

Isolamento e cultivo de micrósporos e pólen de feijão: primeiros resultados.

Rodrigues, Lia Rosane¹; Beauvalet, Cíntia Silva ²; Mariath, Jorge Ernesto de Araujo³

¹Pesquisador IV da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Caixa Postal 44, Veranópolis, RS, Brasil, fone 54 3441 1374, e-mail: liarr@ufrgs.br. ²Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Departamento de Botânica, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Professor Titular do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

Plantas haplóides ou duplo-haplóides de feijão (*Phaseolus vulgaris* L., $2n=2x=22$) ainda não foram obtidas *in vitro*, pois as técnicas para haplodiploidização estão em uma condição preliminar para essa espécie (Croser *et al.*, 2006). Micrósporos e pólen imaturo estão presentes em anteras de botões florais de 2 a 2,5 mm (Rodrigues *et al.*, 2006a). Nesse momento do desenvolvimento dos botões, as células dos tecidos estaminais (diplóides) estão em plena condição de proliferar-se *in vitro*, tal como registrado em *Cajanus cajan* (Vasil, 1967), *Medicago sativa* (Saunders & Bingham, 1972) e *Glycine max* (Rodrigues *et al.*, 2005), podendo inibir a resposta das células haplóides.

Várias outras limitações também são associadas ao cultivo de anteras (Rodrigues *et al.*, 2004), por isso, o cultivo de micrósporos isolados oferece melhores condições para a indução de micrósporos e pólen imaturo à embriogênese. Porém, ainda não há registro do emprego desse sistema em feijão. Por isso, foi executada uma seqüência de experimentos com o objetivo de estabelecer condições apropriadas para o isolamento e o cultivo de micrósporos e pólen imaturo de feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Plantas da cultivar BR IPAGRO-44 foram semeadas em vasos e mantidas sob cuidados fitotécnicos em casa de vegetação (latitude 30°03'S, longitude 51°10'W, variação térmica de 14 a 30°C). No florescimento, botões florais foram coletados e tiveram suas brácteas removidas para seleção ao estereomicroscópio de acordo com o comprimento. Em fluxo estéril, botões de comprimento 2-2,5 mm foram desinfestados de acordo com Rodrigues *et al.* (2006b) e conservados sobre papel filtro autoclavado umedecido com água destilada esterilizada.

Teste de isolamento:

Os tratamentos constituíram-se no modo de preparo dos tecidos para o procedimento de isolamento: Imersos em meio nutritivo líquido, 20 botões foram seccionados transversalmente em 5 a 6 fatias e outros 20 botões foram divididos longitudinalmente em duas partes. Nos dois casos, sépalas, pétalas e gineceu não foram retirados. No tratamento controle, androceus foram excisados de 20 botões e reunidos em uma gota de meio. Foi usado o meio PTA-15 com pH 6 (Skinner & Liang, 1996), com a concentração previamente testada de 110 g sacarose L⁻¹. Após o preparo de cada conjunto de botões, procedeu-se à maceração com bastão de vidro, acréscimo de 4 mL de meio líquido dentro de um erlenmeyer 50 mL e agitação em agitador magnético por 4 min. O extrato bruto foi submetido à filtração em malha de náilon com poros de 37 µm e tripla lavagem no mesmo meio através das etapas: centrifugação a 2000 rpm por 3 min (condição previamente testada); descarte de 700 µL do meio; ressuspensão do pélete em mesmo volume de meio. O procedimento foi repetido com outros 60 botões com o acréscimo de uma filtração adicional em malha com poros de 56 µm prévia à filtração em 37 µm. Os isolados obtidos de cada combinação de tratamentos (3 preparos dos botões x 2 modos de filtração) foram divididos em 4 alíquotas de 1 mL para a avaliação da qualidade da suspensão, totalizando 24 alíquotas. A partir de cada alíquota, 50 µL foram gotejados sobre hemocitômetro para determinação da densidade da suspensão (nº de células mL⁻¹ de meio). Em seguida, foi feita a amostragem para determinação de viabilidade das células em cultivo:

