

Observação ultra-estrutural de calos de ovários de Ingazeiro

Stein, Vanessa Cristina¹; Paiva, Renato²; Rodrigues, Marcelo³; Emrich, Eduardo Bucsan⁴; Alves, Eduardo⁵; Martinotto, Cristiano¹.

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

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. 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 hábitat, fica inviabilizada a sua inclusão nos programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas (Barbedo, 1997).

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.

A cultura de ovários é uma técnica realizada com êxito em muitas espécies para a obtenção de embriões somáticos a partir do cultivo de óvulos (Moore, 1985; Gmitter Junior & Moore, 1986). Entretanto, a origem dos óvulos, o estado fisiológico desses e as condições em que eles são expostos são responsáveis por diferenças na resposta embriogênica. Além disso, o alongamento *in vitro* dos embriões e a subsequente aclimatização são processos longos e difíceis (Button & Kochba, 1977), existindo, ainda, expressão de características de juvenildade nas plantas originadas *in vitro*, constituindo importante limitação na propagação (Ollitrault, 1992).

O objetivo deste trabalho foi verificar as características ultra-estruturais de calos de ovários *Inga vera* Will subsp *Affinis* (DC). T.D. Penn..

MATERIAL E MÉTODOS

Para a calogênese de ovários 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. As anteras foram inoculados 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 Permoult.

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 a 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 ovários apresentaram proliferações celulares bem organizadas, que indicam a formação de pró-embriões somáticos (Figura 1c), pois também observaram-se indícios de sistema vascular organizado (Figura 1d).

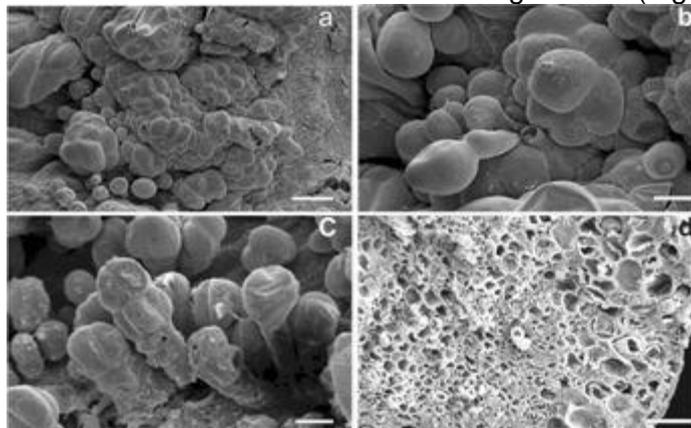


Figura 1. Eletromicrografias de varredura de calos em ovários. Proliferação de células (a); aspectos da superfície do calo (b); início da formação de embriões (c), organização vascular do calo (d). Br=10µm (a); 30µm (b); 20µm (c,d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Além disso, observaram-se núcleos e organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático em posição periférica (Figura 2a e b), pois a célula é praticamente toda ocupada por grandes vacúolos (Figura 2c). Como observado por Canhoto et al. (1996), usualmente, as células dos pró-embriões apresentam algumas características observadas em células meristemáticas. No entanto, podem ser tão vacuoladas que mostram apenas um fino citoplasma entre o tonoplasto e a membrana plasmática (Figura 2d).

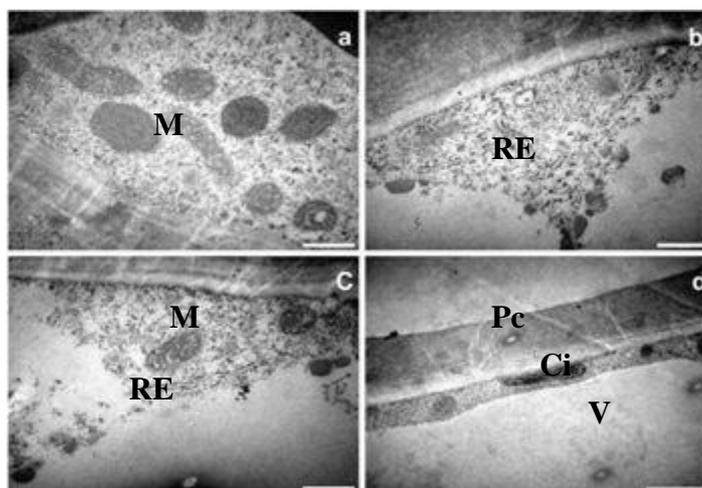


Figura 2. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos de ovários. Mitocôndrias (a); retículo endoplasmático (b); mitocôndrias e retículo endoplasmático (c); citoplasma na periferia com mitocôndria. Br=500µm (a,b,c); 1 µm (d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

CONCLUSÃO

Os calos provenientes de culturas de ovários apresentam características ultra-estruturais embriogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

MOORE, G. A. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 1, p. 66-70, Jan. 1985.

GMITTER JUNIOR, F. G.; MOORE, G. A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 139-147, 1986

BUTTON, J.; KOCHBA, J. Tissue culture in the *Citrus* industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 70-92.

OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for *Citrus* breeding and propagation. **Fruits**, Montpellier, v. 47, p. 213-218, 1992. Numero special Agrumes.

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.

Palavras-chaves:

Inga vera, ovários, MS, 2,4-D