

## **Análise ultra-estrutural de calos de mamoneiro cv. IAC-80.**

Vargas, Daiane Peixoto<sup>1</sup>; Paiva, Renato<sup>2</sup>; Nogueira, Gabriela Ferreira<sup>3</sup>; Stein, Vanessa Cristina<sup>4</sup>; Carvalho, Maria Laene Moreira de<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), bolsista CNPq, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35): 38291619, email: [dvbio@hotmail.com](mailto:dvbio@hotmail.com); <sup>2</sup>Professor Associado, Depto. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal (UFLA), email: [renpaiva@ufla.br](mailto:renpaiva@ufla.br); <sup>3</sup>Graduanda em Ciências Biológicas (UFLA), bolsista de Iniciação Científica - FAPEMIG, e-mail: [gabi\\_bioufla@hotmail.com](mailto:gabi_bioufla@hotmail.com); <sup>4</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq, email: [nessastein@ig.com.br](mailto:nessastein@ig.com.br); <sup>5</sup>Professora Adjunta, Depto. de Agricultura (UFLA), e-mail: [miaenemc@ufla.br](mailto:miaenemc@ufla.br).

### INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.), também chamada carrapateira, baforeira e baga é uma dicotiledônea pertencente à família Euphorbiaceae, que inclui um grande número de espécies nativas da região tropical. É possivelmente originária da antiga Abissínia, hoje Etiópia, no continente africano (Moreira et al., 1996).

Planta oleaginosa de destacada importância socioeconômica, explorada industrialmente em função do óleo contido em suas sementes, é considerada, atualmente, uma das principais alternativas à produção de Biodiesel no Brasil.

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (Venturieri et al., 2004).

Segundo Ammirato (1983), na embriogênese somática, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursores de embriões somáticos, sendo esse processo similar ao da embriogênese zigótica. Os embriões somáticos *in vitro* podem ser formados a partir de dois padrões básicos de embriogênese, direto ou indireto, este último com a etapa de formação de calos.

Embora não se conheça, ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos regenerativos, *in vitro*, são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que as diferentes expressões morfogenéticas reflitam na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos.

Portanto, a compreensão da organogênese de plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento das células meristemáticas requer a observação das mudanças subcelulares e as suas correlações com as alterações bioquímicas (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993). A grande aplicação desta metodologia é fornecer informações associadas aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das células competentes (Santiago, 2003).

As células embriogênicas, de maneira geral, apresentam características comuns ao comportamento de células embriogênicas ativas, incluindo rápida divisão mitótica, pequeno tamanho, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo proeminente, vacúolo pequeno e abundância de grãos de amido. Essas características sugerem uma intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica.

Assim, alguns autores tentam relacionar as características ultra-estruturais ao potencial embriogênico (Radojevic et al., 1975). No entanto, a caracterização citológica de calos durante o desenvolvimento não tem sido realizada com frequência na cultura de tecidos. O estudo das alterações ultra-estruturais durante a organogênese *in vitro* para caracterizar as células

meristemóides e a formação dos brotos é escasso (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993; Arai et al., 1997).

Dessa forma, a falta de conhecimento dos fatores que regulam a embriogênese somática e a assíncronia no desenvolvimento de embriões somáticos. São os principais responsáveis por sua reduzida aplicação comercial (Pihakashi-Maunsbach, 1993). Uma das estratégias que podem aumentar a eficiência do processo embriogênico seria uma análise ultra-estrutural ainda nos estádios de calos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as diferenças ultra-estruturais relacionadas à calogênese de anteras de *Ricinus communis* L. cv IAC-80.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a calogênese de anteras, botões florais de mamoneiro foram coletados de populações em área experimental, localizadas na Universidade Federal de Lavras, no período de dezembro de 2007 e armazenados à temperatura de 10°C por 24 horas dia.

Para desinfestação, os botões florais com diâmetro de 3,0 a 3,9 mm 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 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, os botões florais seccionados longitudinalmente com bisturi, para o isolamento das anteras, em solução de ácido ascórbico 100mg L<sup>-1</sup>.

As anteras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3 % de sacarose, contendo diferentes reguladores de crescimento: T1: MS acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), T2: MS contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; e T3 com MS acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN (cinetina); todos com a adição de 1% de carvão ativado em cada tratamentos.

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 25 ± 2°C por 30 dias.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 45 dias em meio de cultura, os calos de anteras (coletados conforme a coloração apresentada nos diferentes tratamentos: T1- calo marrom, T2- calo amarelo e T3- calo branco) foram 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 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 metalizados com ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 40), operando entre 10 e 20 kV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças ultra-estruturais entre as células dos calos de diferentes cores provenientes de anteras inoculadas em diferentes tratamentos. O rompimento de calos e a liberação de grãos de pólen foi observada no tratamento com MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D conforme verificado na Figura 1a. Na MEV, verificou-se a proliferação de células com formato isodiamétrico em calos de coloração marrom e branca (Figura 1b e 1d).

Algumas células apresentam formato alongado quando as anteras foram cultivadas em meio MS acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D que produziram calos de coloração amarela (Figura 1c).