centrifugação por 4 min; remoção de 740 μL do meio; retirada de 10 μL do pélete fresco e mistura a 10 μL do corante azul de algodão (AA) sobre lâmina de vidro; cobertura com lamínula; quantificação da reação positiva e negativa ao corante em microscópio óptico em campo claro. O pélete restante foi fixado em 1 mL de solução Farmer (etanol: ácido acético glacial, 3:1) por 12 a 24 h a temperatura ambiente e foi congelado. Para a quantificação das categorias em cultivo, acrescentou-se 120 μL de carmim acético 0,5% a cada alíquota congelada, 24 h antes da análise ao microscópio. Os constituintes das suspensões foram classificados de acordo com a morfologia nas categorias: tétrades, micrósporos íntegros, pólen imaturo íntegro, pólen maduro íntegro, micrósporos e pólen plasmolizados, micrósporos e pólen enucleados; micrósporos e pólen rompidos; células estaminais rompidas (denominadas de debris). Aproximadamente 150 observações foram feitas por lâmina, totalizando 3754 observações.

Cultivo *in vitro*:

Uma vez definida uma técnica de isolamento, o efeito de concentração de sacarose e sais foi testado em meio PTA-15 (Skinner e Liang, 1996) mas não ocorreram divisões celulares associáveis ao desvio da rota gametofítica. Por isso, a partir de 108 botões de 2 a 2,5 mm da mesma cultivar, foram isolados micrósporos em meio líquido Nitsch & Nitsch (1970) com 90 g sacarose L^{-1} , pH 6. Após a tripla lavagem, o pélete foi ressuspenso no mesmo meio, acrescido de diferentes tipos e concentrações de fitoreguladores: 1^o, sem reguladores; 2^o, 1 mg ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) L^{-1} ; 3^o, 1 mg 2,4-D + 1 mg cinetina (KIN) L^{-1} ; 4^o, 1 mg ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T) L^{-1} ; and 5^o, 1 mg 2,4,5-T + 1 mg KIN L^{-1} . A densidade de cultivo foi ajustada para 50000 células mL^{-1} e alíquotas de 600 μL foram estabelecidas em placas Corning[®] de 24 poços com 4 repetições por tratamento, totalizando 20 alíquotas. Foram estabelecidas, aproximadamente, 600000 células.

Os cultivos foram mantidos no escuro a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Amostras de 100 μL foram tomadas de cada alíquota nos dias 0, 3, 6 e 9 *in vitro*, fixadas em solução de Farmer e analisadas em carmim acético ao microscópio de modo similar ao teste de isolamento.

Respostas ao cultivo foram quantificadas em análise serial ao microscópio. Aproximadamente 200 observações foram tomadas por lâmina, totalizando 13229 registros.

Procedimentos estatísticos:

Os dados foram submetidos em números absolutos aos testes de normalidade, igualdade das variâncias e análise da variância paramétrica. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de isolamento:

A densidade das suspensões de todos os tratamentos variou de 17500 a 40000 células, sem diferença significativa entre tratamentos (Tabela 1). A densidade média da solução foi de 30000 células, indicando ser necessário o processamento de maior número de botões para atingir uma densidade próxima das recomendadas, entre 10000 (10^4) e 100000 (10^5).

A reação de micrósporos e pólen frescos de feijão ao AA é uma técnica acessível para determinação de viabilidade, apesar do risco de superestimativa registrado em observações prévias. Em ensaio preliminar com pólen da mesma cultivar *in vivo*, houve 87% de reação positiva ao AA. Nesse trabalho, a coloração do material isolado ao AA variou em torno de 71 a 94%, indicando que o procedimento de isolamento não alterou a capacidade de reação das células ao corante.

Todas as suspensões apresentaram 70 a 90% de micrósporos e pólen íntegros, mas os melhores resultados foram obtidos com dupla filtração, exceto no que se referiu ao número de micrósporos e pólen morfológicamente íntegros. Ainda que essa categoria tenha sido significativamente menor mediante dupla filtração, a viabilidade foi significativamente superior em suspensões assim obtidas.

