

Cambios anatómicos y estudios histoquímicos en las raíces de plantas micropropagadas del portainjertos de *Prunus* Gf 655/2

Patricia E. Perelman^{1,2*} y Cristina Dizeo de Strittmatter³

¹ Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (Conicet). Av. Ángel Gallardo 470 (C1405DJR) CABA, República Argentina.

² Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junín 956 (1113) CABA, República Argentina.

³ CEFYBO-Conicet.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: patriperelman@macn.gov.ar.

Resumen

A partir de brotes crecidos *in vitro* del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2 se realizaron estudios comparativos sobre la anatomía y la histoquímica de las raíces crecidas en las fases de enraizamiento y aclimatación. Para los análisis histoquímicos se usaron las técnicas histológicas de Sudán III, Lugol y cloruro férrico. Las raíces de los brotes crecidos *in vitro* presentaban grasas, almidón y células con taninos, mientras que las raíces que se encontraban en la etapa de aclimatación estos contenidos no estaban presentes o, en algunos casos, restringidos a la endodermis. Estas diferencias en los contenidos celulares podrían estar relacionados con los distintos hábitos nutricionales que presentan las plantas que crecen *in vitro* y las que se encuentran en el estadio de aclimatación en invernáculo.

Anatomic changes and histochemical study in the roots of micropropagated plants of *Prunus insititia* GF 655/2 microshoots

Summary

A comparative anatomic and histochemical study between *in vitro* rooting and acclimatized stages of *Prunus insititia* GF 655/2 microshoots was carried out. Histochemical analysis were analyzed using Sudan III, Lugol and ferric chloride histochemical techniques. It was found that sprouts grown *in vitro* roots present fat, starch and tannin cell contents, while in the acclimatized ones these contents are not present, or in some cases, are limited to the endodermis. These differences in the contents could be related with the dissimilar nutritional habits between the *in vitro* grown plants and the acclimatized ones.

Introducción

La propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación es una técnica que se utiliza para multiplicar plantas en condiciones estériles. Consta de diferentes etapas: iniciación, multiplicación,

elongación y enraizamiento, y rusticación o aclimatación.

Para crecer y multiplicarse en estas condiciones, las plantas necesitan un medio rico en nutrientes, tanto orgánicos (vitaminas, aminoácidos, hidratos de carbono, etcétera) como inorgánicos (sales minera-

Palabras clave: micropropagación - análisis histoquímico - enraizamiento *in vitro* - aclimatación - *Prunus*.

Key words: micropropagation - histochemical analysis - *in vitro* rooting - acclimatation - *Prunus*.

les fundamentalmente macro y micronutrientes) y reguladores del crecimiento como el ácido giberélico y benzil amino purina. Por esta razón se dice que los tejidos vegetales son heterótrofos (George, 1993) porque son dependientes de un aporte externo de hidratos de carbono en el medio de cultivo, como sustrato primario para la respiración.

En la etapa de enraizamiento se induce la formación de raíces adventicias, generalmente por agregado de auxinas (ácido indol butírico) al medio de cultivo.

En la rusticación, los brotes crecidos y enraizados *in vitro* son pasados a una cámara con sustrato y humedad controlada. Esta etapa es crítica, ya que las plantas pueden sufrir un fuerte estrés hídrico por varios factores. A diferencia de las plantas crecidas en invernáculo o en el campo, cuyas hojas tienen cutícula y presentan un mesófilo con dos a tres capas de células, las plantas crecidas *in vitro* se caracterizan por la ausencia de cutícula, y porque sus estomas no tienen la capacidad de cierre (Preece y Sutter 1991); además, el mesófilo tiene un considerable espacio de aire y una sola capa de células. (Brainerd y col., 1981; Brainerd y Fuchigami, 1981). También se observó que las raíces inducidas *in vitro* no son completamente funcionales. El pasaje desde el cultivo *in vitro* a las condiciones de rusticación origina cambios en la anatomía de la planta, de las que hay escasa información con respecto al nivel de los cambios histológicos.

En este trabajo se describen los cambios histológicos que ocurren en las raíces de ciruelo *Prunus insititia* L. –Rosaceae– GF 655/2, micropropagadas del portainjertos durante las etapas de enraizamiento y rusticación.

