

Isolamento e cultivo *in vitro* de micrósporos e grãos de pólen.

Rodrigues, Lia Rosane¹

¹Pesquisador IV da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Laboratório de Cultura de Tecidos. Rua Gonçalves Dias, 570, Porto Alegre, CEP 90130-060, RS, Brasil. Fone 51 3388 8000. E-mail: liarr@ufrgs.br.

O estabelecimento de células, tecidos ou órgãos vegetais *in vitro*, sob condições controladas, pode interromper o sistema de sinalização a que estas partes vegetais estão submetidas, sem, contudo, inviabilizá-las. Sendo expostas a uma nova condição ambiental, as células podem apresentar uma resposta morfogênica que não se expressaria *in vivo*. As condições de cultivo podem tanto permitir a continuidade de um padrão de desenvolvimento, inviabilizado na planta, quanto promover a desdiferenciação e a neomorfogênese pelas vias organogênica ou embriogênica (Dodeman et al., 1997; Von Arnold et al., 2002; Jiménez, 2001). Nesta última via, há formação de embriões a partir de células do esporófito (de variados tipos celulares do corpo vegetal) ou do gametófito (Reynolds, 1997). Ainda são poucas as informações sobre indução de embriogênese no xenófito (endosperma) (Tulecke et al., 1988; Garg et al., 1996). No caso do gametófito masculino (pólen), há registros de embriogênese *in vitro* tanto a partir da célula que o origina, o micrósporo, quanto das células que constituem o pólen, denominadas vegetativa e generativa, ou de ambas (Pretová et al., 1993).

Por definição, o micrósporo possui apenas um núcleo haplóide não-polarizado e, a partir da sua vacuolação, já é um pólen (Mariath et al., 2003). Tanto micrósporos quanto gametófitos podem ser estabelecidos *in vitro* para indução à embriogênese. Para isso, devem ocorrer divisões celulares atípicas capazes de alterar o seu destino (Pretová et al., 1993).

Os embriões induzidos *in vitro* podem apresentar variados graus de organização celular em relação ao modelo zigótico. O produto das divisões celulares pode ser um embrião completo ou, no caso de falhas da histodiferenciação, um embrião incompleto ou defectivo (Von Arnold et al., 2002; Rodrigues et al., 2005a).

A embriogênese de origem gametofítica foi registrada na década de 1960, por pesquisadores indianos, ao estabelecerem anteras de *Datura innoxia* em meio nutritivo. Nas condições oferecidas, os gametófitos apresentaram um desvio da rota de desenvolvimento e originaram esporófitos haplóides (Guha & Maheshwari, 1964, 1966).

A capacidade de formação de novos tecidos a partir de divisões celulares do gametófito havia sido registrada anteriormente por alguns autores. Entretanto, foram os registros em *Datura innoxia* que impulsionaram a pesquisa neste tema. Desde então, foram conduzidos cultivos experimentais para obtenção de plantas androgênicas de inúmeras espécies, principalmente as cultivadas. Nas condições de cultivo propostas, espécies "responsivas" tornaram-se modelo para estudo dos fatores que alteram e redirecionam o desenvolvimento gametofítico, das condições fisiológicas predisponentes, dos padrões das divisões celulares na transição gametófito-esporófito e das condições de cultivo que favorecem a regeneração de plantas (Maheshwari et al., 1982).

Como consequência, o cultivo de anteras consolidou-se como sistema de obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides. Entretanto, neste sistema, os micrósporos e gametófitos são estabelecidos *in vitro* envolvidos por tecidos esporofíticos da antera (frequentemente estratos parietais e conectivo). À medida que cultivos de anteras foram conduzidos com espécies de diferentes táxons, foi registrado que, em algumas espécies, havia proliferação preferencial dos tecidos esporofíticos. Dentre as espécies que apresentaram esta resposta, foram citadas: *Cajanus cajan* (Vasil, 1967), *Ranunculus sceleratus* (Konar & Nataraja, 1965), *Medicago sativa* (Saunders & Bingham, 1972), *Petunia* spp (Sangwan & Norreel, 1975), *Hevea brasiliensis* (Wang et al., 1980), *Cichorium intybus* (Guedira et al., 1989), *Vitis rupestris* (Altamura et al., 1992), *Manihot esculenta* (Woodward &

Puonti-Kaerlas, 2001), *Malus* spp (Ochatt & Zhang 1996), *Oenothera hookeri* (Martinez & deHalac, 2000), *Pometia pinnata* (Sudarmonowati et al., 2000) e *Glycine max* (Rodrigues et al., 2004a).

