

inCiência

Iniciação Científica
Embrapa



Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

Regina Caetano Quisen
Editora Técnica

Embrapa
Brasília, DF
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

69010-970

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

cpaa.sac@embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo:

Embrapa Amazônia Ocidental

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *André Luiz Atroch, Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza Pereira.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

CD-ROM (2013): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Embrapa Amazônia Ocidental.

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (10. : 2013: Manaus, AM).

Anais... / X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental; editora: Regina Caetano Quisen. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.

1 CD-ROM : color. ; 4 ¾ pol.

ISBN 978-85-7035-340-5

1. Comunicação científica. 2. Iniciação científica. 3. Anais. I. Quisen, Regina Caetano. II. Título.

Melhoramento Genético e Biotecnologia

Avaliação de Técnicas Histológicas de Calos Embriogênicos de Cupuaçuzeiro

Graziela Silva dos Santos Guimarães
Giselle Costa Lima
Regina Cateano Quisen

Resumo

O desenvolvimento de estudos histológicos de estruturas obtidas via cultura de tecidos pode fornecer informações essenciais para a compreensão da morfogênese *in vitro*, sejam estas, rotas de desenvolvimento organogênicas ou embriogênicas. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo comparar diferentes etapas de confecção de lâminas histológicas permanentes de calos embriogênicos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). Para tal, calos embriogênicos de cupuaçuzeiro foram fixados em FAA₅₀ por 24 ou 48 horas e submetidos a banhos em séries alcoólicas crescentes com etanol/butanol ou etanol/xilol, embebidos em parafina em cassetes ou em recipientes de vidro;

nesse último caso, acrescida a parafina aquecida, aos poucos, em solução de butanol/ clorofórmio contendo a amostra. Após microtomia, as fitas foram imersas em banhos de xilol ou éter de petróleo, hidratadas e feita coloração com azul de toluidina ou safranina. A qualidade dos cortes histológicos obtidos foi bastante contrastante entre si, demonstrando a necessidade de melhoria no processo de infiltração e desparafinização. Ainda assim, observou-se que a impregnação lenta em recipiente de vidro permitiu melhor infiltração. Também a sequência de banhos em xilol foi superior à utilização de éter de petróleo para essas amostras.

Termos para indexação: *Theobroma grandiflorum*, morfogênese in vitro, fruteiras tropicais.

Evaluation of Histological Techniques Calli Cupuassu

Abstract

The histological techniques based on anatomical and histochemical obtained by tissue culture can provide information essential to the understanding of morphogenesis in vitro, as they provide essential information about development organogenic and embryogenic routes. Therefore, this study aimed to compare different methods of preparation of histological slides permanent of embryogenic callus of *Theobroma grandiflorum* (*Theobroma grandiflorum*). To this end, embryogenic callus were fixed in FAA₅₀ for 24 or 48 hours, and subjected to alcohol baths in series with ethanol / butanol or ethanol/xylene solutions, embedded in paraffin in cassettes or in glass containers (slowly heated in a solution of butanol/chloroform). After microtome, the tapes were immersed changes of xylene or petroleum ether, hydrated and colored performed with toluidine blue and safranin. The quality of histology sections were quite contrasting each other, demonstrating the need for improvement in the process of infiltration and deparaffinization. Still, it was observed that the

slow impregnation in glass container provided a better permeation. Also the sequence of baths in xylene was superior to the use of petroleum ether for these samples.

Index terms: *Theobroma grandiflorum*, in vitro morphogenesis, tropical fruit species.

Introdução

A aplicação de técnicas biotecnológicas na cultura do cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*), tal como a propagação *in vitro*, permite grandes avanços nos programas de melhoramento genético dessa espécie, principalmente na clonagem de mudas de materiais selecionados. Entretanto, o entendimento do processo morfogênico dessa cultura *in vitro* ainda é limitado, principalmente no que diz respeito à compreensão dos estímulos e condições necessárias para indução e controle das rotas morfogênicas.