Materiales y métodos

Material vegetal

Todo el material vegetal usado para este trabajo fue obtenido de brotes de plantas madres con sanidad controlada del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2 que se encontraban en la Estación Experimental Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Para la iniciación *in vitro* se usaron segmentos nodales de brotes tiernos, de material no lignificado,

de la copa de los árboles del portainjertos de *Prunus insititia* GF 655/2.

Desinfección del material vegetal y obtención de explantos estériles

Los brotes tiernos fueron desfoliados y seccionados en segmentos que contenían de dos a tres yemas cada uno, y que se desinfectaron con una solución compuesta con hipoclorito de sodio (NaClO) marca *Ayudin*® al 25% (1% de cloro activo) y unas gotas de detergente, durante 20 minutos, seguida de HgCl₂ al 0,1%, 5 minutos. Los explantos se enjuagaron tres veces con abundante agua estéril entre cada desinfectante y al final del tratamiento. De esta manera, los explantos quedaron preparados para ser colocados en el medio de cultivo de iniciación.

Etapas de la micropropagación, medios de cultivo usados y condiciones de cultivo

Iniciación

Los explantos desinfectados fueron colocados en tubos que contenían medio de iniciación hasta la brotación de sus yemas, mientras que los contaminados fueron descartados.

El medio usado para la iniciación de los cultivos fue el de Murashige y Skoog (1962), solución salina básica más los orgánicos de iniciación: (mg/l) mio-inositol 100; tiamina 0,1; glicina, 2. Se agregó sacarosa 30 g/l y, en algunos casos, se agregó benzil amino purina (BA), según la necesidad y el momento del año en que fueron tomados los brotes de las plantas madres.

Multiplicación

Los explantos brotados en el medio de iniciación fueron transferidos a frascos que contenían medio de multiplicación para comenzar su reproducción vegetativa o micropropagación. Cada 28 a 30 días se realizaron los repiques o subcultivos de los explantos. Los brotes fueron multiplicados en el medio de cultivo descrito por Radice y col. (1999), que consiste en:

Solución salina básica de Murashige y Skoog (1962): (mg/l) Macronutrientes: NH₄NO₃, 1650; KNO₃, 1900; CaCl₂·2H₂O, 440; MgSO₄·7H₂O, 370; KH₂PO₄, 170;

Quelante: Na EDTA, 37,23 + FeSO₄7H₂O, 27,95 = FeEDTA;

Micronutrientes: KI, 0,83; H₃BO₃, 6,2; MnSO₄4H₂O, 22,3; ZnSO₄7H₂O, 8,6; Na₂MoO₄2H₂O, 0,25; CuSO₄5H₂O, 0,025; CoCl₂6H₂O, 0,025.

Composición orgánica de *Prunus*: MSP (Radice y col., 1999) (mg/l): mio-inositol, 100; tiamina, 0,1; glicina, 2; piridoxina, 0,1; pantotenato de Ca, 0,1; ácido nicotínico, 0,1; biotina, 0,1; riboflavina, 0,5; ácido ascórbico, 10.

Reguladores del crecimiento agregados: ácido giberélico (GA₃) 0,1 mg/l + benzil amino purina (BA) 0,5 mg/l.

Enraizamiento

Los brotes o microestacas que alcanzaron 2 cm de longitud fueron pasados al medio de enraizamiento (Perelman y Caso, 2000) que se describe a continuación.

Solución salina básica de enraizamiento

Se realizaron modificaciones sobre la base de la solución salina básica de Murashige y Skoog usada para la etapa de multiplicación. Se redujeron los nitratos a la mitad de la solución salina y el FeEDTA se duplicó. Se agregó la composición orgánica de *Prunus* (MSP) descrita y, además, se agregó 1mg/l de ácido indol butírico (IBA).

Los brotes se mantuvieron en oscuridad la primera semana de cultivo, y luego fueron transferidos al fotoperíodo normal. Permanecieron en el medio de enraizamiento 28 días.

Condiciones de cultivo y fraccionamiento de los medios

Los medios de iniciación fueron distribuidos en fracciones de 10 ml, en tubos de vidrio de 45 ml de capacidad; por otra parte, los medios de multiplicación fueron fraccionados de a 50 ml y envasados en frascos de vidrio de 350 ml, con tapa de plástico opaca. Para los de enraizamiento se usaron frascos de 160 ml de capacidad con 25 ml de medio.