Foi observada grande quantidade de conteúdo citoplasmático de células estaminais extravasado nas suspensões obtidas de botões seccionados. Contudo, não foram encontradas células estaminais inteiras e os debris corresponderam apenas a células

rompidas. A combinação de tratamentos mais vantajosa para isolamento foi a dupla filtração de androceus individualizados, a qual corresponde à tarefa mais laboriosa e demorada.

Tabela 1. Análise de variância paramétrica de três fatores avaliados no teste de isolamento.

Fatores		Densidade (células mL ⁻¹)		Viabilidade (%)		Íntegros (%)			
		Média	Pr>F	Média	Pr>F	Média	Pr>F		
Filtração	Simples	27500	0,5733	79	b	0,0054	83	a	0,0224
	Dupla	32500		90	a		77	b	
Tecido	Androceus	37500	0,3913	79		0,1289	90	a	<0,001
	Botão dividido	22500		88			79	b	
	Botão seccionado	30000		87			71	c	
CV%		23,76		10,28		7,02			

Cultivo *in vitro*:

Ao longo do cultivo, foi observado, sem quantificação, o aumento de tamanho de parte dos micrósporos e do pólen imaturo. Nas condições testadas, uma fase multinucleada não esteve associada à embriogênese, uma vez que núcleos extras ocorreram também no dia 0. Também foram observados protoplastos espontâneos que podem ser resultantes da quebra da parede dos micrósporos durante o procedimento de isolamento.

Ao longo de 9 dias *in vitro*, a degradação das células em cultivo aumentou significativamente, incluindo a presença de enucleados e plasmolizados. O tempo *in vitro* e as combinações de fitorreguladores não afetaram a proporção de rompidos. A categoria atípicos (incluindo pólen com núcleos simétricos, multinucleados e células com nucléolos extranumerários) foi significativamente menos numerosa nos meios contendo 2,4-D, independente da presença de KIN, correspondendo a 0,8%. Nos meios contendo 2,4,5-T, 2,6% das observações corresponderam a essa categoria.

Em todos os meios testados, exceto naquele contendo 1 mg 2,4-D L⁻¹, foram observadas no mínimo uma estrutura multicelular resultante de divisões de micrósporos ou de pólen imaturo. Aos 6 dias *in vitro*, uma estrutura de 4 células foi registrada em 1 mg 2,4,5-T L⁻¹. Aos 9 dias, quatro estruturas foram registradas. A ausência de resquílios da parede do pólen nessas estruturas sugere que elas se originam de protoplastos ou que a parede rompe-se ainda na primeira divisão atípica. Tais estruturas não podem ser confundidas com tétrades que tenham ocasionalmente ingressado *in vitro*, porque não são oferecidas condições para dissociação da calose e porque há adesão entre as células, indicando que elas originaram-se da mesma divisão.

Os trabalhos em que a indução à embriogênese do micrósporo de feijão foi testada por meio de cultivo de anteras apresentaram várias limitações (Peters *et al.*, 1977; Bajaj & Singh, 1980). Por isso, os eventos registrados nesse trabalho são inéditos e indicam que micrósporos de feijão podem dividir-se *in vitro*, desde que oferecidas condições de cultivo adequadas. Os procedimentos desenvolvidos nessa laboriosa seqüência de ensaios permitiram, de forma inédita, o cultivo de micrósporos e pólen imaturo de feijão na ausência de tecidos estaminais, abrindo novas perspectivas para a obtenção de haplóides e duplo-haplóides e para a manipulação genética *in vitro* dessa espécie.

CONCLUSÃO

A dupla filtração de androceus individualizados gerou suspensões de micrósporos de feijão com características satisfatórias quanto à viabilidade, densidade e pureza. Divisões celulares ocorreram em pequena proporção dos micrósporos na maioria das combinações de fitorreguladores testadas em meio líquido. Todos os registros são inéditos para a espécie e abrem perspectivas para uma nova abordagem à embriogênese do micrósporo de feijão.

