

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.

Estudo de Técnicas para Obtenção de Cortes Histológicos de Calos Organogênicos de Castanheira-do-Brasil

Giselle Costa Lima
Graziela Silva dos Santos Guimarães
Regina Caetano Quisen

Resumo

O uso de técnicas histológicas baseadas em mudanças anatômicas e histoquímicas tem contribuído significativamente para o entendimento dos efeitos do cultivo *in vitro*. Essas informações são essenciais para a compreensão dos processos de desenvolvimento de células, tecidos e órgãos, como no caso dos estudos de clonagem *in vitro* de espécies florestais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes técnicas de preparo de lâminas histológicas permanentes de calos organogênicos de castanheira-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.). Para tal, porções de calos organogênicos obtidos a partir de explantes foliares de *B. excelsa* foram submetidas a diferentes condições de fixação, desidratação, infiltração e coloração, com variações nos reagentes, tempos e concentrações. Houve baixa qualidade dos cortes obtidos na avaliação de estruturas organogênicas em calos resultantes de explantes foliares de castanheira-do-brasil; somente a sequência metodológica III

produziu cortes de melhor visualização e que permitem ser otimizados em futuros ensaios, visando à determinação de protocolo para esse tecido.

Termos para indexação: *Bertholetia excelsa* H.B., histologia, morfogênese in vitro, espécies arbóreas tropicais.

Studies of Techniques to Obtain Histological Slides from Organogenic Callus of Brazil Nut

Abstract

The use of histological techniques based on anatomical and histochemical changes has contributed significantly to the understanding of the aspects of plant tissue culture, as they provide essential information about development processes of cells, tissues and organs, i.e., studies about in vitro cloning of forest species. This work aimed to compare different techniques of preparation of permanent histological slides from organogenic callus of the *Bertholetia excelsa* H.B. Portions of callus obtained from leaf explants were subjected to different conditions (reagents, times and concentration) of fixation, dehydration, infiltration and staining. The low quality of the slides obtained in the evaluation of structures in callus from leaf explants of the Brazil nut tree, only the methodological sequence II produced better visualization and allowing futures studies aimed at determining protocol for this tissue.

Index terms: *Bertholetia excelsa* H.B., histology, in vitro morphogenesis, tropical tree species.

Introdução

A Embrapa Amazônia Ocidental, por meio do Projeto de Pesquisa “Propagação vegetativa para o uso e conservação de espécies florestais tropicais”, desde 2010, vem desenvolvendo estudos de propagação clonal de espécies de importância econômica para a região, tal como a castanheira-do-brasil (*B. excelsa* H.B.). Essa espécie apresenta sementes com processo germinativo lento e desuniforme, podendo, sob condições normais, levar de 12 a 18 meses para germinar (MÜLLER, 1982; MÜLLER et al., 1980). Neste contexto, a utilização da técnica de micropropagação pode ser considerada como alternativa à multiplicação, bem como ferramenta de clonagem que visa à maximização da qualidade e uniformidade da muda plantada e sobretudo a viabilização de sua aplicabilidade comercial.

A recalcitrância *in vitro* e a baixa capacidade morfogenética, características das culturas lenhosas tropicais, também têm sido observadas nos estudos com *B. excelsa*, e, como consequência, os avanços no desenvolvimento dessas tecnologias têm sido bastante lentos e até mesmo inexistentes, haja vista principalmente o desconhecimento dos seus padrões morfogenéticos na cultura de tecidos. Esses processos, que ocorrem por causa da integração da divisão e diferenciação celular, via ensaios com tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação, podem adquirir novas competências por meio da ação de determinados sinais químicos, resultando na expressão morfogenética em dois níveis básicos: organogênese e embriogênese somática, intermediado ou não pela calogênese (GEORGE et al., 2008).

Estudos complementares, como análise dessas estruturas baseadas em mudanças anatômicas e histoquímicas, podem contribuir significativamente para o entendimento dos efeitos do cultivo e das diferentes etapas do processo da organogênese ou

embriogênese somática da castanheira, principalmente no que diz respeito à compreensão dos estímulos e condições necessárias para indução e controle desses processos morfogênicos. Neste caso, mesmo sendo o crescimento dos tecidos dinâmico e os cortes histológicos estáticos e fixos no tempo, representando um momento do processo de desenvolvimento, a origem de tecidos e órgãos pode ser inferida a partir da observação de cortes histológicos, como na investigação da origem de estruturas específicas – brotos e raízes adventícias, embriões e outros – desenvolvidas que podem ser amostradas e estudadas ao longo do tempo, ou examinada a estrutura madura.

