

11134
CENARGEN
1998

FL-11134

Boletim de Pesquisa	ISSN 0102-0129
Número, 3	Dezembro, 1998

**Técnica de Clareamento Modificada
na Análise de Sacos Embrionários
em *Brachiaria* e *Paspalum*
(*Gramineae*) Através da Microscopia
Interferencial**



Técnica de clareamento
1998 FL-11134

Genética e Biotecnologia



39567-1

República Federativa do Brasil
Presidente
Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Ministro
Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa
Diretor - Presidente
Alberto Duque Portugal

Diretores - Executivos
Elza Angela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres
Dante Daniel Giacomelli Scolari

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Chefe Geral
Afonso Celso Candeira Valois

Chefia Adjunta de Pesquisa e Desenvolvimento
Maria Cléria Valadares-Inglis

Chefia Adjunta de Comunicação, Negócios e Apoio
José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefia Adjunta de Administração
Kazuyoshi Ofugi

Boletim de Pesquisa, n.º 3

ISSN 0102-0129

**Técnica de Clareamento Modificada
na Análise de Sacos Embrionários
em *Brachiaria* e *Paspalum*
(*Gramineae*) Através da Microscopia
Interferencial**

MARISA TONIOLO POZZOBON
ANA CLAÚDIA GUERRA DE ARAÚJO

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF
1998

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Boletim de Pesquisa, N.º 3

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

SAIN Parque Rural – Final Av. W/5 Norte – Brasília, DF

CEP: 70770-900 Caixa Postal: 02372

PABX: (061) 340-3600 Tel: (061) 348-4700

Fax: (061) 340-3624 Telex: (061) 1622

Comitê de Publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Edna Stella Brito Garcia Costa Manso

Maria Regina Jorge Soares

Marcos Rodrigues de Faria

Marisa de Goes

Suplentes: Antônio Emídio Dias F. da Silva

Rui Américo Mendes

Editora Chefe : Marisa de Goes

Tratamento Editorial e

Normalização Bibliográfica: Miraci de Arruda Camara Pontual

Maria Regina Jorge Soares

Editoração Eletrônica: Roger Anderson Mayeda

Tiragem: 500 exemplares.

**POZZOBON, M.T.; ARAÚJO, A.C.G. de. Técnica de
clareamento modificada na análise de sacos
embrionários em *Brachiaria* e *Paspalum* (*Gramineae*)
através da microscopia interferencial. Brasília: Embrapa
- Cenargen, 1998. 17 p. (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 3).**

**1. Planta-Reprodução. 2. Planta gramínea forrageira-
Reprodução.**

CDD 575.6

© Embrapa – 1998

APRESENTAÇÃO

Além da maior biodiversidade do planeta que possui o Brasil quanto a animais, plantas e microrganismos, em nosso país encontra-se um enorme rebanho bovino com cerca de 167 milhões de cabeça, importantíssimo para a segurança alimentar da população brasileira e para um grande rendimento econômico oriundo das exportações de carne e outros derivados.

Para assegurar uma consistente pecuária bovina, intensiva e extensiva, muito contribui a introdução e condução de pastagens bem formadas, usando fenômenos biológicos que garantem a continuidade da estabilidade e identidade genética das cultivares exploradas. Para o Brasil, com extensas áreas aptas para o estabelecimento de gramíneas, isto constitui um dos pilares da cadeia produtiva da bovinocultura, concorrendo para o sucesso do agronegócio.

Um dos fenômenos da reprodução de plantas é a apomixia, evento capaz de oferecer ao criador a segurança no estabelecimento das pastagens por um processo eficaz e econômico, com a certeza da manutenção da identidade da espécie em relação a sua procedência.

Para bem explorar o fenômeno da apomixia é de maior importância o incremento das pesquisas com o uso de gramíneas como as dos gêneros *Brachiaria* e *Paspalum*, de modo a tornar o evento ainda mais conhecido e útil à exploração das pastagens sustentáveis.