De acordo com Skoog & Miller (1957) as células não embriogênicas possuem potencial, para desenvolver células meristemáticas e quando em condições satisfatórias, podem dar

origem a uma nova planta. Como observado por Canhoto et al. (1996), usualmente, as células dos pró-embriões apresentam algumas características observadas em células meristemáticas. Segundo Tomes (1985), os calos embriogênicos são compostos por células com dimensões relativamente pequenas e citoplasma denso.

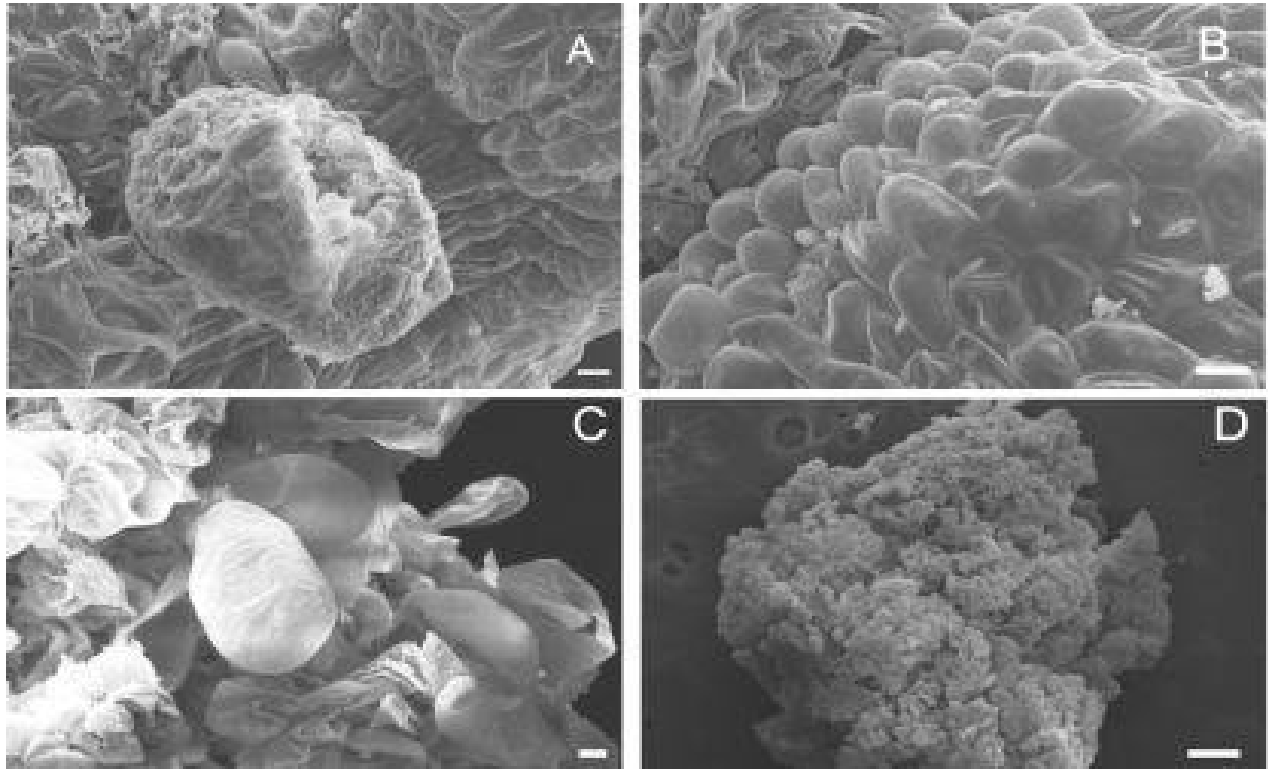


Figura 1. Eletromicrografias de varredura de calos obtidos a partir de anteras de *Ricinus communis* L. cv. IAC-80. Aspectos da superfície do calo (A, B, C e D); Calo de coloração marrom com rompimento e liberação de polens maduros (A). Células isodiamétricas na superfície do calo marrom (B). Células alongadas de calo amarelo (C). Visão geral de calo de coloração branca com células isodiamétricas em divisão células (D). Br=20 $\mu$ m (A, B e C), 20  $\mu$ m (c), 200  $\mu$ m (D).

## CONCLUSÕES

Há diferenças ultra-estruturais entre as células dos calos provenientes de anteras.

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

Anteras de botões florais com tamanhos de 3 a 3,9 mm apresentam pólenes maduros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MOREIRA, J.A.N.; LIMA, E.F.; FARIAS, F.J.C.; AZEVEDO, D..M..P. de. Melhoramento de mamoneira (*Ricinus communis* L.). Campina Grande-PB. Embrapa-CNPA,. 29p. (Embrapa – CNPA. Documentos, 44) 1996.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogenesis of *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* hybrid (Sterculiaceae). **Acta Amaz.** Oct./Dec. 2004, vol.34, n. 4, p.507-511.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmilian Publisher Company, 1983. p. 82-123.

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.

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.

RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R.; NESKOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of *Coryllus avellana* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Jena, v. 77, p. 33-41, 1975.  
com

CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, London, v. 78, n. 4, p. 513-521, Oct. 1996.

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.

SANTIAGO, E. J. A de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle)**. 2003. 184 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PALAVRAS-CHAVE: *Ricinus communis* L.; anteras; calogênese.