Todos los medios de cultivo usados fueron suplementados con sacarosa al 3%; para que los medios fueran semisólidos se agregó agar 7 g/l, se ajustaron a pH 5,8 ± 0,02 con KOH 1N. La esterilización se llevó a cabo en autoclave durante 20 minutos a 0,1 MPa.

Las condiciones de cultivo del material vegetal para las diferentes etapas de la micropropagación fueron 24 ± 2 °C de temperatura con un fotoperíodo de 16 horas, suministrado por tubos Philips TLT 110 W/54 RS de luz blanca fría.

Aclimatación

Las plantas enraizadas se aclimataron en macetas o en cajones que contenían un sustrato estéril compuesto por perlita, turba y acículas trituradas de pino, en partes iguales. Durante aproximadamente 20 a 25 días se mantuvieron en una cámara con condiciones controladas de luz, temperatura de 24 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h. Durante la primera semana las plantas crecen con altos niveles de humedad (≥ 80% HR) que se reduce en forma gradual durante los días siguientes.

Al final de ese período las plantas están en condiciones de pasar a invernáculo. El tiempo necesario para la aclimatación completa de los brotes es de aproximadamente 45 días.

Preparación histológica

Fijación

Se usaron dos soluciones de fijación: formol-ácido acético-alcohol (FAA) y la otra, formol-ácido acético (FOA). Las raíces de los brotes aclimatados 60 días se fijaron en FAA. Las raíces de los brotes crecidos *in vitro* y las raíces de los brotes aclimatados 45 días se fijaron en FOA.

Inclusión

La inclusión se realizó mediante la técnica de Johansen descrita por Dizeo de Strittmatter, (2000).

Cortes

Los cortes transversales y longitudinales de todas las raíces se realizaron con micrótomo minot y de deslizamiento, a 9 μm. Los cortes transversales siempre se realizaron en la zona media de la raíz.

Coloración

Para determinar la estructura histológica de la raíz la coloración utilizada fue safranina-*fast green*.

Muestras

Para cada etapa en estudio se cortaron transversalmente 10 raíces en cortes seriados.

Técnicas histoquímicas

Se realizaron reacciones de caracterización para observar diferencias en las raíces crecidas *in vitro* y en las raíces que se encontraban 45 días aclimatadas. Las técnicas histoquímicas usadas fueron: Sudán III para identificación de grasas, Lugol para detección de almidones y cloruro férrico para la identificación de taninos (D'Ambrogio, 1986).

Resultados

Cortes con safranina fast-green

Raíces de brotes crecidos *in vitro*

El aspecto general del corte transversal de los brotes crecidos *in vitro* se corresponde con una raíz primaria de *Prunus*, tipo tetraarca (Esau, 1953).

En estas raíces se observó, de afuera hacia adentro: a) una corteza de una sola capa de células fuertemente coloreada con safranina; b) dos capas de células de parénquima cortical; c) varias capas de tejido parenquimático con abundantes células que presentan contenidos; d) una endodermis fuertemente teñida, que

significa presencia de células con contenidos abundantes; se observó, además, que la endodermis puede presentar de una a tres capas de células fuertemente teñidas; e) el periciclo levemente teñido con safranina presenta una sola capa de células ovoidales; f) entre cuatro y cinco capas de células de parénquima floemático rodeando al tejido xilemático que presenta grandes vasos y fibras no lignificadas de paredes celulares gruesas (Figura 1 a, b y c).

Raíces de brotes aclimatados 45 días

Las raíces de los brotes aclimatados 45 días, coloreadas con safranina-*fast green* presentan una típica estructura tetraarca, muy similar a lo observado en las raíces de *in vitro*, pero con algunas diferencias: los contenidos celulares están restringidos a la endodermis, en una sola capa de células (Figura 2 a, b) en los brotes aclimatados 45 días.

