

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE CALOS DE BANANEIRA, cv. PRATA ANÃ,
PROVENIENTES DA CULTURA DE MERISTEMAS**

LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO¹, LUCIANO VILELA PAIVA², MARLÚCIA SOUZA
PÁDUA³, EULA TAMIRIS DE SOUZA EVANGELISTA⁴, BRENO RÉGIS SANTOS⁵

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar calos obtidos da cultura de meristemas (*scalp method*) de bananeira, cv. Prata anã utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Genótipos de bananeira, cv. Prata anã cultivadas *in vitro* foram utilizados para a indução de meristemas na base das folhas e posterior formação de estruturas conhecidas como *scalp*, as quais foram transferidas para meio ZZs que induz a formação de calos. Os calos obtidos foram caracterizados morfológicamente quanto à coloração e textura apresentada. Cinco amostras compostas de regiões dos calos consideradas homogêneas de acordo com a classificação visual foram coletadas e fixadas em Karnovsky para futura análise em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Foi verificada a formação de 3 tipos de calos (Tipo 1- calo transparente aquoso; Tipo 2- calo com glomérulos amarelos menores; Tipo 3- calo com glomérulos amarelos maiores). A análise por MEV mostrou que os calos Tipo 1 apresentaram células alongadas; os calos Tipo 2 uma estrutura indefinida, enquanto os calos Tipo 3 apresentaram células com formato isodiamétrico que condizem com características de calos embriogênicos.

Palavras-chaves: microscopia eletrônica de varredura, *Musa* sp., embriogênese somática, características embriogênicas.

INTRODUÇÃO

A bananeira (Musaceae) é uma planta herbácea de grande importância econômica e social no mundo, pois, sendo cultivada em quase 120 países, constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas principalmente para muitos países em desenvolvimento (FAO, 2009). Técnicas de engenharia genética associadas à cultura de tecidos vêm sendo utilizadas no melhoramento desta espécie com a obtenção de cultivares resistentes a doenças e agronomicamente melhoradas. Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática tem sido um importante sistema de obtenção de plantas e o entendimento desse processo pode servir como base para futuros trabalhos de melhoramento genético dessa espécie.

Durante o período de calogênese é possível determinar características desejáveis associadas à alta capacidade embriogênica por meio de análises microscópicas fornecendo importantes informações sobre as condições ideais para a obtenção de calos embriogênicos e, conseqüentemente de suspensões celulares embriogênicas, permitindo adequar protocolos que viabilizem a transformação genética por meio da embriogênese somática indireta (NOGUEIRA et al., 2007). Essa seleção precoce de calos pode reduzir o custo de produção, tempo e mão-de-obra envolvida no processo utilizando apenas material com alta capacidade embriogênica.

Células embriogênicas, independente do padrão direto ou indireto, apresentam rápida divisão mitótica, tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo proeminente, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. Essas características podem ser analisadas por meio de estudos morfológicos e ultra-estruturais e sugerem uma intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica (WILLIAMS E MAHESWARAN, 1986). Além disso, as análises de microscopia eletrônica permitem avaliar as alterações celulares e a atividade de organelas, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente embriogênicas.

Fomento: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

¹ Mestranda em Fisiologia Vegetal, DBI/ UFLA, ludeoliveira_1@yahoo.com.br

² Professor Adjunto, DQI/UFLA, luciano@ufla.br

³ Mestranda em Biotecnologia Vegetal, DQI/UFLA, marluciabio@yahoo.com.br

⁴ Estudante de Ciências Biológicas/ Licenciatura, UNILAVRAS, eulalavras@yahoo.com.br

⁵ Professor Adjunto, ICN/ UNIFAL-MG, brenors@yahoo.com.br

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar calos obtidos da cultura de meristemas (*scalp method*) de bananeira, cv. Prata anã utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados genótipos de bananeira, cv. Prata anã, cultivadas *in vitro* no LCBM. Para a indução de meristemas na base das folhas, os explantes passaram por diversos cultivos nos meios P5 e P4, os quais diferem entre si somente na concentração de benzilaminopurina (BAP): 2,273 mg.L⁻¹ (P5) e 22,73 mg.L⁻¹ (P4) de benzilaminopurina (BAP). Esses meios de cultivo são constituídos de sais e vitaminas de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementados com 0,175 mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), 10 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8. As condições de cultivo em sala de crescimento foram com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. Com o objetivo de estabelecer a cultura de meristemas “scalps”, os meristemas foram excisados das plantas e colocados em meio P4 no escuro conforme proposto por Strosse et al. (2003).