No presente trabalho as autoras mostram uma técnica de análise de sacos embrionários com a aplicação da microscopia interferencial, usando as duas importantes gramíneas forrageiras.

É com enorme satisfação e extrema atenção aos leitores, que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia apresenta à comunidade técnico-científica e aos demais usuários, os resultados dos estudos efetuados, fruto da dedicação, competência e desprendimento das suas autoras.

Afonso Celso Candeira Valois
Chefe Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

SUMARIO

Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução	9
2. Material e Métodos	10
3. Resultados e Discussão	11
4. Referências Bibliográficas	13
5. Anexo	14

TÉCNICA DE CLAREAMENTO MODIFICADA NA ANÁLISE DE SACOS EMBRIONÁRIOS EM *Brachiaria* E *Paspalum* (Gramineae) ATRAVÉS DA MICROSCOPIA INTERFERENCIAL

Marisa Toniolo Pozzobon¹
Ana Cláudia Guerra de Araújo²

RESUMO

A aplicação de técnicas citológicas e histológicas nas análises de rotina feita com espécimens incluídos em parafina, é extremamente demorada e laboriosa, enquanto que a técnica de clareamento, associada a microscopia interferencial, apresenta rapidez e eficiência, principalmente nos estudos envolvendo grande quantidade de amostras. Esta técnica é amplamente utilizada em plantas, principalmente em estudos do sistema vascular foliar e de flores, auxiliando neste último, a determinação do tipo de saco embrionário presente nos ovários. Isto permite de forma rápida, correlacionar o tipo destas estruturas ao modo de reprodução de diferentes espécies de plantas, incluindo gramíneas. Para programas de melhoramento em *Brachiaria* e *Paspalum*, é essencial a determinação do modo de reprodução através da identificação do tipo de saco embrionário, pois estes gêneros de plantas apresentam dentro de uma mesma espécie, o modo de reprodução do tipo apomítico (com partenogênese e pseudogamia), além do sexual. Os sacos das plantas apomíticas estão organizados como em *Panicum* (quatro núcleos polarizados) enquanto os sacos meióticos ou reduzidos, presentes nas plantas com modo de reprodução sexual, estão organizados como em *Polygonum*, onde quatro células estão na região micropilar e central e as outras três, correspondendo as antípodas, estão na região chalazal do gametófito. O presente trabalho demonstra a eficiência da análise de sacos embrionários nestes grupos de plantas através de uma técnica de clareamento modificada.

Termos para indexação:

Brachiaria, *Paspalum*, saco embrionário, microscopia interferencial, modo de reprodução.

¹Eng^a Agr^a MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

²Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

ANALYSIS OF *Brachiaria* AND *Paspalum* (Gramineae) EMBRYO SACS USING HERB'S CLEARING MODIFIED TECHNIQUE AND INTERFERENCIAL MICROSCOPY.

ABSTRACT

*Routine analysis of histologically processed samples is a time and money consuming technique while the clearing technique associated to the interferencial microscopy is faster and more efficient when numerous samples must be analyzed. This technique is very useful for leaves and flowers vascular system as also for embryo sac type determination, which enables the correlation with the reproductive mode of the plant, including gramineae. In consequence of the simultaneous presence of the apomictic (with parthenogenesis and pseudogamis) and sexual reproductive modes in many specie of *Brachiaria* and *Paspalum*, the knowledge of the mode of reproduction is essential for the success of the breeding programs. In these specie, ovules from apomictic genotypes present the Panicum type of embryo sac (four polarized nuclei) and the meiotically reduced embryo sac, present in the genotypes with sexual behavior, show the Polygonum organization, where four cells are situated at the micropylar and central region of the sac and the other three cells, corresponding to the antipods, are situated at the chalazal region. In the present paper we demonstrate the efficiency of embryo sac analysis in these plants using a clarification modified technique.*

Index terms: *Brachiaria*, *Paspalum*, embryo sac, interferencial microscopy, mode of reproduction