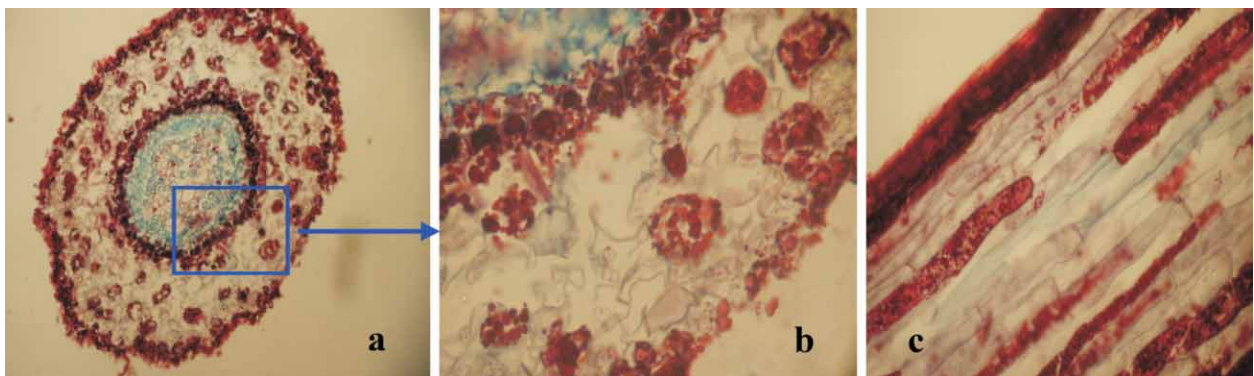
Cuando se estudiaron con safranina-*fast green* las raíces de los brotes que permanecieron 60 días en aclimatación, se observó que presentaban el aspecto típico de las raíces con crecimiento secundario (Figura 3 a y b).

Análisis histoquímico

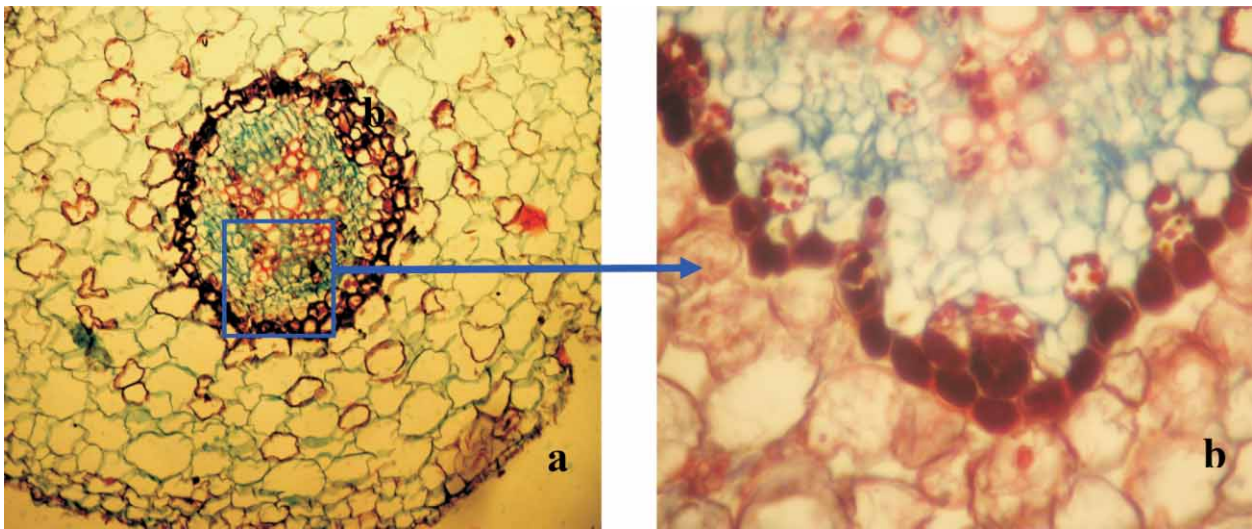
Reacción de Sudán III

En las raíces procedentes de brotes de *in vitro*, esta reacción resultó positiva en las células del

