

Calogênese em segmentos nodais de ingazeiro – aspectos ultra-estruturais

Vanessa C. Stein¹, Renato Paiva²; Emrich, Eduardo Bucsán³; Alves, Eduardo⁴; Oliveira, Lenaldo Muniz de⁵; Lopes, Eloísa Aparecida das Graças Leite⁶

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, bolsista CNPq, e-mail: vanessastein@oi.com.br; ²Professor Associado, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, Caixa Postal: 3037, e-mail renpaiva@ulfa.com.br; ³Graduando em Agronomia (UFLA), bolsista CNPq, e-mail: bucsan_emrich@yahoo.com.br; ⁴Professor Adjunto (UFLA), Departamento de Fitopatologia, e-mail: ealves@ufla.br; ⁵Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecologia Evolutiva, Br 116, Km 03, Campus Universitário, e-mail: lenaldo@ufla.br; ⁶Laboratorista do Departamento de Fitopatologia (UFLA).

INTRODUÇÃO

O ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) é uma árvore frutífera adaptada a terrenos úmidos, considerada uma espécie importante para a recomposição de áreas ciliares degradadas. No entanto, o potencial desta espécie para programas de preservação ambiental e sua utilização comercial são prejudicados pela impossibilidade de armazenamento de suas sementes. Assim, as técnicas alternativas de propagação assexuada, como a cultura de tecidos, são ferramentas que possibilitam a obtenção de um número expressivo de mudas de espécies ecológica e comercialmente importantes (Santos *et al.*, 2005).

Devido à totipotência, protocolos para a obtenção de plantas com base em tecidos vegetais têm sido obtidos. Os processos pelos quais os tecidos produzem órgãos vegetais adventícios *in vitro*, podem ocorrer direta (sem a formação de calos) e indiretamente, por meio da formação de calos (Moura *et al.*, 2001).

O calo é uma massa compacta de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, ao tamanho, ao conteúdo celular e à espessura da parede (Narayanaswamy, 1977). Assim, para que os processos de organogênese indireta *in vitro* ocorram, as células devem passar pelos processos de desdiferenciação, aquisição da competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Na indução de calos de segmentos nodais, foram utilizadas plantas matrizes jovens de ingazeiro mantidas em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, densidade de fluxo de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Essas plantas foram obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG ($21^\circ29'15''\text{S} / 44^\circ38'33''\text{O}$).

Os segmentos nodais e folhas 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.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose e $4,5 \mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). O meio de cultura foi solidificado 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 a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 45 dias.

Para microscopia de transmissão, após 45 dias em meio de cultura, os calos 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.

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

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, seguido 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 de varredura, após 45 dias em meio de cultura, os calos foram também fixados 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 CO₂ 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

As superfícies dos calos de segmentos nodais e folhas não apresentaram indícios de formação de embriões. As células na sua maioria apresentaram formato arredondado. No entanto pode-se observar algumas formas alongadas. Segundo Tomes (1985), nos calos embriogênicos, as células possuem características meristemáticas, apresentando dimensões relativamente pequenas e citoplasma denso. (Figura 5).

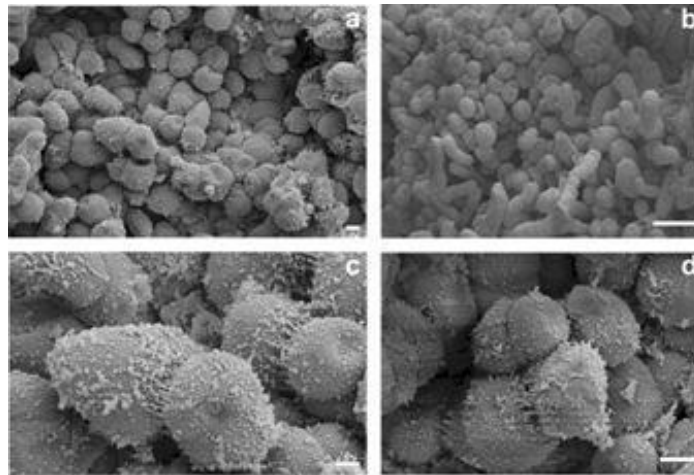


Figura 5. Eletromicrografias de varredura de calos e segmentos nodais de ingazeiro. Aspectos da superfície do calo (a,d); Células em divisão celular (b,c). Br=20μm (a, b), 10 μm (c), 100 μm (d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto à análise celular foram observadas células com muitos vacúolos (Figura 6d), núcleos com formatos variados (Figura 6a e b) e grande quantidade de mitocôndrias (Figura 6c), em sua maioria com formato alongado. Segundo Canhoto (1996), as células não embriogênicas apresentam mitocôndrias com formato alongado, enquanto que, em células embriogênicas, as mitocôndrias são arredondadas (Figura 6c). Além disso, nas células organogênicas de *Glicine max* (L.) Merr., as mitocôndrias são abundantes, com matriz eletrodensa e cristas bem desenvolvidas. Esse fator tem sido associado também a sistemas embriogênicos, estando relacionado a alta atividade metabólica, pelas altas taxas respiratórias.

No entanto, Skoog e Miller (1957) afirmam que as células não embriogênicas possuem potencial, para desenvolver células meristemáticas e quando em condições satisfatórias, podem dar origem a uma nova planta.

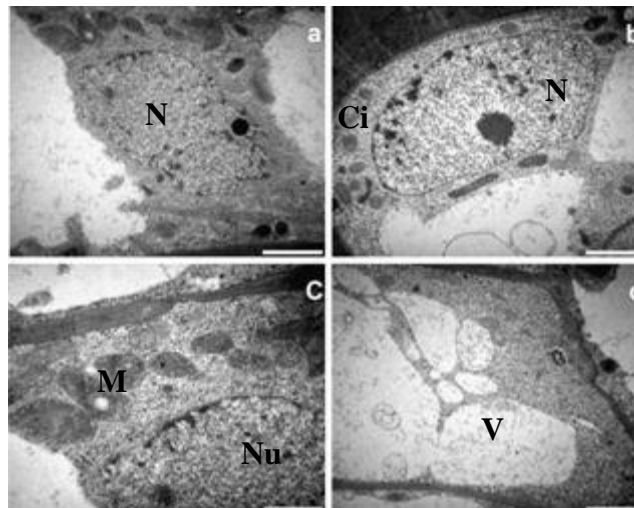


Figura 6. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos de segmentos nodais de ingazeiro. Núcleo (a, b); mitocôndrias (c); vacúolo (d). Br= 2μm (a, b, c, d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

CONCLUSÃO

Os calos de folhas e segmentos nodais não apresentaram evidências de formação de embriões somáticos, apesar de suas células apresentarem algumas características embriogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

MOURA, T. L. de A.; MENDES, W. A. B. de; JANUZZI, B. M. *et al.* Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de bap e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, ago. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:437-497, 1962.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. Cap. 10. p. 179-206.

ROWLEY, J. C.; MORAN, D.T. A simple procedure for mounting wrinkle-free sections on formvar-coated slot grids. **Ultramicroscopy**; 1(2):151–155, 1975.

SANTOS, B., R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R., C.; PAIVA, P., D., DE O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, maio/jun. 2005

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia Society Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131

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.

PALAVRAS-CHAVE:

Inga vera, calos, 2,4-D, ingá, MS