND IN VERMICULITE)

Adventitious roots obtained in agar, «in vitro», developed a kind of aerenchymatic tissue and did not develop root hairs. When the roots were transferred to vermiculite, intercellular spaces shrank and root hairs began to sprout in a pattern of development such as can be observed in the roots obtained from plant seeds.

#### 7. LITERATURA CITADA

1. BONNEL, E.; DEMARLY, Y. & ESSAD, S. Évolution anatomique des tissus foliaire de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés «in vitro». *Can. J. Bot.*, 61: 830-836, 1982.
2. BUTTON, J. & BOTHA, C.E.J. Enzymic maceration of *Citrus* callus and regeneration of plants from single cells. *J. Exp. Botany*, 26: 723-729, 1975.

3. BUTTON, J. & KOCHBA, J. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. New York, Springer-Verlag, 1977. p. 72-92.
4. CHATURVEDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. *HortScience*, 9:118-120, 1974.
5. CHLYAH, A. & TRAN THANH VAN, M. Histological changes in epidermal and sub-epidermal cell layers of *Begonia rex* induced to form «de novo» unicellular hairs, buds, and roots. *Bot. Gaz.*, 145:55-59, 1984.
6. DREW, C.; CHAMEL, A.; GARREC, J.P. & FOURCY, A. Cortical air spaces (aerenchyma) in roots of corn subjected to oxygen stress. *Plant Physiol.*, 65: 506-511, 1980.
7. HANDRO, W.; RAO, P.S. & HARADA, H. A histological study of the development of buds, roots, and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. *Annals of Botany*, 37: 817-821, 1973.
8. JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York, MacGraw-Hill, 1940. 523 p.
9. JONES, W.W. & EMBLETON, T.W. Soils management, and cover crops. In: REUTHER, W. ed. *The citrus industry*. Riverside, University of California, 1973. Vol. 3, p. 98-121.
10. KAWASE, M. & WHITMOYER, R.E. Aerenchyma development in water logged plants. *Amer. J. Bot.*, 67:18-22, 1980.
11. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135-166, 1974.
12. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497, 1962.
13. MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factors requirements of citrus tissue culture. In: I, Riverside, 1969. *Proceedings...* Riverside, University of California, 1969. p. 1155-1161.
14. SCHNEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W. (ed.). *The citrus industry*. Riverside, University of California, 1968. Vol. 2, p. 1-85.
15. SIMÕES, M.O.M. *Ontogênese de gemas e raízes adventícias de Citrus sinensis (Linn) Osbeck cv. Péra cultivadas «in vitro»*, Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal da U.F.V., 1988. 56 p. (Tese de Mestrado).
16. TRAN THANH VAN, M. & DIEN, N.T. Étude au niveau cellulaire de la différenciation «in vitro» et «de novo» de bourgeons végétatifs, de racines, ou de cal a partir de couches minces de cellules de type épidermique de *Nicotiana tabacum* Wisc. 38. *Can. J. Bot.*, 53:553-559, 1975.

17. TRAN THANH VAN, K. & TRINH, H. Plant propagation: non-identical and identical copies. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R. & CONSTANTIN, M. (ed.). *Propagation of higher plants through tissue culture; a bridge between research and application*. Springfield, U.S. Dep. Energy, 1978. p. 134-158.