Conforme a formação de “scalps” de aproximadamente 3mm x 3mm x3mm, estes foram transferidos para meio ZZs (1/2 macro-nutrientes de MS, micro e vitaminas de MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), 0,219 mg.L⁻¹ de zeatina, 10 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8) para a indução do processo de calogênese de acordo com a metodologia descrita por Strosse et al., 2003. Os calos obtidos nas mesmas condições de tempo, meio de cultivo, temperatura e luminosidade foram caracterizados morfológicamente por cinco avaliadores através de um questionário de notas, quanto à coloração e textura apresentada. Estes foram fotografados em estereomicroscópio com câmera acoplada.

Cinco amostras compostas de regiões dos calos consideradas homogêneas de acordo com a análise e classificação visual (Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3) foram coletadas e fixadas em solução Karnovsky (2,5% Glutaraldeído e 2,5% paraformaldeído) em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,0 durante 24 horas, na geladeira. Posteriormente, os calos foram colocados em glicerol 30% por 30 minutos e, após imersão em nitrogênio líquido, cortados com bisturi. Os fragmentos foram lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por duas horas. Após isso foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos em cada e em 100% duas vezes de 10 minutos.

Em seguida, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico por meio de CO₂ líquido para completar a secagem. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*), com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio. Após cobertos com ouro pelo evaporador de ouro SDC 050 foram observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Diversas imagens para cada amostra foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, nas condições de trabalho de distância (Mid: WD) de 9 mm (BOSSOLA e RUSSELL, 1998 adaptado por ALVES, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três tipos de calos de *Musa* sp. cv. Prata anã, utilizados neste trabalho foram caracterizados externamente por cinco avaliadores por meio de um questionário de notas, em calo transparente aquoso (Figura 1A), calo com agregados celulares amarelos menores (Figura 1B) e calo com agregados celulares amarelos maiores (Figura 1C). Os calos foram fotografados em estereomicroscópio com câmera acoplada.

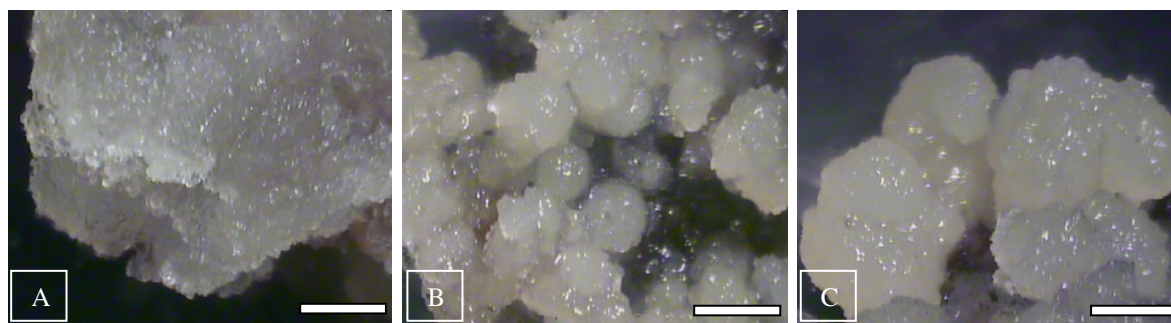


Figura 1 - A) Calo transparente aquoso; B) Calo com glomérulos amarelos menores; C) Calo com glomérulos amarelos maiores. Barra 5mm.

Segundo Grando et al. (1993) o calo transparente aquoso é formado por um tecido esponjoso, branco translúcido e sem consistência. Segundo Strosse et al. (2003), é comum a formação de calos com glomérulos amarelos heterogêneos em *Musa* sp. caracterizando calos compactos ou embriogênicos com embriões individuais (poucos embriões).

As observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que as células do calo transparente aquoso possuem formato alongado (Figura 2A). Estes dados condizem aos observados por Nogueira et al. (2007) em calos de *Byrsonima intermedia* durante o primeiro cultivo, as células apresentaram dimensões de 140 X 30µm, caracterizando o formato alongado. Steiner et al. (2005) trabalhando com *A. angustifolia* observou algumas células alongadas e vacuolizadas, sendo a vacuolização definida como um marcador precoce de morte celular (FILONOVA et al., 2000). Figueiredo (2007) observou em calos translúcidos por MEV células com formato isodiamétrico e alongado em disposição pouco organizada, resultado semelhante ao obtido neste estudo em calos com glomérulos amarelos menores (Figura 2B).