1. INTRODUÇÃO

Como na maioria das gramíneas, os gêneros *Paspalum* e *Brachiaria* apresentam o modo de reprodução apomítico, através da aposporia. Este modo de reprodução está associado ao nível de ploidia, principalmente a tetraploidia. Os sacos embrionários estão organizados como em *Panicum* com quatro núcleos polarizados. No entanto, a maioria destas espécies tetraplóides possui citotipos coespecíficos diplóides sexuais, cujos sacos embrionários estão organizados como em *Polygonum* com oito núcleos. A determinação do modo de reprodução nestes gêneros de plantas é fundamental para a viabilização do seu uso em programas que visam o melhoramento genético e esta classificação pode ser obtida através da identificação do tipo de saco embrionário presente nos ovários.

As técnicas clássicas de citologia e histologia, através de análise de cortes seriados de ovários previamente incluídos em parafina são utilizadas nos estudos do desenvolvimento do gametófito feminino. Entretanto, são técnicas que demandam muito tempo e cujo resultado nem sempre é confiável devido ao reduzido número de amostras analisadas. Além disto, as imagens seriadas podem ser de difícil interpretação. Técnicas de clareamento de tecidos vegetais foram utilizadas para se estudos de vascularização floral e foliar. Estas técnicas foram revistas por Herr em 1971, que as adaptou para a observação do óvulo *in toto*, mantendo intactas as estruturas celulares (sem corte, sem esmagamento). A determinação do modo de reprodução através da análise do tipo do saco embrionário, utilizando o clareamento associado a microscopia de contraste de fase ou de contraste interferencial, vem sendo também realizada em gramíneas como *Panicum* (Savidan, 1982),

Brachiaria (Valle, 1986), *Paspalum* (Quarin et al., 1997) e *Pennisetum* (Vielle et al., 1995).

Através de uma modificação na solução de clareamento de Herr, Levieil & Huyghe (1985) adaptaram a técnica, permitindo de forma mais rápida, o estudo da gametogênese masculina e feminina, do fenômeno da poliembrionia espontânea e outros eventos da reprodução em *Cichorium intybus* L. e *Linum usitatissimum* L.

Visando portanto a simplificação das técnicas anteriormente utilizadas para análises de sacos embrionários, foi feita uma adaptação que resulta em uma técnica mais rápida que utiliza menos reagentes tóxicos, que permitiu a determinação do modo de reprodução de acessos de *Paspalum* e *Brachiaria* de forma mais rápida e eficiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Ovários maduros (2-3 dias antes da antese) foram isolados a partir de inflorescências de acessos de germoplasma de *Brachiaria brizantha* (BRA-002747, BRA-000591) e *Paspalum sp.* V 13933 (BRA-020907), mantidos sob condições de campo e telado, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. O material foi fixado em solução de etanol contendo 5% de ácido acético e 5% de formaldeído (FAA) durante um período 24 h à 4° C. Após fixação, seguiu-se um pré-tratamento em solução de ácido láctico 85% durante um período de 24h, à temperatura ambiente, e finalmente realizado o clareamento com o uso da solução descrita por Levieil & Huyghe (1985), composta por ácido láctico 85% e fenol, 1:1 em peso, durante 2 h à temperatura ambiente. Eventualmente foi possível isolar óvulos dos ovários através de esmagamento. Cinco a dez ovários de

cada variedade das duas espécies foram montados em lâminas especialmente preparadas para evitar pressão da lamínula sobre os ovários, utilizando como meio de montagem, a solução de clareamento. As análises foram realizadas em microscópio Axiophot, Zeiss, utilizando a microscopia de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica modificada de clareamento de ovários de *B. brizantha* e *Paspalum* sp. utilizada neste trabalho, permitiu de forma rápida e simples, resultados similares ou melhores aos obtidos por técnicas anteriormente usadas. Óvulos que continham sacos embrionários puderam ter esta estrutura facilmente delimitada e as estruturas em seu interior, bem como as adjacentes foram caracterizadas. A técnica permitiu a determinação do número, tamanho e localização dos sacos embrionários, do número e disposição dos núcleos dentro do saco. Foi ainda verificada a relação espacial entre diversos sacos contidos no mesmo óvulo, a variação na forma e tamanho das células nucelares, a organização dos tegumentos, bem como a observação da disposição e estrutura do aparato filiforme e o tamanho e organização das células labiais que formam o canal micropilar. A técnica também permitiu determinar a presença de pré-embriões.

