

# Cultura de Anteras de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn

Vanessa Cristina Stein<sup>1</sup>, Renato Paiva<sup>2</sup>, Marcelo Rodrigues<sup>3</sup>, Luciano Coutinho<sup>3</sup>, Diogo Pedrosa<sup>4</sup> e Patrícia Paiva<sup>5</sup>

## Introdução

O *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. é uma espécie pioneira, presente em matas ciliares sazonalmente inundadas, apresentando assim, algumas adaptações anatômicas e morfológicas que a fazem suportar a submersão do seu sistema radicular. Essas características a tornam uma espécie própria para plantios mistos em recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios [12]. No entanto, as sementes de ingazeiro são recalcitrantes e o que impossibilita a de formação de mudas em épocas distintas, ficando inviabilizada a sua inclusão nos programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas [2].

O melhoramento genético tem contribuído com a produção de indivíduos superiores e novas variedades, por meio da recombinação de caracteres selecionados, principalmente para áreas com baixo potencial para reflorestamento [8]. Assim, a obtenção de haplóides pode ser utilizada como suplemento dos programas clássicos de melhoramento pois a indução da haploidia proporciona a manifestação de caracteres genéticos. Esse sistema também facilita a análise genética do material, amplia a eficiência de seleção de características agrônomicas desejáveis, diminui a complexidade do heterozigoto e representa redução do tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas puras [5]. Além disso, é importante em trabalhos envolvendo obtenção de mutantes, fusão somática, mapeamento gênico em duplo-haplóides e, ainda, como alvo para a transferência de genes [9].

Neste contexto, a cultura de anteras e ou micrósporos tem sido extensivamente empregada na produção de linhagens homozigóticas. Essa técnica envolve o cultivo de anteras, ovários e micrósporos, para estimular o desenvolvimento de células gametofíticas haplóides, permitindo a formação de calos ou embriões regeneráveis [5].

A maior dificuldade da aplicação da cultura de anteras consiste na adequação do meio de cultura apropriado, para que ocorra a divisão celular, o processo de ativação e desativação dos genes, no momento e no local apropriados, visando à diferenciação celular e, consequentemente, a obtenção de uma planta [11].

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar

um protocolo de calogênese em anteras de *Inga vera* Will subsp *Affinis* (DC). T.D. Penn.

## Material e métodos

### Material vegetal

Botões florais de ingazeiro foram coletados de populações naturais, localizadas na Universidade Federal de Lavras, no período de agosto a novembro de 2005 e armazenados à temperatura de 10°C por dois dias. Após o armazenamento, os botões florais foram classificados em faixas de diferentes tamanhos: 0,7–1,0; 1,0-1,5; 1,5-2,0 cm.

### Desinfestação e inoculação do material vegetal

Os botões florais foram lavados em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70 %, por 60 segundos e hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo, por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada e os botões foram abertos para o isolamento das anteras.

### Tamanho do botão floral e concentrações de 2,4 D na calogênese de anteras

As anteras provenientes de botões florais, classificadas por tamanho, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog), com 3 % de sacarose, 0,9 mM de polivinilpirrolidona (PVP), 0,25 % de carvão ativado e suplementado com 0; 4,5; 9; 22 e 44 µM de 2,4-D.

### Formulações de sais e fonte de carboidratos na calogênese de anteras.

As anteras provenientes de botões florais (1,0 - 2,0 cm) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo duas formulações de sais, MS e WPM (Lloyd & Mc Cown), e diferentes fontes de carboidratos, (manitol, sorbitol ou sacarose) na concentração de 3%.

Foram adicionados aos meios de cultura 3% de sacarose, 4,5 µM de 2,4-D, 0,9 mM de PVP e 0,25 % de carvão ativado.

### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente

1. Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade de Lavras. Campus Universitário, cx 3037. E-mail: vanessastein@ibest.com.br

2. Professor Adjunto do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário, cx 3037

3. Graduando em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário, cx 3037

4. Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade de Lavras. Campus Universitário, cx.3037.

5. Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário, cx 3037

casualizado, constituído de 10 repetições. Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SAS<sup>®</sup>, pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o escore médio de formação de calos.