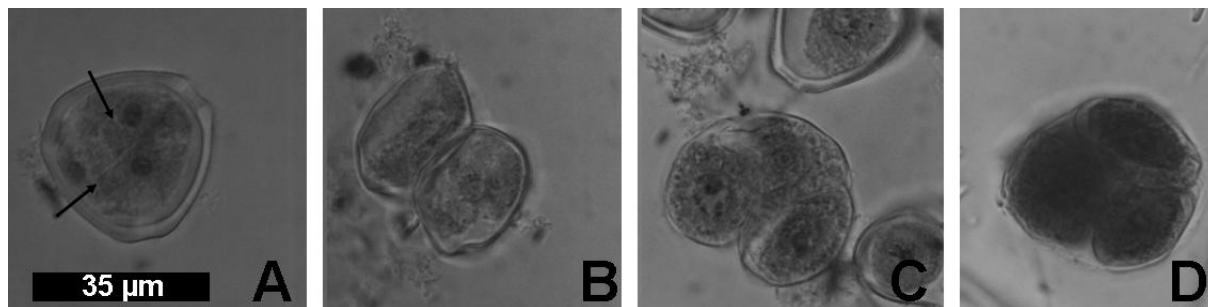


Figura 1. Divisões celulares registradas no cultivo *in vitro*. A) Pólen com 3 células. As setas apontam espaços intercelulares. B) Duas células resultantes de uma mesma divisão celular, possivelmente a partir de protoplasto de micrósporo. C) Estrutura com 3 células aos 9 dias de cultivo. D) Estrutura com 4 células aos 6 dias de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, Y.P.S.; SINGH, H. *In vitro* induction of androgenesis in mung bean *Phaseolus aureous* L. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 18, p. 1316-1318, 1980.

CROSER, J.S.; LÜNSDOLF, M.M.; DAVIES, P.A.; CLARKE, H.J.; BAYLISS, K.L.; MALLIKARJUNA, N.; SIDDIQUE, K.H.M. Toward doubled haploid production in the Fabaceae: progress, constraints, and opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 139-157, 2006.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Obtention de plantes haploids à partir de pollen. **Bulletin de la Societe Botanique de France**, v. 117, p. 339-360, 1970.

PETERS, J.E.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; PADDOCK, E.F.; TEGENKAMP, I.; TEGENKAMP, T. Haploid callus cells from anthers of *Phaseolus vulgaris*. **Phytomorphology**, v. 27, p. 89-75, 1977.

RODRIGUES, L.R.; BEAUVALET, C.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A. Etapas da androsporogênese e da androgametogênese de *Phaseolus vulgaris* L. de acordo com o tamanho do botão floral. In: 57^o CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 2006, Gramado. **CD Resumos**. Gramado: Sociedade Brasileira de Botânica, 2006a, resumo 2530.

RODRIGUES, L.R.; FORTE, B.C.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Isolation and culture of soybean microspores and pollen grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p. 537-545, 2006b.

RODRIGUES, L.R.; MARIATH, J.E.A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Cultivo de anteras x cultivo de micrósporos isolados: dez razões para uma nova abordagem da embriogênese do micrósporo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 50-53, 2004.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.80, p. 129-137, 2005.

SAUNDERS, J.W.; BINGHAM, E.T. Production of alfalfa plants from callus tissue. **Crop Science**, v. 12, p. 804-808, 1972.

SKINNER, D.Z.; LIANG, G.H. Haploidy in alfalfa. In: MOHAN, S.J.; SOPORY, S.K.; VEILLEUX, R.E. (eds) **In vitro Haploid Production in Higher Plants 3: Important Selected Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. pp 365-375.

VASIL, I.K. Physiology and cytology of anther development. **Biological Review**, v.42, p.327-373, 1967.

PALAVRAS-CHAVES:

Phaseolus vulgaris; embriogênese; androgênese; haplodiploidização; duplo-haplóide.