A observação do material biológico em microscopia, por sua vez, implica uma série de procedimentos técnicos para a confecção de lâminas histológicas definitivas, que são executadas em cinco fases após a coleta do material, a saber: fixação, inclusão (com desidratação e infiltração), microtomia (corte), coloração e montagem.

Para a castanheira-do-brasil, além da escassez de estudos sobre a sua propagação *in vitro*, inexistem relatos com abordagens histológicas de estruturas provenientes de processos morfogênicos. Para outras espécies perenes, ao contrário, esse tipo de abordagem tem avançado significativamente, como os estudos histológicos das culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, os quais evidenciaram que a origem das massas meristemáticas ocorreram a partir de tecidos da subepiderme (GUERRA; HANDRO, 1998). Esses mesmos autores descreveram os pró-embriões e os embriões nos diferentes estádios de maturação. Neste sentido, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estádios da cultura de tecidos da castanheira-do-brasil, por meio de análises histológicas, são necessários para melhor entendimento dos processos morfogênicos e maximização de protocolos eficientes de clonagem da espécie.

Assim, em razão da inexistência, na literatura, de procedimentos técnicos específicos para essa espécie, este trabalho teve como objetivo testar diferentes condições de preparo de lâminas histológicas permanentes de calos organogênicos obtidas a partir da cultura de tecidos de castanheira-do-brasil.

Material e Métodos

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

Para as três diferentes sequências metodológicas testadas (Tabela 1), foram utilizadas amostras de massas calosas obtidas a partir da cultura de explantes foliares de castanheira-do-brasil mantidos em condições de crescimento *in vitro*. Para tal, após a seleção das amostras, porções de calos foram imediatamente fixados em solução FAA₅₀ (formol 5%, ácido acético 5%, etanol 50 90%) por tempos diferentes e desidratadas em série de concentração crescente de etanol/butanol ou etanol/xilol. A seguir, as amostras foram infiltradas de duas maneiras distintas: (1) em parafina liquefeita em cassete ou, (2) em recipientes de vidro, sendo que, neste último caso, pequenas porções de parafina aquecida foram acrescentadas, aos poucos, 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 micrótopo rotativo em espessuras variáveis de 5 μm – 10 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.

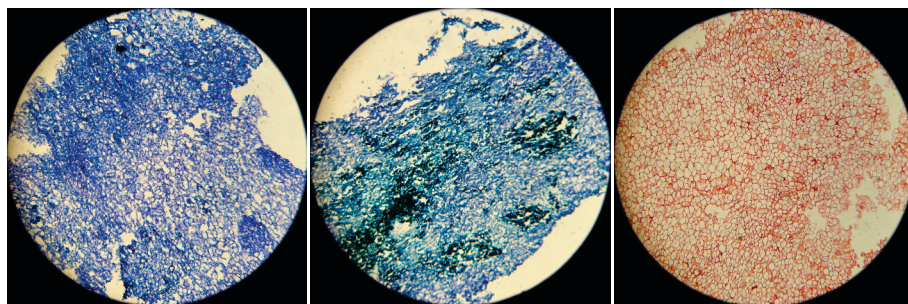
Tabela 1. Etapas da preparação de lâminas histológicas de massas calosas de castanheira-do-brasil. Manaus, 2012.

Etapa	Seqüência I	Seqüência II	Seqüência III
Fixação	FAA / 24 horas	FAA / 24 horas	FAA / 80 horas
Desidratação	etanol 80% / 1 hora etanol 90% / 1 hora etanol absoluto / 12 horas xilol / 4 horas xilol / 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 butanol absoluto / 4 horas ⁽¹⁾ butanol 06 / 4 horas	etanol 50% / 1 hora butanol 95% / 2 horas butanol 95% / 4 horas butanol 95% / 4 horas butanol 95% / 4 horas butanol 95% / 4 horas três banhos em butanol absoluto / 20 minutos cada
Infiltração	cassete / 12 horas	cassete / 24 horas	frasco vidro / 10 dias
Inclusão	Molde	Molde	Molde
Microtomia	7-10 µm	7-10 µm	5-7 µm
Desparafinização e Coloração	três banhos em xilol / 5 minutos cada azul de toluidina / 5-10 minutos etanol absoluto / 1 minuto montagem em bálsamo do Canadá	dois banhos em éter de petróleo / 2-5 minutos cada azul de toluidina / 5-10 minutos etanol absoluto / 1 minuto montagem em bálsamo do Canadá	dois banhos em xilol / 5 minutos cada seqüência de banhos em etanol: 95%, 70%, 50%, 30% e água / 5 minutos cada seqüência de banhos em água e etanol 30%, 50%, 70%, 95% e xilol / 5 minutos cada safranina / 45 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 obtidas nos três métodos testados não apresentaram qualidade mínima necessária para serem adotadas em uma rotina de avaliação de eventos morfogênicos e de estruturas celulares nos calos organogênicos (Figura 1). As sequências I e II apresentaram a ruptura dos tecidos, enquanto na sequência III foi possível visualizar mais claramente as células e o detalhamento de outras organelas. Apesar desses resultados, esses ensaios são as primeiras tentativas para a definição de métodos histológicos para a espécie, e, neste caso, algumas observações serão comentadas em razão do resultado obtido, pois servem como referência para os próximos trabalhos visando à definição de protocolo para esse tipo de tecido.