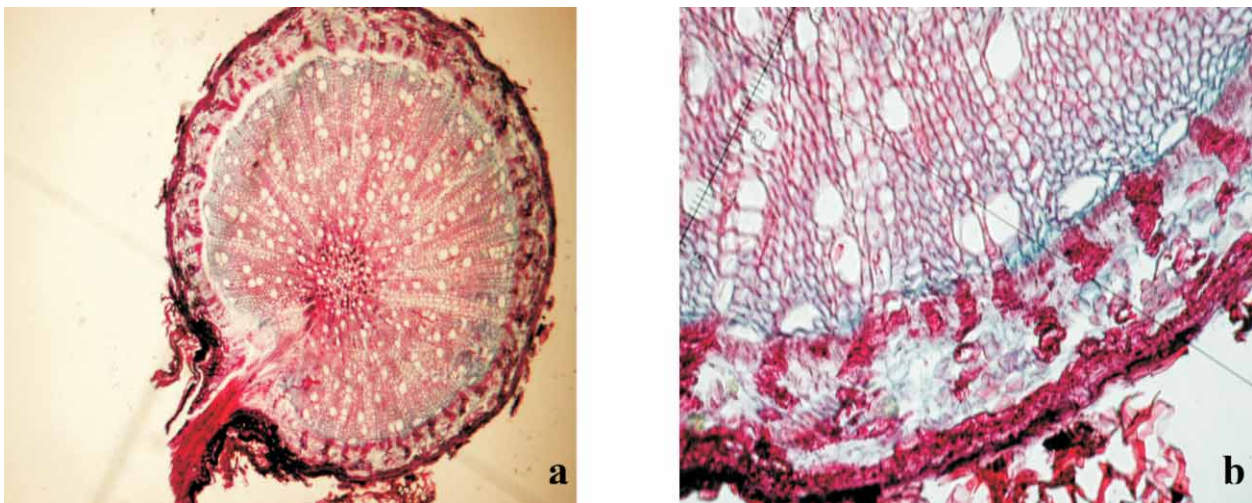
Figura 1.- Transcorte de raíz de brotes crecidos *in vitro*



a) Observación de raíz primaria tetraarca. Presencia de endodermis de varias capas y contenidos celulares. Aumento: 100 x. b) Detalle de endodermis, periciclo y células del parénquima con contenidos celulares. Aumento: 400 x. c) Corte longitudinal. Aumento: 400 x.

Figura 2.- Transcorte de raíz aclimatada 45 días

a) Se observan contenidos celulares en la endodermis. Aumento: 200 x. b) Detalle de la endodermis de raíz. Aumento: 400 x.

Figura 3.- Corte transversal de raíz aclimatada 60 días, con crecimiento secundario

a) Aumento: 100 x. b) Detalle de la corteza y del leño. Aumento: 200 x.

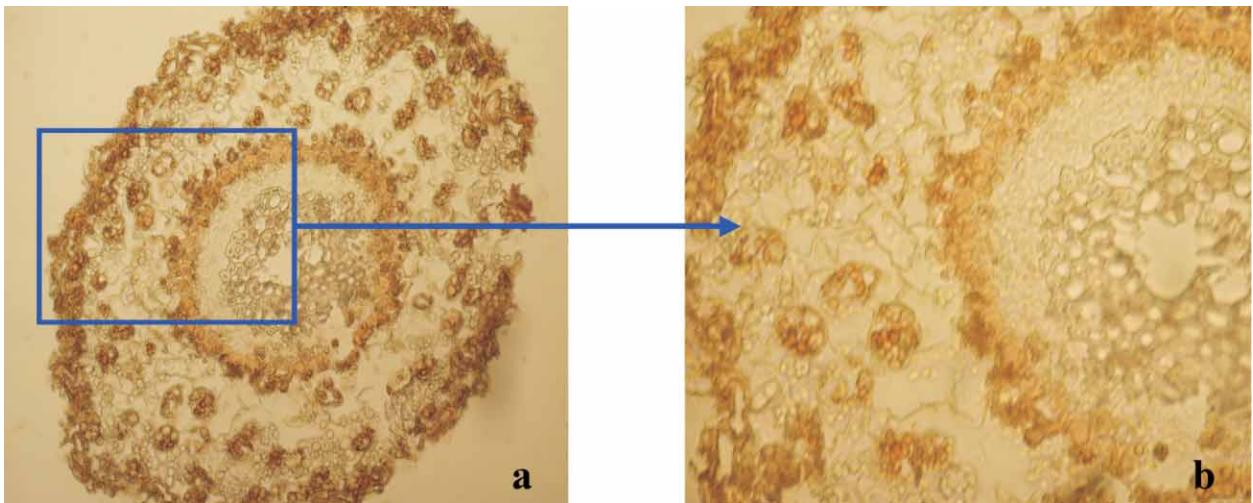
parénquima cortical, en la endodermis y en las células de la epidermis, donde se observaron contenidos grumosos de grasas (Figura 4 a y b).

