

## Análise Ultra-estrutural de Calos de Anteras de Ingazeiro

Stein, Vanessa Cristina<sup>1</sup>, Paiva, Renato<sup>2</sup>, Ferreira, Gabriela Nogueira<sup>3</sup>, Emrich, Eduardo Bucsan<sup>4</sup>, Alves, Eduardo<sup>5</sup>, Oliveira, Lenaldo Muniz de<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), bolsista CNPq, e-mail: [vanessastein@oi.com.br](mailto:vanessastein@oi.com.br); <sup>2</sup>Professor Associado (UFLA), Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, Caixa Postal: 3037, e-mail: [renpaiva@ulfa.com.br](mailto:renpaiva@ulfa.com.br); <sup>3</sup>Graduando em Ciências Biológicas (UFLA), bolsista FAPEMIG, e-mail [gabi\\_bioufla@hotmail.com](mailto:gabi_bioufla@hotmail.com); <sup>4</sup>Graduando em Agronomia (UFLA, bolsista CNPQ, e-mail: [bucsan\\_emrich@yahoo.com.br](mailto:bucsan_emrich@yahoo.com.br); <sup>5</sup>Professor adjunto (UFLA), e-mail [ealves@ufla.br](mailto:ealves@ufla.br); <sup>6</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Ciências Biológica, Laboratório de Ecologia Evolutiva. Br 116 , Km 03 - Campus Universitário, e-mail: [lenaldo@ufla.br](mailto:lenaldo@ufla.br).

### INTRODUÇÃO

*Inga vera* Willd., ou ingazeiro, pertencente à família Fabaceae e é uma espécie frutífera e medicinal nativa do cerrado. Seus frutos apresentam polpa branca, levemente fibrosa e rica em sais minerais (Lope, 2006). No entanto, alguns autores afirmam que a viabilidade das suas sementes é extremamente curta, não ultrapassando 15 dias, em condições naturais (Barbedo, 1998).

Neste contexto, o melhoramento genético tem contribuído com a produção de indivíduos superiores e novas variedades, através da recombinação de caracteres selecionados, principalmente para áreas com baixo potencial para reflorestamento (Menck et al., 1990). Portanto, a cultura de anteras e/ou micrósporos tem sido extensivamente empregada na produção de linhagens homocigóticas. 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 (Santos, 2003).

Uma série de fatores químicos, físicos e genéticos interagem de forma complexa, influenciando tanto na indução do embrião haplóide como sua diferenciação em plântula (Santos, 2003). Dentre os dos fatores críticos para a indução da androgênese temos o genótipo e as condições fisiológicas da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, o tipo de pré-tratamento aplicado nos botões florais e a composição do meio de cultura (Peters et al., 1998).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as diferenças ultra-estruturais relacionadas à calogênese de anteras de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a calogênese de anteras, botões florais de ingazeiro 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. As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose, 4,5µM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); 0,25% de carvão ativado e 0,9mM de polivinilpirrolidona (PVP).

Todos os meios de cultura utilizados foram solidificados com ágar 0,7% e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, por 20 minutos. Os explantes foram mantidos no escuro à temperatura de 27 ± 2°C por 45 dias.

Após 45 dias em meio de cultura, os calos de anteras, ovários, folhas e segmentos nodais foram fixados em Karnovsky [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,0] por um período de 2 a 24 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato

0,05M, por 4 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70 e 90 por 10 minutos). Posteriormente, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina Spurr 30%, por 8 horas, a 70% por 12 horas e duas vezes a 100%, em intervalos de 24 horas. Os tecidos emblocados em resina pura e colocados em estufa a 70°C, por 48 horas, para a polimerização.

Em seguida, foram realizados os cortes em seções semifinas (1µm) e ultrafinas (<100nm), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina (1g azul de toluidina, 1g borato de sódio e 100 mL de água purificados por meio de filtro Millipore 0,2µm) e montados permanentemente em meio Permount.

Os cortes ultrafinos foram coletados em uma gota de água com grades Slots e colocados em raques, cobertos com uma película de formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, em seguida por acetato de chumbo, por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 109 a 80Kv.

Para microscopia eletrônica de varredura as amostras foram também fixadas em Karnovsky [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato, pH 7,0, por, no mínimo, uma hora, em temperatura ambiente. Posteriormente, os calos foram cortados com bisturi em nitrogênio líquido e os fragmentos lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,05 M por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (30%, 50%, 70% e 90%) por 10 minutos.

Após a desidratação, foi realizada secagem ao ponto crítico, por meio de CO<sub>2</sub> líquido e as amostras metalizadas com ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 40), operando entre 10 e 20 kV.

## RESULTADOS DE DISCUSSÃO

Na MEV foi verificada a proliferação de células, com formato isodiamétrico (Figura 1c e 1d) em toda a superfície da antera, inclusive na região do conectivo (Figura 1b) e no grão de pólen (Figura 1f).

As células dos calos de anteras, quando observadas em MET, apresentaram núcleos centrais com contorno irregular e formas diversas (Figura 2a). Essa conformação de núcleo também foi observada por Gloria & Machado (2004), em células organogênicas de *Glycine max* (L.) Merr.