É comum que, além de competir *in vitro* por nutrientes, invadir ou comprimir o espaço intralocular e produzir grande quantidade de compostos fenólicos, as proliferações de origem esporofítica originem estruturas embriogênicas (Rodrigues et al., 2005a,b).

As constatações de que o cultivo de anteras não é um sistema exclusivamente androgênico impulsionaram o avanço do cultivo de micrósporos e gametófitos isolados, o qual tem substituído, com vantagens, o cultivo de anteras, em inúmeros laboratórios (Siebel & Pauls, 1989; Duijs et al., 1992; Jähne & Lörz, 1995; Rodrigues et al., 2004c).

A troca de sistema requer, primeiramente, o desenvolvimento de uma técnica de isolamento adequada às características dos botões florais em que são encontrados os estádios de micrósporo e gametófito jovem (pólen unicelular). O isolamento é feito em condições estéreis e com o objetivo de impedir o cultivo simultâneo de células esporofíticas e gametofíticas. O procedimento de isolamento deve garantir que micrósporos e gametófitos sejam estabelecidos ilesos e viáveis *in vitro*, em condições de sofrer as divisões mitóticas atípicas para originar esporófitos com a mesma constituição genética do gametófito (Huang & Keller, 1989; Jähne & Lörz, 1995).

A qualidade do isolado depende diretamente da pureza e da viabilidade das células em cultivo. A pureza corresponde às proporções numérica e volumétrica de micrósporos e gametófitos em relação à de resíduos parietais e conectivais, também denominados debris. É indispensável prevenir o ingresso de células esporofíticas inteiras no meio de cultivo, bem como reduzir a proporção de células gametofíticas mortas (Huang & Keller, 1989; Rodrigues et al., 2006).

Já foi demonstrado que as condições de cultivo para gametófitos isolados são distintas das condições de cultivo de anteras, inclusive para a mesma espécie. Além disso, tratando-se de um cultivo de estruturas microscópicas em diferentes estádios de desenvolvimento (microsporogênese, microgametogênese e embriogênese), este sistema requer o emprego freqüente de: filtros com poros de pequeno diâmetro (~ 15 a 150 µm); centrifugação com gradientes para separação de estratos de cada estágio de desenvolvimento; e, no mínimo, dois recursos de microscopia - um para determinação da viabilidade das células *in vitro* e outro para acompanhamento dos eventos morfogênicos (Rodrigues et al., 2004d).

Tanto o cultivo de gametófitos isolados quanto o cultivo de anteras servem como modelo para estudo dos diferentes aspectos da embriologia. Também servem à pesquisa aplicada, para a descoberta e manipulação de genes. As plantas haplóides e duplo-haplóides têm amplo emprego em trabalhos que buscam variabilidade para o melhoramento genético, permitindo construção de mapas de ligação, obtenção de linhagens homocigotas de espécies "autógamas" e a obtenção de genitores de espécies "alógamas".

Adicionalmente, o sistema de cultivo de micrósporos e pólen isolados oferece inúmeras possibilidades para manipulação genética, incluindo estudos de expressão gênica, indução de mutações, hibridação intertaxons *in vitro* e transformação genética.

Neste contexto, nossa equipe de pesquisa está conduzindo estudos para isolamento e cultivo de micrósporos e gametófitos de *Arachis hypogea*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*, espécies para as quais ainda não foram desenvolvidos protocolos para obtenção de plantas androgênicas (Croser et al., 2006). Até o presente, não identificamos outra equipe brasileira atuando neste tema. Apesar do amplo potencial, o progresso da pesquisa neste sistema *in vitro* dependerá de uma nova abordagem, obrigatoriamente multidisciplinar, da revisão de alguns conceitos equivocados e do emprego de técnicas eficientes para a interpretação das respostas morfogênicas.