As análises em microscopia de contraste interferencial de ovários de *Paspalum* sp., clareados através da técnica modificada, indicaram a presença de 1-3 sacos embrionários no mesmo óvulo. Em todos os sacos embrionários observados, pode-se detectar a presença, no máximo, de quatro núcleos. A quantidade de sacos presentes, o número e a disposição dos

núcleos observados dentro dos mesmos, associado a sua tetraploidia ($2n = 40$), sugerem que este acesso tem como modo de reprodução, a apomixia.

Nos ovários analisados de *Brachiaria*, observou-se a presença de vários sacos embrionários, também contendo no máximo quatro núcleos no acesso BRA-000591, (tetraplóide $2n = 36$), confirmando assim, o modo de reprodução do tipo apomítico previamente descrito por Valle et al., (1994). A presença de um único saco embrionário, contendo oito núcleos ou mais, característico de sacos meioticamente reduzidos, foi observado no acesso BRA-002747 (diplóide $2n = 18$), confirmando o modo de reprodução do tipo sexual, conforme descrito anteriormente por Valle & Gliênke (1991).

Savidan (1982) considera que, apesar dos bons resultados obtidos nos estudos com *Panicoidaeas* apospóricas, as técnicas estabelecidas por Crane (1978), Young e colaboradores (1979) e a de Herr (1971) apresentam limitações na interpretação dos limites celulares, na diferenciação do citoplasma das antípodas, bem como das células nucelares adjacentes. Entretanto, a presente técnica usada nestes estudos, mostrou-se eficaz para a melhor evidenciação de detalhes celulares dos óvulos examinados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HERR, J. M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperm. *American Journal of Botany*, v.58, n.8, p. 785-790, 1971.
- LEVIEIL, C.; HUYGHE, C. Observation des gamétogenèses mâle et femelle, de la fécondation et de la formation d'embryons non-zygotiques après éclaircissage des anthères et sacs embryonnaire chez *Cichorium intybus* L. et de *Linum usitatissimum* L. *Comptes Rendus Academie des Sciences Paris, Serie III*, , v.301, n. 7, p. 373-378, 1985.
- QUARIN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. H. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands*, v.31, p. 114-116, 1997.
- VALLE, C. B. Citology, mode of reproduction and forage quality of select species of *Brachiaria Griseb* . Urbana: University of Illinois, 1986. Tese Doutorado.
- VALLE, C. B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletter*, v. 3,p. 11-13, 1991.
- VALLE, C. B.; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter*, v. 3,p. 10-11, 1994.
- VIELLE, J. -PH; BURSON, B. L.; BASHAW, E. C.; HUSSEY, M. A. Early events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliare* (L.). *The Plant Journal*, v. 8, p. 309-316, 1995.
- SAVIDAN, Y. Nature et hérédité de l' apomixie chez *Panicum maximum*, Jacq. Paris: Orstom, 1982, 159p.

