

# Viabilidade do Grão de Pólen e Efeito do PVP na Calogênese de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.

Vanessa Stein<sup>1</sup>, Renato Paiva<sup>2</sup>, Rairys Cravo Nogueira<sup>3</sup>, Cristina Filomena Justo<sup>1,4</sup>,  
Fernanda Carlota Nery<sup>1</sup> e Patrícia Matile Nicioli<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 sistema radicular. Essas características a tornam uma ótima espécie para plantios mistos em recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios [1]. No entanto, as sementes de ingazeiro são recalcitrantes e, pela impossibilidade de formação de mudas em épocas distintas das que são produzidas as sementes em seu habitat, fica inviabilizada a sua inclusão nos programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas [2].

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.

No entanto, uma série de fatores químicos, físicos e genéticos interage de forma complexa, influenciando tanto na indução do embrião haplóide como sua diferenciação em plântula [3]. Dentre os fatores críticos para a indução da androgênese, têm-se o genótipo e as condições fisiológicas da planta doadora, e o estágio de desenvolvimento dos micrósporos [4].

Objetivou-se com este trabalho verificar a viabilidade do grão de pólen e o efeito do PVP na calogênese de anteras de *Inga vera* Will subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn..

## Material e métodos

### A. Viabilidade do grão de pólen

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. Posteriormente fixados em Carnoy (3:1,

etanol:ácido acético), por um período de 2 a 24 horas, à temperatura ambiente e, depois, foram acondicionados em freezer. Para o preparo das lâminas, a fim de avaliar a viabilidade do grão de pólen, as anteras foram isoladas do botão floral em microscópio estereoscópico, esmagadas e coradas com carmim acético 2%. Realizou-se a contagem de 2.000 células/tratamento em microscópio de luz com um aumento de 40x. Foram considerados viáveis os pólenes corados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o Software Statistical Analysis System (SAS<sup>®</sup>). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### B. Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras

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 tríplice lavagem em água destilada e autoclavada e os botões foram abertos para o isolamento das anteras ou ovários.

Após a desinfestação, as anteras provenientes de botões florais com diferentes tamanhos (0,7–1,0; 1,0–1,5; 1,5–2,0 cm) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS, com 3% de sacarose, 4,5µM de 2,4-D, 0,25% de carvão ativado e diferentes concentrações de polivinil-pirrolidona (PVP) (0; 0,9; 1,8; 3,6; 7,2 mM).

## Resultados e discussão

### A. Viabilidade do grão de pólen

Todas as classes de botão floral (0,7–1,0; 1,0–1,5; 1,5–2,0 cm) apresentaram pólenes formados e a viabilidade do grão de pólen não diferiu estatisticamente (Tabela 1).

Há evidências de não existir uniformidade de desenvolvimento dos grãos de pólen entre diferentes anteras de um botão floral ou entre diferentes grãos de pólen de uma mesma antera [5]. Segundo Peters et al. [4], os micrósporos respondem apenas em uma determinada etapa do desenvolvimento, sendo o estágio

1. Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, cx. postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

2. Prof. Adjunto do Depto. de Biologia, Universidade Federal de Lavras, cx. postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

3. Recém Doutora no Setor de Fisiologia Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, cx. postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

4. Profa. Assistente do Depto. de Ciências Biológicas e da Saúde, Instituto de Ciências e Letras do Médio Araguaia, Universidade Federal do Mato Grosso, CEP 78698-000, Pontal do Araguaia – MT.

5. Mestre em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, cx. postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

Autora para contato: vanessastein@ibest.com.br

Apoio financeiro: CAPES

uninucleado o mais adequado para a maioria das espécies. Entretanto, isso não foi observado neste estudo.

Assim, para anteras de café, o estágio ótimo para o desenvolvimento do pólen está entre o uninucleado médio e o binucleado tardio [6]. No entanto, segundo Dao & Shamina [7], observa-se a formação de calos em todos os estágios da microsporogênese de anteras de tomate, embora micrósporos mononucleados e pólenes maduros tenham sido os mais favoráveis para a indução da embriogênese.

#### *B. Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras*

As concentrações de PVP e os tamanhos de botão floral diferiram estatisticamente na indução de calos em anteras de ingazeiro.

Quanto ao tamanho do botão floral, a escala de 0,7 a 1,0 mm proporcionou os maiores escores de calogênese em todas as concentrações de PVP. No entanto, a concentração de 0,9 mM foi a mais eficiente na formação dos calos (Fig. 1).

Para a escala de 1,0 a 1,5 cm, o PVP não interferiu na formação de calos, pois, na ausência deste antioxidante, os escores da calogênese foram muito próximos à concentração mais alta de 7,2 mM. No entanto, para a escala de 1,5 a 2,0 foi observado um aumento na formação de calos nas concentrações de 0,9 e 1,8 mM e uma tendência à redução da calogênese nas concentrações superiores (3,6 e 7,2 mM).

Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e a polimerização. Portanto, os tratamentos mais eficientes na calogênese de anteras foram os que apresentaram

menores escores para coloração marrom, o que caracteriza a oxidação (Fig. 2).

A adição de PVP ao meio de cultura também aumentou significativamente a indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., atingindo a máxima calogênese na dosagem de 1,8 mM. Dosagens superiores a esta passaram a apresentar efeito prejudicial [8].

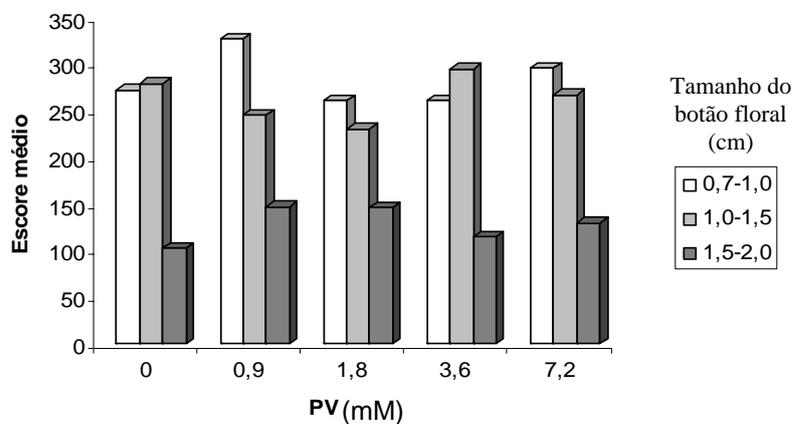
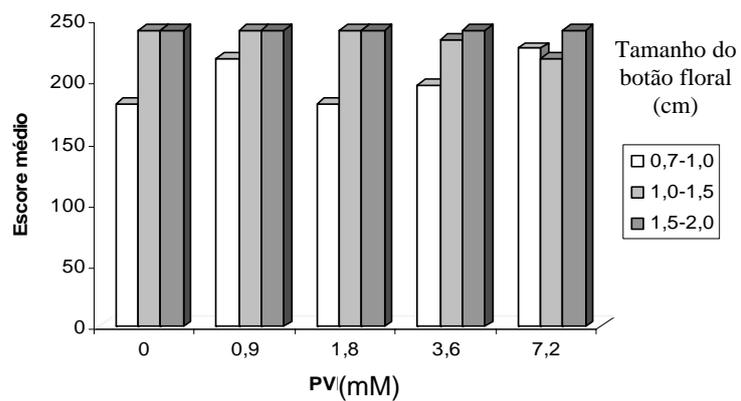
#### **Referências bibliográficas**

- [1] 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.
- [2] BARBEDO, C.J. 1997. *Armazenamento de sementes de Inga uruguensis Hook. & Arn.* Piracicaba. 71p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- [3] SANTOS, E.K. dos. 2003. Totipotência Celular e Cultura de Tecidos Vegetais. In: *Genética & Evolução Vegetal*. /organizado por Loreta Brandão de Freitas e Fernanda Bered - Porto Alegre; Editora da UFRGS.
- [4] PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L. & ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo haplóides. 1998. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSCO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* 2: 569-612.
- [5] MILANI, M. & CARVALHO, J.M.F.C.C. 2005. *Utilização de cultura de anteras no melhoramento de plantas*. Embrapa Algodão. Campina Grande, 26p.
- [6] CHEN, C.C.; TSAY, H.S. & HUANG, C.R. 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and forestry* 14: 193-215.
- [7] DAO, N.T. & SHAMINA, Z.B. 1978. Cultivation of isolated tomato anthers. *Soviet Plant Physiology* 25: 120-126.
- [8] PASCOAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CAMPOS, SANTOS, E.C. & CAMPOS, R.J.C. de. 2002. Indução de calos em anteras de café (*Coffea Arabica* L.) cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia* 26(1): 71-76.

**Tabela 1.** Viabilidade do grão de pólen em anteras de ingazeiro em função do tamanho dos grãos.

<i>Classes</i>	<i>0,7-1,0cm</i>	<i>1,0-1,5cm</i>	<i>1,5-2,0cm</i>
Viabilidade (%)	95,7a	95,3a	95,2a

Letras iguais não diferem entre si, a 5% de significância.

**Figura 1.** Efeito do PVP e do tamanho do botão floral na indução de calos em anteras de ingazeiro.**Figura 2.** Efeito do PVP e do tamanho do botão floral na coloração de calos em anteras de ingazeiro.