Neste sentido, o estudo do desenvolvimento celular e dos tecidos nas diferentes etapas do processo organogênico ou embriogênico tem ajudado a melhorar a eficiência dos protocolos de propagação clonal, permitindo a identificação de alterações associadas com a posição e o desenvolvimento ontogênico (VERDEIL et al., 2001). Com o cacauzeiro (*Theobroma cacao*), Alemanno et al. (1996), que foram os primeiros pesquisadores a descrever técnicas histológicas a partir de estruturas calosas e embriogênicas para essa espécie, observaram que as respostas morfológicas e histológicas foram diferentes para genótipos embriogênicos e não embriogênicos. Esses resultados demonstraram que a formação de grupos de células meristemáticas ocorreu após uma fragmentação no momento da formação dos embriões somáticos, sendo o tipo celular encontrado na origem diferente do geralmente descrito na literatura, o qual indica uma origem unicelular, sem nenhuma ambiguidade na origem multicelular.

Apesar dessa importante contribuição, para o cupuaçuzeiro, não existem relatos, na literatura, de estudos histológicos de embriogênese somática, e, nesse sentido, visando contribuir para o entendimento desses processos morfogênicos para essa fruteira de importância econômica na região amazônica, o presente

trabalho teve como objetivo comparar diferentes etapas de confecção de lâminas histológicas permanentes de calos embriogênicos dessa cultura.

Material e Métodos

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e no Laboratório de Fisiologia, ambos pertencentes à Embrapa Amazônia Ocidental, Município de Manaus, Amazonas.

Amostras de massas obtidas a partir da cultura de calos embriogênicos foram submetidas a diferentes sequências metodológicas, descritas na Tabela 1. Essas amostras foram fixadas em solução FAA₅₀ (formol 5%, ácido acético 5%, etanol-50 90%), armazenadas em geladeira em álcool 70% por 12 horas e desidratadas em série de concentração crescente de etanol/butanol ou etanol/xilol. As amostras foram infiltradas de duas maneiras distintas: (1) Em parafina liquefeita em cassete; (2) Em recipientes de vidro, sendo, neste último caso, acrescentadas, aos poucos, pequenas porções de parafina aquecida na solução de butanol/clorofórmio contendo a amostra, até completa evaporação da solução alcoólica. Após o emblocamento das amostras em moldes de papel, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (7,0 µm) As secções obtidas foram submetidas a banhos de xilol/etanol ou éter de petróleo/etanol para então serem coradas em azul de toluidina ou safranina, montadas em lâminas com bálsamo do Canadá e observadas em microscópio óptico de campo claro.

Tabela 1. Etapas da preparação de lâminas histológicas de calos embrionários de cupuaçuzeiro. Manaus, 2012.