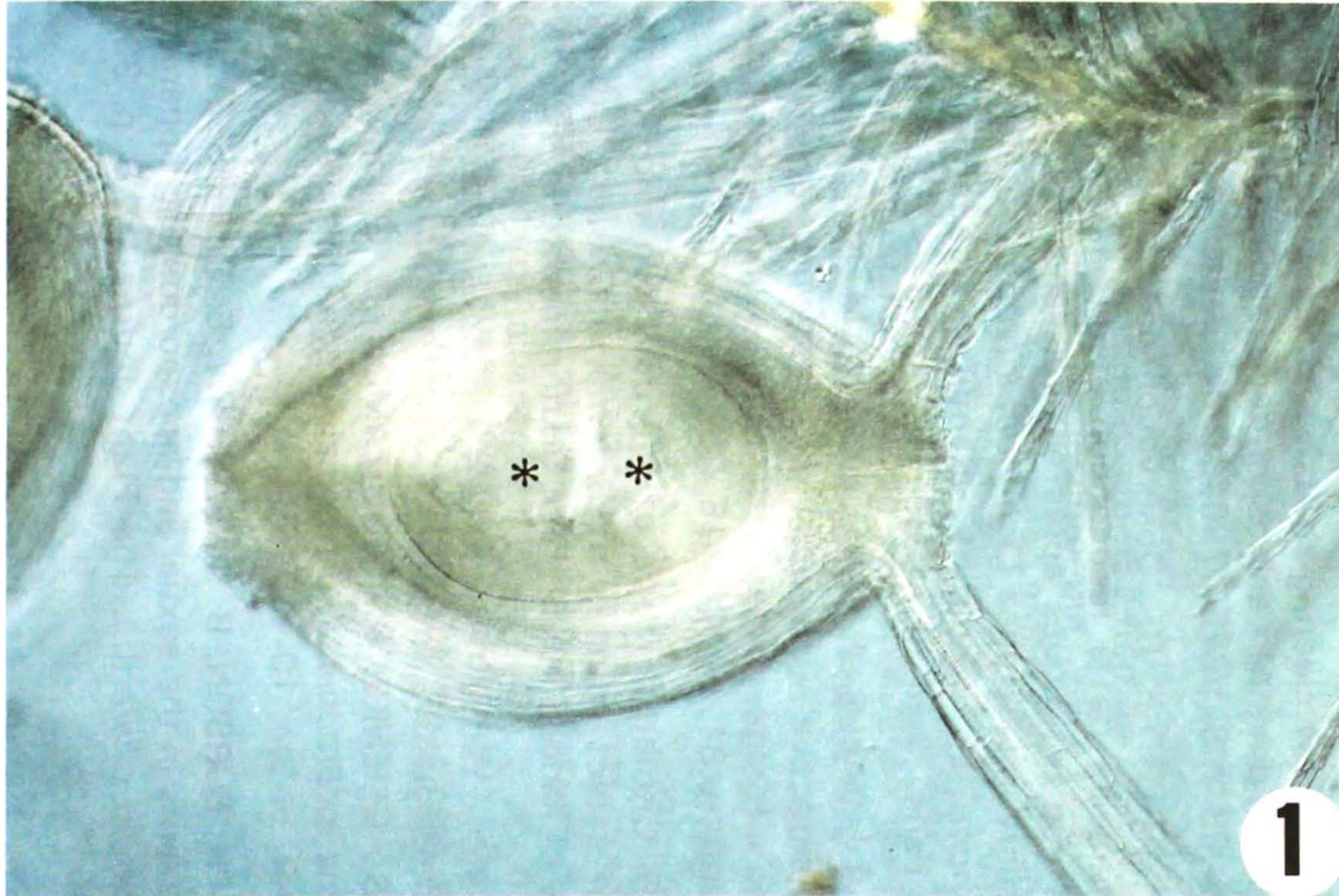


Fig.1. Micrografia óptica de ovários clarificados de *Paspalum sp.*, V 13933, BRA 020907. x 10. Presença de dois sacos embrionários em um mesmo óvulo (*).



Fig.2. Micrografia de ovário clarificado de *Paspalum* sp evidenciando um pró-embrião (E). x 20.