Fotos: Giselle Costa Lima

Figura 1. Cortes histológicos de calos organogênicos de castanheira-do-brasil. Sequências metodológicas I, II e III. Manaus, 2012.

Segundo Sass (1951), a etapa de fixação é uma das mais importantes e críticas no processamento de tecidos, pois deve evitar a autólise do material, o enrijecimento do tecido, preservar e melhorar a diferenciação ótica das estruturas, precipitar proteínas, dentre outros. Nessa fase, as soluções fixadoras afetam de várias formas a qualidade da fixação do material, incluindo temperatura, pH, osmolaridade, tempo de fixação e a taxa de penetração (RUZIN, 1999; SILVEIRA, 2006). No presente trabalho somente a

variável tempo foi controlada com 24 horas nos dois primeiros métodos e com 80 horas no terceiro teste. Esse tempo maior de imersão da amostra em solução FAA50 pode ter influenciado na qualidade do corte obtido, visto que o formol é um fixador lento (SILVEIRA, 2006), podendo inclusive aumentar o número de reações com grupos químicos ácidos e influenciar a intensidade de alguns tipos de corantes, devido à maior afinidade pelo substrato fixado (RUZIN, 1999; SILVEIRA, 2006).

No processo de desidratação, a utilização de etanol a 80% e 70%, nas sequências I e II, respectivamente, podem ter provocado maior endurecimento do tecido comparado à sequência III, onde utilizou-se inicialmente o etanol a 50%, sendo neste caso a desidratação mais lenta. Nas metodologias II e III, as maiores concentrações do álcool podem ter favorecido a distorção pronunciada do tecido, enquanto que o butanol, um menor endurecimento e retração das amostras.

Na sequência III, o processo de inclusão de 10 dias com evaporação gradual do butanol potencializou uma infiltração lenta e homogênea da parafina na amostra, visto que tratamentos com diferentes substâncias, antes da microtomia, que solidificam a parafina com a evaporação do solvente, resultam em uma massa firme, evitando dessa maneira a ruptura dos tecidos.

Na microtomia, normalmente a espessura dos cortes varia de 1 μm a 50 μm ; recomenda-se, entretanto, a espessura em microscopia óptica de 4 μm a 6 μm , medida aplicada na sequência III. Ruzin (1999) comenta que a infiltração influencia a qualidade do seccionamento quando ocorre de forma irregular, levando à desintegração do tecido ou quebra das seções, características estas observadas nas imagens das sequências I e II. Na coloração, por sua vez, a hidratação gradual com alcoóis de teor decrescente somente foi utilizada na metodologia III, sendo esse procedimento importante para impedir o rompimento dos tecidos, além da clarificação com xilol.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- As metodologias de processamento de tecidos testadas não apresentaram qualidade mínima necessária para serem adotadas na preparação e avaliações histológicas de calos induzidos a partir de explantes foliares de castanheira.
- A sequência metodológica III pode ser utilizada como orientação para novos ensaios de preparação desses tecidos.

Agradecimento

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Referências

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Backgrouns, 2008. v. 1.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, Tokyo, ok.v. 111, p. 65-71, 1998.

MÜLLER, C.H. **Quebra de dormência e enxertia em castanha-do-brasil**. Belém: Embrapa-CPATU, 1982. 40p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 16).

MÜLLER, C.H.; RODRIGUES, L.A.; MULLER, A.A.; MULLER, N.R.M.
Castanha-do-brasil: resultados de pesquisa. Belém, EMBRAPA-
CPATU, 1980. 25p. (Miscelânea, 2).

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

SASS, J. E. **Botanical microtechnique.** Ames: Iowa State University
Press, 1951. 228 p.

SILVEIRA, S. O. **Orientação para práticas de laboratório.** Santa
Maria: Universidade de Santa Maria, 2006. 60 p.