## Resultados e Discussão

### Tamanho do botão floral e concentrações de 2,4-D na calogênese de anteras

As concentrações de 2,4-D e os tamanhos de botão floral diferiram estatisticamente na indução de calos em anteras de ingazeiro. Na calogênese de anteras, a concentração de 44 µM de 2,4-D e o botão floral na escala de 0,7 a 1,0 cm proporcionaram os maiores escores calos formados (319), diferindo do controle (164) (Fig. 1).

Para as anteras oriundas de botões com tamanho entre 1,0 e 1,5 a ausência e a concentração de 9 µM de 2,4-D proporcionaram uma maior formação de calos. No entanto, esses escores diferem pouco das outras concentrações de 2,4-D. Já na faixa de 1,5 a 2,0 cm, foi observado um aumento na formação de calos com escore de 270 na concentração de 4,5 µM de 2,4-D e as concentrações superiores a essa apresentaram uma tendência à redução de formação de calos (Fig. 1).

Palú *et al.* [9] relatam que, para *Coffea arabica* L. cultivar Acaia, o aumento da produção de calos em anteras ocorreu até a concentração de 9 µM de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos. Vargas [14] obteve calos em anteras de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizando 9 µM de 2,4-D. Experimentos de calogênese em anteras de *Triticum aestivum* utilizando ácido indol acético (AIA) e 2,4-D, demonstram que o último é mais efetivo na indução de calos em anteras [1]. Sendo que em anteras de *Cucumis sativus* L. cultivar Calypso, inoculadas em meio B5, completado principalmente com 2,5 µM de 2,4-D, desenvolveram calos e embriões globulares em 4 semanas.

Observou-se, também, a formação de calos na região final do filete e no conectivo das anteras. Em algumas espécies, a inclusão de uma determinada concentração de auxina pode desviar o desenvolvimento do micrósporo para induzir a formação de calos a partir do tecido conectivo [13] ou do filete [15].

### Formulações de sais e fonte de carboidratos na calogênese de anteras.

O crescimento e a diferenciação dos calos em anteras são determinados pelas concentrações de sais inorgânicos, principalmente de amônio. Por isso, a relação entre a concentração de amônio e de nitrato é um dos principais fatores na composição do meio de cultura [8]. Além disso, os carboidratos no meio de cultura satisfazem o requerimento de moléculas de carbono como fonte de energia e, em geral, altos índices de sacarose satisfazem à indução de calos em anteras [3].

Portanto, verificou-se que as formulações de sais (MS e WPM) e as fontes de carboidratos diferiram estatisticamente na calogênese de anteras de ingazeiro. Os maiores escores 410 para a formação de calos foram obtidos no meio WPM suplementado com manitol (Fig.

2), sendo esse superior à sacarose e ao sorbitol com score de 190. Já para o meio de cultura MS, a sacarose apresentou os melhores escores, seguida do sorbitol e manitol, que não diferiram estatisticamente, ambos apresentando escore de 280. Portanto, segundo Galletta [4], um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos. Supõe-se que tal equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou a deficiência de qualquer um desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen.

Com relação à fonte de carbono, resultados semelhantes foram observados em micrósporos de arroz e outros cereais [8]. Para anteras de café, a substituição de 5% de sacarose por 5% de maltose proporcionou um incremento significativo na indução de calos [7].

Por outro lado, as altas concentrações de amônio presentes no meio MS combinadas com o manitol, inibiram a formação de calos, mas, quando foi utilizado sorbitol e sacarose, a calogênese no MS apresentou maiores escores do que WPM (Fig. 2).

## Conclusão

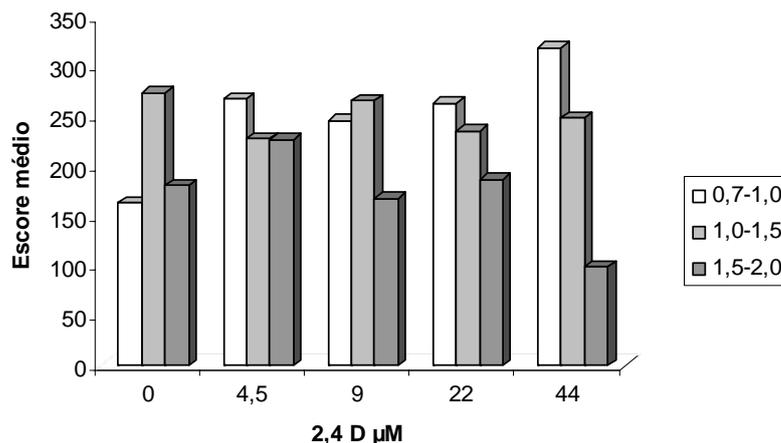
Para os botões florais, a escala de 0,7 a 1,0 mm, combinada com as concentrações 44 µM de 2,4-D, é a mais indicada para a formação dos calos em anteras de ingazeiro.