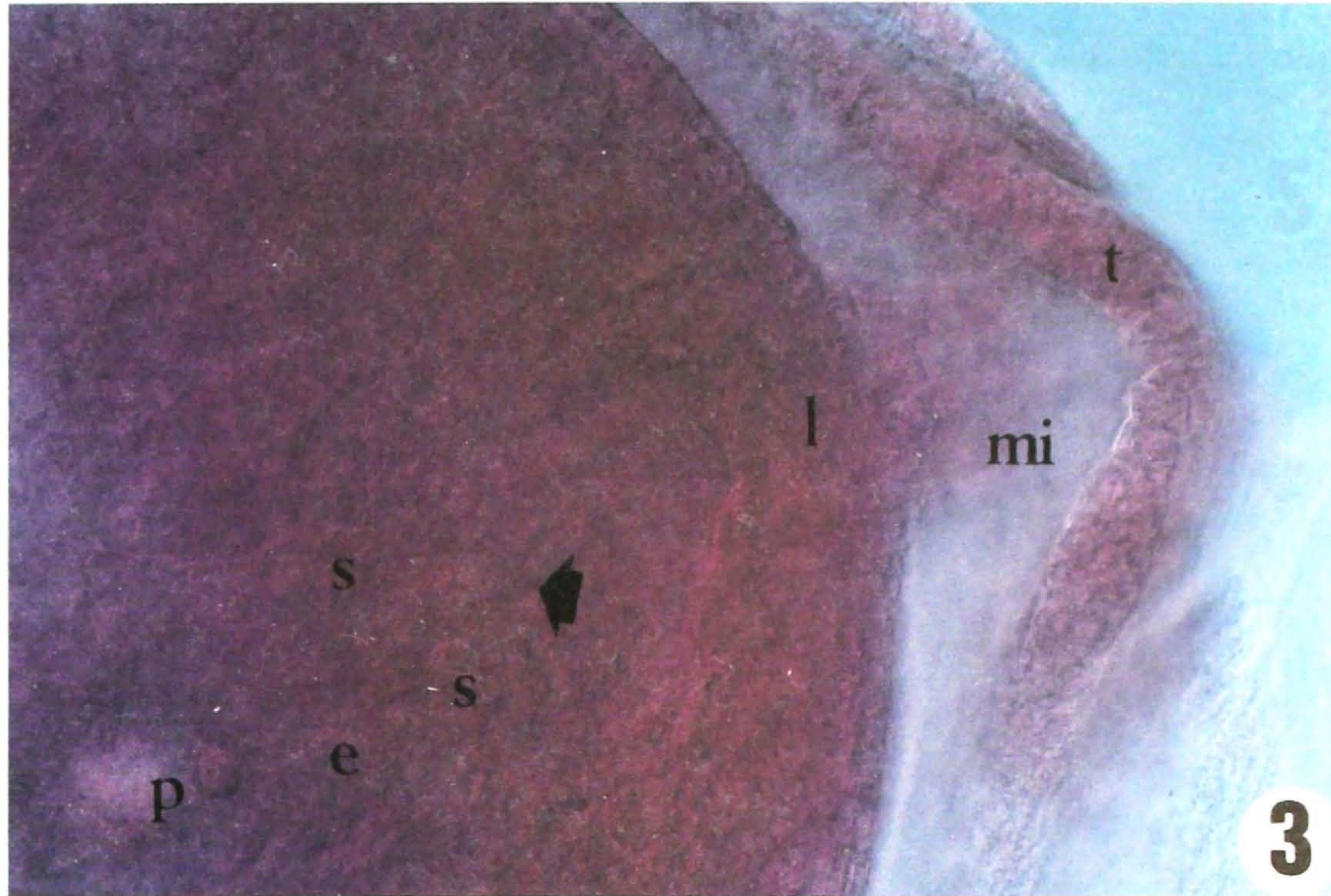


Fig.3. Micrografia óptica de um ovário de *B. brizantha* BRA 000591. Tegumento (t), canal micropilar (mi), células labiais (l), aparato filiforme (♦), núcleos das sinérgidas (s), núcleo da célula-ovo (e), núcleo polar da célula central (p). x 40.

