

ULTRA-ESTRUTURA 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 transmissão. 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 morfolologicamente 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 transmissão Zeiss EM 109. 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 MET mostrou que os calos Tipo1 apresentaram parede delgada, grande quantidade de pequenos vacúolos e citoplasma disperso. Os calos Tipo 2 apresentaram citoplasma denso, vacúolos grandes e presença de mitocôndrias. Os calos Tipo 3 apresentaram parede espessa e espaços intercelulares. Assim, os calos Tipo 2 evidenciam características de calos embriogênicos.

Palavras-chaves: microscopia eletrônica de transmissão, *Musa* sp., embriogênese somática.

INTRODUÇÃO

A bananeira é uma espécie pertencente à família Musaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, apresentando grande importância econômica e social no mundo, uma vez que constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas (FAO, 2009). Os estudos com bananeira visam principalmente a micropropagação e o melhoramento genético dessa espécie, já que a mesma apresenta problemas fitossanitários que prejudicam a expansão do seu cultivo.

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 caracterizar as alterações celulares e inferir sobre a atividade de organelas, possibilitando caracterizar tipos celulares e regiões do explante potencialmente embriogênicas.

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 transmissão.

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

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) do Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados genótipos de bananeira, cv. *Prata anã*, cultivadas *in vitro* no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras. Para a indução de meristemas na base das folhas, os explantes passaram por diversos cultivos nos meios P5 e P4, os quais se 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.

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 analisadas por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e, para essa finalidade, foram colocados durante 10 minutos em glicerol 30% por três vezes seguidas. Os fragmentos foram lavados (três vezes por 10 minutos) em tampão cacodilato (0,05 M, pH 7,2) e pós-fixados em solução de OsO₄ (1%) por uma hora. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos e em 100% duas vezes por 10 minutos. Após desidratação em acetona, foi realizada inclusão em resina inicialmente a 30% por 8 h e, em seguida, resina 70%. Após 12 h, as amostras passaram duas vezes pela resina 100% por 24 h, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para polimerização em estufa a 70°C por 48 h. Após esta etapa, os blocos foram moldados em forma de trapézio de 1 mm de cada lado com auxílio de lâmina e submetidos a cortes semifinos para serem cortados em ultramicrótomo. As secções ultrafinas foram submetidas à contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo (BOSSOLA e RUSSELL, 1998 adaptado por ALVES, 2004). A observação dos espécimes foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109.

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).

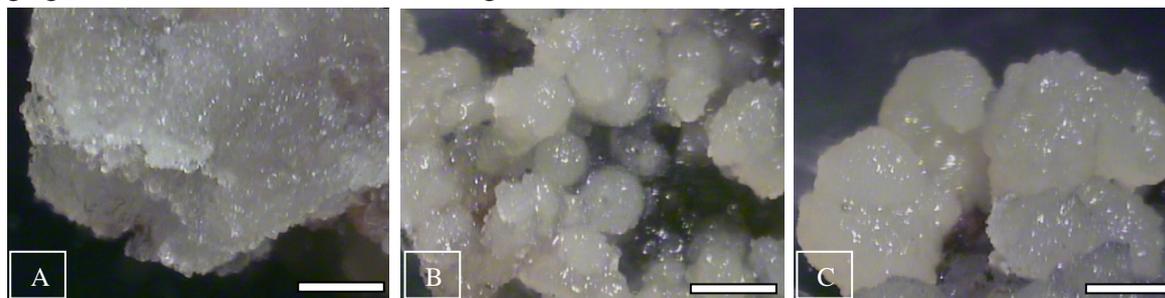


Figura 1 - A) Calo transparente aquoso; B) Calo com glomérulos amarelos menores; C) Calo com glomérulos amarelos maiores. Barra 5mm.

Segundo Grandó 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).

A análise em MET evidenciou que os calos Tipo 1 apresentaram parede delgada, pequenos vacúolos e citoplasma disperso (Figura 1A e 1B). Os calos Tipo 2 apresentaram citoplasma denso, vacúolos grandes e presença de mitocôndrias (Figura 1C e 1D). Os calos Tipo 3 apresentaram parede espessa e espaços intercelulares (Figura 1E e 1F).