Quanto ao citoplasma das células, esse é denso e abundante em retículo endoplasmático (Figura 2b) e mitocôndrias (Figura 2d). Segundo Tomes (1985), os calos embriogênicos, são compostos por células com características meristemáticas, apresentando dimensões relativamente pequenas e citoplasma denso. Foi observada também a presença de complexo de Golgi (Figura 2c), vacúolos com citoplasma denso (Figura 2e) e grande quantidade de grãos de amido (Figura 2f). A presença de grão de amido tem sido reportada como uma mudança ultra-estrutural, comum em células organogênicas e também relacionada com a aquisição do potencial organogênico (Villalobos et al. 1985, Pihakashi-Maunsbach, et al 1993).

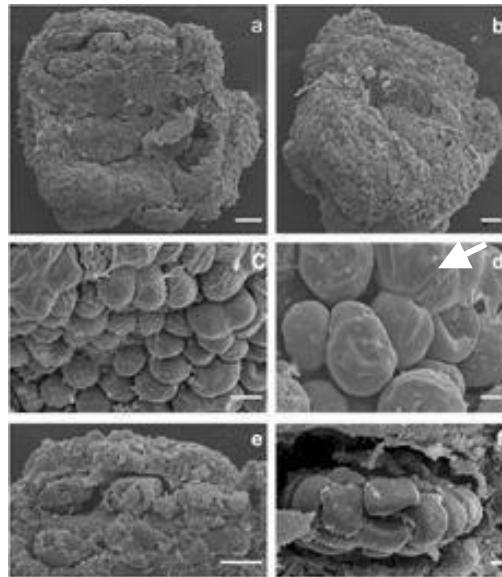


FIGURA 1. Eletromicrografias de varredura de calos de anteras de ingazeiro (a-d). Visão geral dos calos(a); visão geral dos calos na região do conectivo (b); células isodiamétricas dos calos (c,d); calos nos pólenes (e,f). Br = 100µm (a, b, e); 20 µm (c); 10 µm (d, f). UFLA, Lavras, MG, 2006.

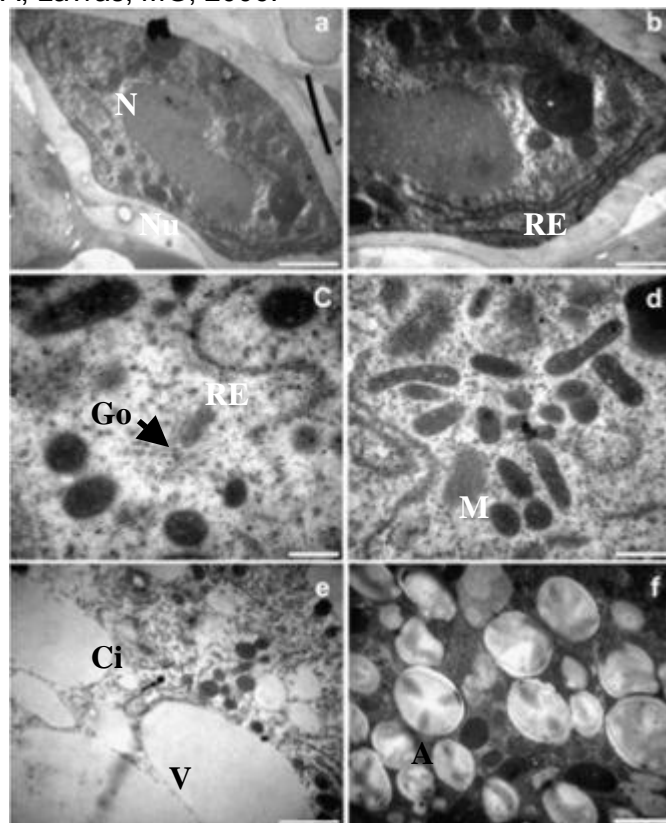


FIGURA 2. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos em anteras. Célula do calo de anteras (a); retículo endoplasmático (b); complexo de golgi (c); mitocôndrias (d); vacúolos (e) e grãos de amido (f). Br= 2 µm (a, d, e, f); 1 µm (b); 500nm (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

#### CONCLUSÃO

Os calos de anteras não apresentaram evidências de formação de embriões somáticos, apesar de suas células apresentarem algumas características embriogênicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOPE, K. P.; BRUNO, R. DE L. A.; BRUNO, G. B.; MOURA, M. F. **Comportamento de sementes de *Inga sp.* durante o armazenamento.** Disponível em: <[http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais\\_xvii\\_cbf/fitotecnia/355.htm](http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/355.htm)>. Acesso em: 5 fev. 2006.
- BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingazeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 249-259, maio/ago. 1998.
- MENCK, A.L.M.; ODA, S.; MARCHI, E.L.; KOVALKI, M.E. Influencia de Sistema de Colheita de Botões Florais na Viabilidade de Pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, n°43/44, p.20-23, 1999
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através de cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, 1990. p.311-332.
- SANTOS, E.K. dos. 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, 2003.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. [S.l.: s.n.], 1998. v. 2, p. 569-612.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-92, 1962.
- GLORIA, A. da B.; MACHADO, Silvia R. Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 429-437, jul./sept. 2004.
- TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p. 175-203.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: JANI, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 4, p. 341-367.
- VILLALOBOS, V. M.; YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. . Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 12, p. 2172-2176, Dec. 1985.
- PIHAKASHI-MAUNSBACH, K.; NYGAARD, K. B.; JENSEN, K. H.; RASMUSSEN, O. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by light and electron microscopy. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 2, p. 167-176, Feb. 1993.
- PALAVRAS-CHAVE: *Inga vera*, anteras, ingá, 2,4-D, calos, microscopia.