Etapa	Sequência I	Sequência II	Sequência III
Fixação	FAA / 24 horas	FAA / 48 horas	FAA / 24 horas
Desidratação	etanol 70% / 1 hora 90% / 1 hora 2 vezes em etanol absoluto / 1 hora cada xilol / 1 hora xilol / 1 hora 15 minutos finais em estufa	etanol 70% / 1 hora ⁽¹⁾ butanol 01 / 1 hora ⁽¹⁾ butanol 02 / 2 horas ⁽¹⁾ butanol 03 / 4 horas ⁽¹⁾ butanol 04 / 4 horas ⁽¹⁾ butanol 05 / 12 horas ⁽¹⁾ butanol 06 / 4 horas	etanol 70% / 1 hora ⁽¹⁾ butanol 01 / 1 hora ⁽¹⁾ butanol 02 / 2 horas ⁽¹⁾ butanol 03 / 4 horas ⁽¹⁾ butanol 04 / 12 horas ⁽¹⁾ butanol 05 / 4 horas ⁽¹⁾ butanol 06 / 4 horas
Impregnação/ Infiltração	2 vezes em parafina 1 hora a 62 °C inclusão em cassette/12 horas	cassete / 48 horas	frasco vidro / 10 dias
Inclusão	Molde	Molde	Molde
Microtomia	7 µm	7 µm	7 µm
Desparafinização, Hidratação e Coloração	dois banhos em xilol / 5 minutos cada dois banhos em álcool absoluto / 1 minuto cada banho em álcool 90%, 80% e 70% / 1 minuto cada e água / 5 minutos azul de toluidina / 10 minutos montagem em bálsamo do Canadá	três banhos em éter de petróleo / 5 minutos cada dois banhos em álcool absoluto / 1 minuto cada banho em álcool 90%, 80% e 70% / 1 minuto cada e água / 5 minutos safranina / 2 minutos montagem em bálsamo do Canadá	dois banhos em xilol / 5 minutos cada dois banhos em etanol absoluto / 1 minuto cada banho em etanol 90% - 80% - 70% / 1 minuto cada água / 5 minutos safranina / 10 minutos montagem em bálsamo do Canadá

⁽¹⁾Butanol: 01 – Etanol 95% + Butanol terciário + água destilada (5:1:4); 02 – Etanol 95% + Butanol terciário + água destilada (5:2:3); 03 – Etanol 95% + Butanol terciário + água destilada (5:3,5:1,5); 04 – Etanol 95% + Butanol terciário (1:1); 05 – Etanol 95% + Butanol terciário (1:3); 06 – Butanol terciário + clorofórmio (3:1).

Resultados e Discussão

As lâminas coradas, obtidas nos três métodos testados, não resultaram em qualidade mínima necessária para serem adotadas em uma rotina de preparo e subsequente avaliação de estruturas celulares. Apesar da baixa qualidade, algumas observações podem ser utilizadas como referência para a definição de uma metodologia histológica eficiente para esse tipo de tecido.

Observou-se que, em todas as sequências metodológicas, ocorreu uma sobreposição de camadas de células e ruptura dos tecidos, problemas estes relacionados possivelmente às etapas de fixação e infiltração. De acordo com Ruzin (1999), a penetração no tecido e a velocidade de fixação variam de acordo com o tipo de fixador utilizado, como no caso de solução FAA, que penetra mais rapidamente, comparada às soluções aquosas, sendo a relação de 30 a 60 minutos por mililitro de amostra, quando fixada em temperatura ambiente, a mais indicada.

No presente trabalho, o tempo utilizado nas metodologias foi 24 ou 48 horas, considerado adequado para o volume de solução aplicado aos fragmentos fixados. Entretanto, um bom fixador não deve escurecer os tecidos ou deixá-los quebradiços ou frágeis, e sim deixá-los aptos para ser corados seletivamente.

Na microtomia recomenda-se a espessura de 4 μm a 6 μm , sendo que Ruzin (1999) afirma que a infiltração influencia a qualidade do seccionamento quando ocorre de forma irregular, levando à desintegração do tecido ou quebra das secções, características estas observadas na sequência 2.

Aspecto a ser observado na etapa de coloração diz respeito à técnica empregada, pois apenas algumas estruturas teciduais são evidenciadas, por ser difícil o preparo de uma lâmina que mostre

todos os componentes celulares e os detalhes dos tecidos. Neste trabalho, em nenhuma sequência, a coloração favoreceu essas estruturas diferenciadas.

Conclusões

Em razão da qualidade das imagens obtidas nos cortes histológicos de tecidos embriogênicos de cupuaçuzeiro, não foi possível obter sequência metodológica adequada para o tipo de tecido avaliado. Ainda assim, recomenda-se o aproveitamento das etapas como passos iniciais na sequência de ensaios histológicos para essa cultura.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Hague, v. 1, p. 187-194, 1996.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322 p.

VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 9-18, 2001.