En las raíces de los brotes aclimatados por 45 días, se observó que algunas células de la endodermis presentaron contenidos de grasa en su interior (Figura 5), de modo quedó restringida esta reacción a la única capa de células de la endodermis.

Reacción de Lugol

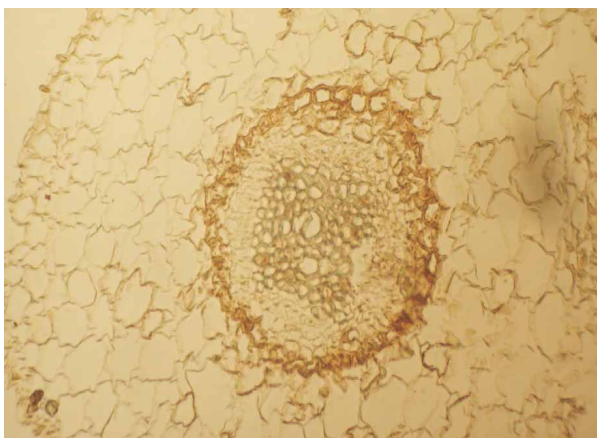
En los cortes de las raíces procedentes de cultivos *in vitro* se observó que la mayoría de las células de los parénquimas radical y cortical, y del periciclo presentan abundante contenido de almidón. El almidón atraviesa la endodermis y se acumula en el periciclo que rodea los parénquimas floemático y xilemático (Figura 6).

Figura 4.- Reacción de Sudán III en raíces de brotes crecidos *in vitro*



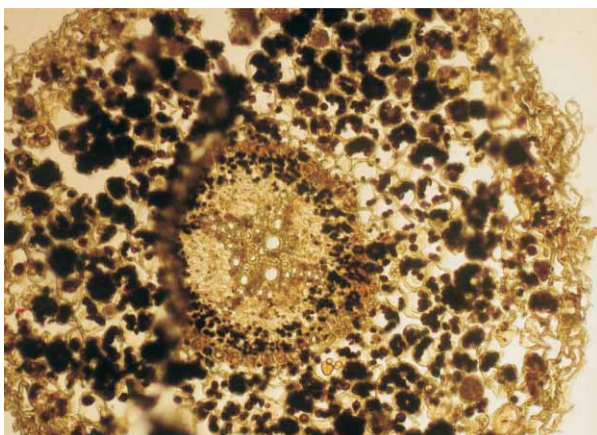
a) Raíz procedente de brotes *in vitro*. Aumento 200 x. b) Detalle de la raíz. Aumento: 400 x.

Figura 5.- Reacción de Sudan III en raíces aclimatadas 45 días



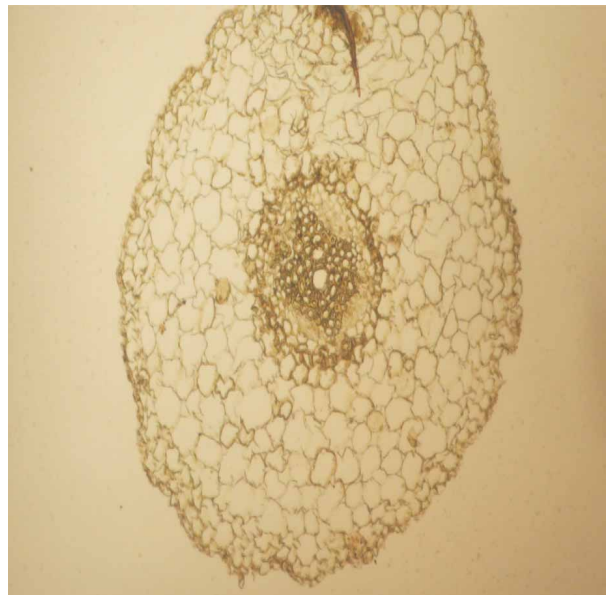
Aumento 100 x .