As células do calo com glomérulos amarelo maiores apresentaram formato isodiamétrico (Figura 2C). Nogueira et al. (2007), observou em células de calo de *Byrsonima intermedia* após segundo e terceiro subcultivo, células arredondadas com diâmetros de 35 X 40 µm caracterizando um formato esférico. Em calos globulares de *Phoenix dactylifera* foram observadas pequenas células meristemáticas alternando de 8 a 20 mm de diâmetro (SANÉ et al., 2006). Estudos com *Coffea arabica* mostraram células pequenas e isodiamétricas com diâmetros entre 15 µm e 20 µm (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002). Em calos caracterizados em amarelo escuro de *Passiflora spp* foi observado células com predominância do formato isodiamétrico, característica de calos embriogênicos (FIGUEIREDO, 2007).

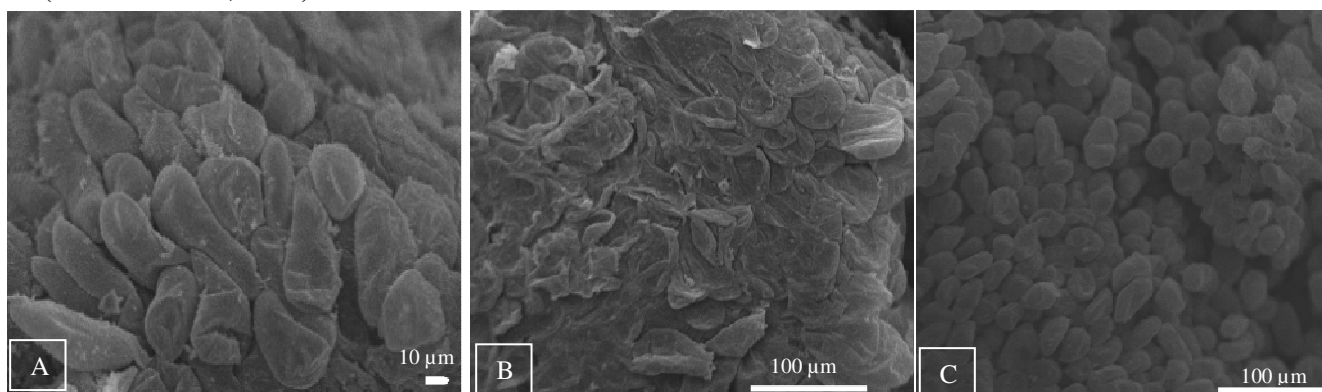


Figura 2 - Eletromicrografia de varredura de células obtidas de calo de *Musa* sp. cv. Prata anã. A) Calo Tipo 1 – Células alongadas; B) Calo Tipo 2 – Estruturas indefinidas; C) Calo Tipo 3 – Células isodiamétricas.

CONCLUSÃO

Calos com glomérulos amarelos maiores, observados mediante microscopia eletrônica de varredura em cultura de meristemas de bananeira apresentam características compatíveis com calos

embriogênicos que podem ser destinados a regenerar plantas ou obter suspensões celulares. Os calos transparentes aquosos e com glomérulos amarelos menores observados não apresentam características de calos embriogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Apostila do curso introdutório de Microscopia Eletrônica de Transmissão**. Lavras: UFLA, 2004.

BOSSOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy**. 2nd. Ed., Boston – Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

FAO, 2009. Banana Compendium. Food and agriculture organization of the United Nations. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/018/k6853e.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2010.

FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, Análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, p. 4399-4411. 2000.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F. dos; SANTOS, C. M. dos. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n2, p.139-144. 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; PORTO, J.M.P.; NICIOLI, P.M.; STEIN, V.C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise Ultra-estrutural de Calos Embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, jul. 2007

QUIROZ-FIGUEROA, F.; R. FUENTES-CERDA, C. F. J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLAVARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reporter**, v. 20, p. 1141-1149. 2002.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p.301-308. 2006.

STEINER, N.; VIEIRA, F. do N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of Carbon Source on Morphology and Histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* Embryogenic Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazilian: An international Journal, v. 48, n. 6, p. 895-903, nov. 2005.

STROSSE, H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. Montpellier: IPGRI, 2003. 31p. (INIBAP Technical Guidelines, 8).

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, n. 4, p.443-462, 1986.