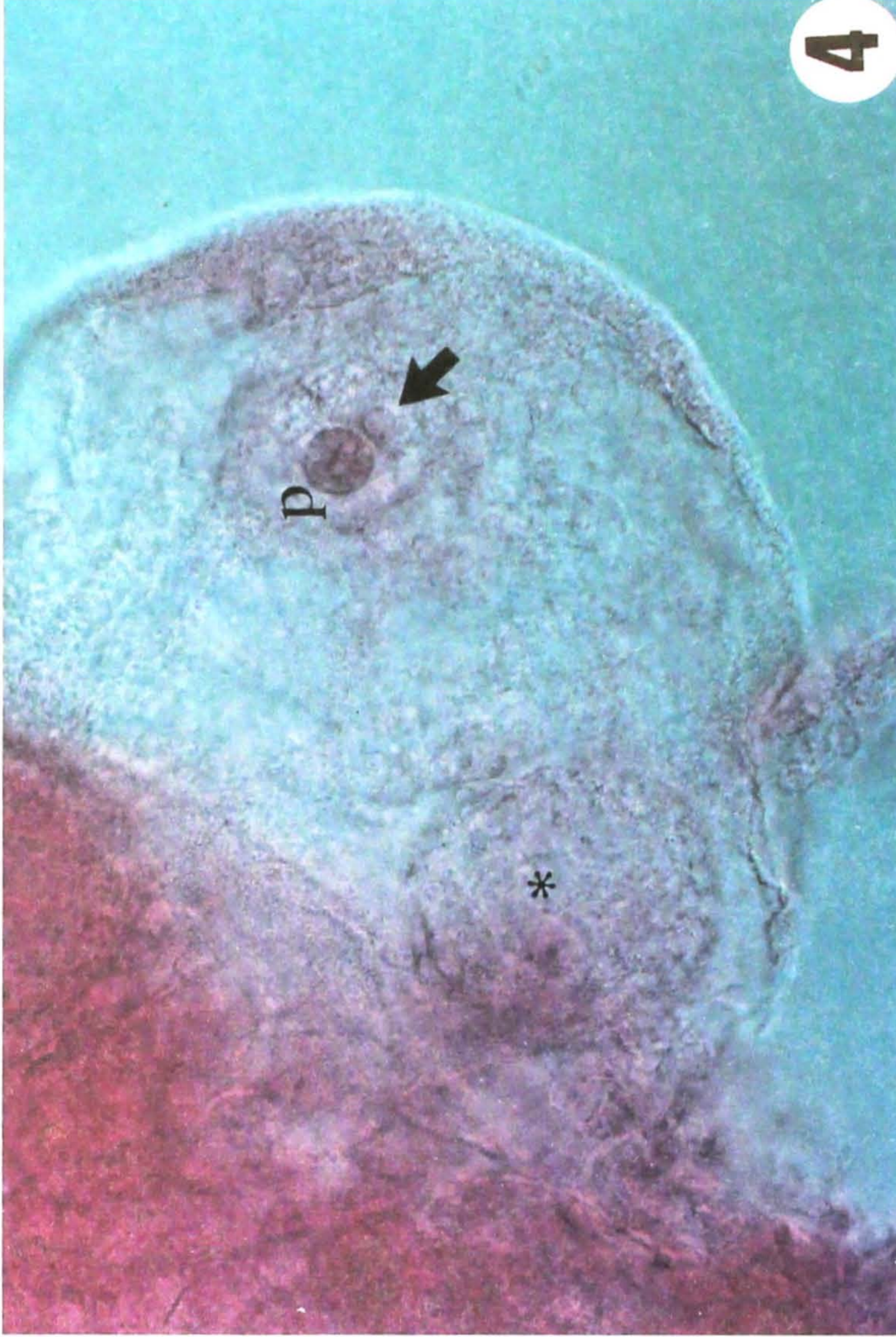


Fig.4. Micrografia do óvulo isolado de *B. brizantha* BRA 000591 antes da antese. Núcleo de um pró-embrião (*), Núcleos polares da célula central (p). Núcleo de pólen (▴). x 20.