Figura 6.- Reacción de Lugol en raíces de brotes crecidos *in vitro*



Corte transversal de la raíz. Aumento: 200 x.

Figura 7.- Reacción de Lugol en raíces aclimatadas 45 días



Corte transversal de la raíz. Aumento: 100 x.

En los cortes transversales de raíz, provenientes de los brotes aclimatados durante 45 días, no se observó la presencia de almidón en las células radicales (Figura 7).

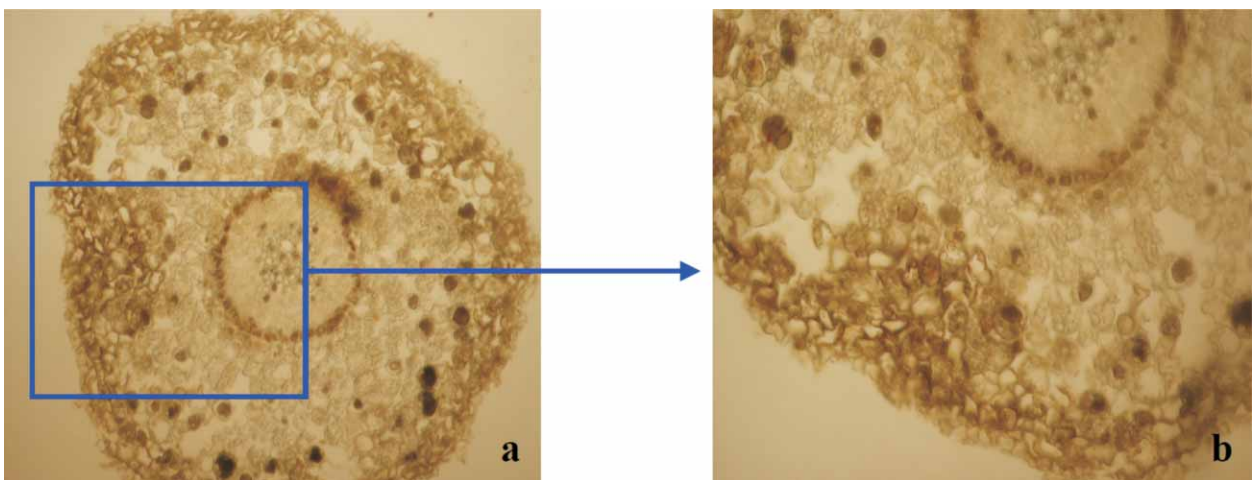
Reacción de cloruro férrico

Los contenidos de taninos que se observaron en los

cortes transversales de las raíces provenientes de los brotes cultivados *in vitro*, presentaron una distribución más abundante en el parénquima más próximo a la corteza; también se encontraron en la endodermis y en los vasos del xilema (Figura 8).

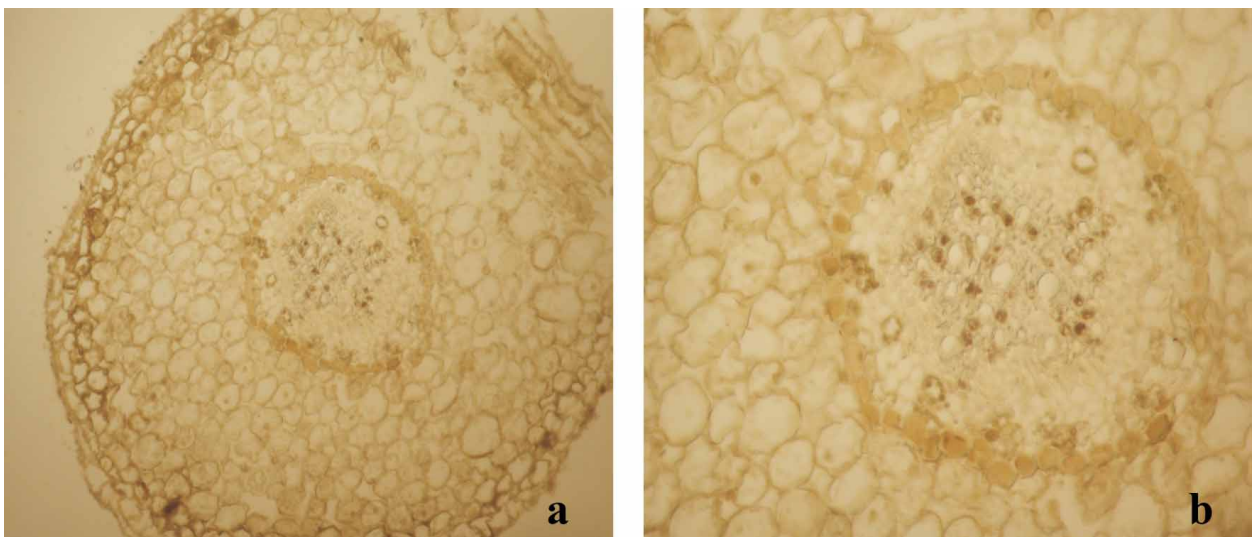
En las raíces de las plantas aclimatadas 45 días esta reacción solo mostró taninos en el parénquima xilemático (Figura 9 a y b).