Quanto à formulação de sais e fonte de carboidratos, os melhores resultados foram obtidos no meio WPM suplementado com manitol.

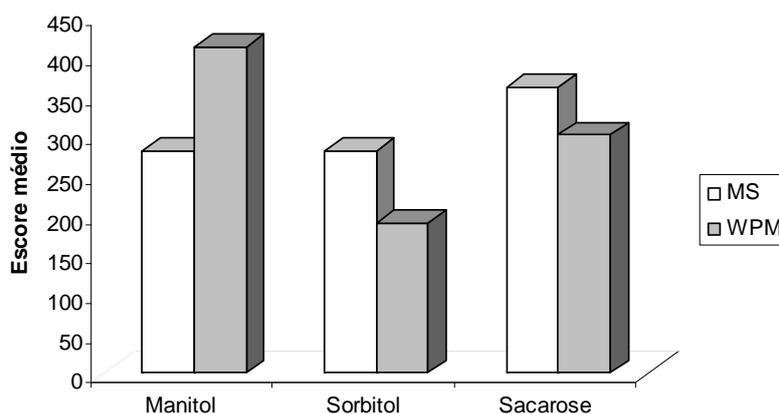
## Referências

- [1] BALL, S.T.; ZHOU H. e KONZAK C. F. 1993. Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Science*, 90(2):195-200.
- [2] BARBEDO, C.J. 1997. *Armazenamento de sementes de Inga uruguensis Hook. & Arn.* Piracicaba. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- [3] CHEN, C.C.; TSAY, H.S.; e HUANG, C.R. 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer Verlag. Berlin, Alemanha. vol 14, p. 193-215.
- [4] GALLETTA, G.J. 1983. Pollen and seed management. In: Moore, J.N. & Janick, J.(eds.). *Methods in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue University Press, p.23-47.
- [5] KARTHA, K.K.; ROCA, W.M. 1993. Role of plant biotechnology in crop improvement. In: ROCA, W.M.; THOR, A.M. (Ed.). *International Scientific meeting of the cassava biotechnology Network*. Centro internacional de agricultura tropical, p.466-476.
- [6] LENTINI, Z.; MARTÍNEZ, C.; ROCA, W. 1997. *Cultivo de anteras de arroz em el desarrollo del gemoplasma*. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 57p.
- [7] LENTINI, Z.; MARTINEZ, C.P. 1992. Aplicaciones of anther culture in rice breeding (cartelera). In CUEVAS-PEREZ, F. (ed.). *Rice in latin america: improvement, management, and marketing*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia. p. 25 - 57
- [8] MENCK, A.L.M.; ODA, S.; MARCHI, E.L.; KOVALKI, M.E. 1999. Influencia de sistema de colheita de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. *Ipef/Scientia Forestalis*, 43/44:20-23.
- [9] PALÚ, E.G.; SILVA, A.B. da; PASQUAL, M. 2004. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia*, 28, ( 4): 736-742.
- [10] RICCIL, A.P.; FILHO, F. de A.A.M.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.M. de S. 2002. Somatic Embryogenesis in *Citrus*

- sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. *Scientia Agricola*, 59(1): 41-46.
- [11] SALOMON, M.V. 2003. Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras. Piracicaba. *Dissertação* (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- [12] SOARES, G. de A. 2003. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]. 107p. *Dissertação* (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- [13] SUNDERLAND, N. 1971. Anther culture: a progress report. *Science Progress*, 59: 527-549.
- [14] VARGAS, D. P. 2006. Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen. *Dissertação* (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.
- [15] WENZEL, G.; FOROUGHI-WEHR, B. 1984. Anther culture of cereals and grasses. In: VASIL, I.K. (Ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. London: Academic Press., v.1, p.311-327.



**Figura 1.** Efeito do 2,4-D e do tamanho do botão floral na indução de calos em anteras de ingazeiro. Escores médios obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, 2006.



**Figura 2.** Efeito do meio de cultura e da fonte de carboidratos na indução de calos em anteras de ingazeiro. Escores médios obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, 2006.