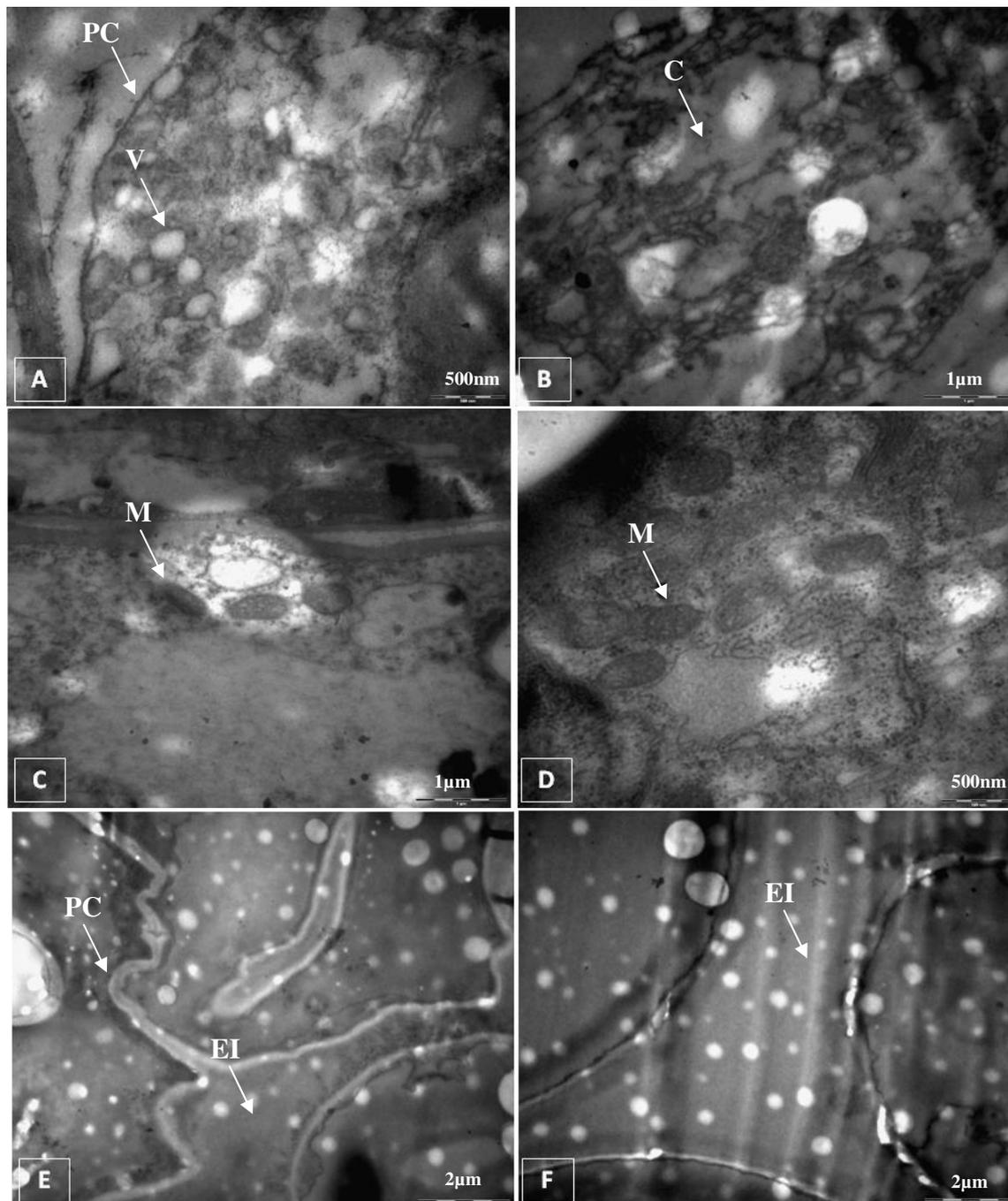


Figura 1 – Eletromicrografia de transmissão de células obtidas de calo de *Musa* sp. cv. Prata anã. A e B) Calo Tipo 1 – Parede celular fina, pequenos vacúolos, citoplasma disperso; C e D) Calo Tipo 2 – Citoplasma denso, vacúolos grandes, mitocôndrias; E e F) Calo Tipo 3 – Parede espessa, espaço intercelular.

As características observadas nas células dos calos Tipo 1 e Tipo 3 como parede delgada, pequenos vacúolos, citoplasma disperso, células de formatos diferentes, espaço intercelular, sistema celular desorganizado, células grandes e ausência ou pouco conteúdo de amido corroboram com os resultados encontrados por Figueiredo (2007) em calos não embriogênicos. Nogueira et al. (2007) observaram em células alongadas de calos de *Byrsonima intermedia* além dessas características núcleos desorganizados, reduzido número de mitocôndrias com poucas cristas, pouco retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Figueiredo (2007) estudando calos com coloração amarelo-escuro de *Passiflora* spp. observou características embriogênicas como predominância de células isodiamétricas, sistema celular organizado, células pequenas com citoplasma denso e rico em mitocôndrias, características semelhantes às encontradas neste estudo em células dos calos Tipo 2.

CONCLUSÃO

Os calos Tipo 2 evidenciaram características semelhantes às 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.

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

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.