Figura 8.- Cloruro férrico en raíces de brotes crecidos *in vitro*



Corte transversal de la raíz, se puede observar la distribución de taninos en el parénquima, en la endodermis y en los vasos del xilema. a) Aumento: 100 x. b) Aumento: 200 x.

Figura 9.- Reacción cloruro férrico en raíces aclimatadas 45 días



Corte transversal, se observa reacción positiva en los vasos del xilema. a) Aumento: 100 x. b) Aumento: 200 x.

Conclusiones

Los cortes del material cultivado *in vitro* con la coloración de safranina-*fast green* presentan en el parénquima gran cantidad de contenidos celulares muy coloreados y, en las reacciones histoquímicas, abundantes sustancias de reserva (SR), que podría deberse a la acumulación de SR durante el período *in vitro*, ya que durante la etapa de micropropagación las plantas se vuelven heterótrofas debido al agregado externo de nutrientes e hidratos de carbono.

Los cortes de las raíces de los brotes aclimatados durante 45 días no presentan sustancias de reserva, o son muy escasas y restringidas al parénquima xilemático o a la endodermis, en algunos casos (taninos y grasas). Es de esperar que los nutrientes que aparecen durante la etapa *in vitro* sean usados para superar la aclimatación o la rusticación, por esa razón los cortes de esta etapa no presentan contenidos, o son muy escasos en los parénquimas radicales, además de volver al hábito autótrofo.

Las sustancias de reserva que se observaron con la coloración de safranina-*fast green* son fundamentalmente grasas combinadas con almidón y taninos, como lo demostraron los análisis histoquímicos.

Referencias bibliográficas

Brainerd, K.E.; Fuchigami, L.H. (1981). "Leaf anatomy and stomatal functioning in the accli-

matization of tissue cultured apples and plums". *New Horizons*: 24-26.

Brainerd, K.E.; Fuchigami, L.H.; Kwiatkowski, S. and Clark, C.S. (1981). "Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments". *Hort Science* 16: 173-175.

D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur S.A.

Dizeo de Strittmatter, C. (2000). "Modificación de la técnica de inclusión en parafina de Johansen". *Dominguezia* 16(1): 55-58.

Esau, K. (1953). *Plant Anatomy* (2nd Edition), chapter 17. John Wileys & Sons, New York: 513-514.

George, E. (1993). "Factors affecting Growth and Morphogenesis", (Chapter 7). In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1 (2nd edition). Exegetics, Edington.

Perelman, P. and Caso, O. (2000). "Root formation by microshoots of *Prunus insititia* L., rootstock GF 655/2 in an auxin-free medium". *Phyton Int J Exp Bot* 69: 65-69.

Preece, J.E. and Sutter, E.G. (1991). "Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field". In: Deberg, P.C. and Zimmerman, R.H. *Micropropagation Technology And Application*. Kluwer Academy Publisher Dordrecht, Amsterdam: 71-94.

Radice, S.; Perelman, P. and Caso, O. (1999). "Clonal propagation of three rootstocks of the genus *Prunus* for the 'Flooding Pampa'". *Phyton Int J Exp Bot* 64: 149-156.