Dentro do tema, há premissas antigas não consensualizadas, como a da relevância do dimorfismo polínico, e observações novas a serem interpretadas, como o recente registro de morte celular programada nos cultivos embriogênicos.

Apesar de o cultivo de micrósporos e pólen isolados ser pouco difundido no Brasil, é um sistema promissor para a indução à embriogênese de origem gametofítica das

numerosas espécies vegetais para as quais ainda não foram desenvolvidos protocolos. Nossa experiência comprova que ajustes simples permitem implantar esse sistema em um laboratório equipado para outros tipos de cultivo, por isso, estimulamos outros pesquisadores brasileiros a adotá-lo, como alternativa mais eficiente em relação ao cultivo de anteras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAMURA, M.M.; CERSOSIMO, A.; MAJOLI, C.; CRESPIAN, M. Histological study of embryogenesis and organogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. **Protoplasma**, v. 171, p. 134-141, 1992.
- 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.
- DODEMAN, V.L., DUCREUX, G; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.
- DUIJS, J.G.; VOORRIPS, R.E.; VISSER D.L.; CUSTERS, J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. **Euphytica**, v. 60, p. 45-55, 1992.
- GARG, L.; BHANDARI, N.N.; RANI, V.; BHOJWANI, S.S. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 855-858, 1996.
- GUEDIRA, M.; DUBOIS-TYLSKI, T.; VASSEUR, J.; DUBOIS, J. Embryogenèse somatique directe à partir de cultures d'anthers du *Cichorium* (Asteraceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 970-976, 1989.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. **Nature**, v. 5057, p. 97-98, 1966.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, v. 4957, p. 497, 1964.
- HUANG, B.; KELLER, W.A. Microspore culture technology. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 12, n. 4, p. 171-178, 1989.
- JÄHNE, A.; LÖRZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, v.109, p. 1-12, 1995.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.
- KONAR, R.N.; NATARAJA, K. 1965. Production of embryoids from the anthers of *Ranunculus sceleratus* L. **Phytomorphology**, v. 15, p. 245-248, 1965.
- MAHESHWARI, S.C.; RASHID, A.; TYAGI, A.K. Haploids from pollen grains – retrospect and prospect. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 5, p.865-879, 1982.
- MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P.; BITTENCOURT, N.S. 2003. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S. M. (Eds.) **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Ed. UFV. 438p.

MARTINEZ, L.D.; de HALAC, I.N. Morphogenesis in short-term and long-term anther derived calli of *Oenothera hookeri* de Vries. **Biocell**, v. 24, n. 3, p. 239-246, 2000.

MICHAUX-FERRIÉRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaeae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

OCHATT, S.J.; ZHANG, Y.X. 1996. *In vitro* Haploidization of Fruit Trees. In: MOHAN, S.J., SOPORY, S.K.; VEILLEUX, R.E. (Eds.) ***In vitro* Haploid Production in Higher Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 3, 412p.

PRETOVÁ, A.; RUIJTER, N.C.A.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. **Euphytica**, v. 65, p. 61-69, 1993.

REYNOLDS, T.L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 1-10, 1997.

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, n. 2, p. 129-137, 2005a.

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, 2006.

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, n. 2, p. 50-53, 2004c.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Embryogenic potential of soybean staminal tissues. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 2005b.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Effects of light conditions and 2,4-D concentration in soybean anther culture. **Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p. 125-133, 2004b.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 2, n. 3/4, p. 159-166, 2004d.

RODRIGUES, L.R.; TERRA, T.F.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Origin of embryo-like structures in soybean anther culture investigated using SSR marker. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 3, p. 287-289, 2004a.

SANGWAN, R.S.; NOREEL, B. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro*. **Nature**, v. 257, p. 222-224, 1975.

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

SIEBEL, J.; PAULS, K.P. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 78, p. 473-479, 1989.

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.

SUDARMONOWATI, E.; ROSMITHAYANI; RAHAYU, W. Regeneration of embryoids derived from anther culture and the production of artificial seeds in *Pometia pinnata*. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Technology**, v. 8, n. 1, p. 37-45, 2000.

TULECKE, W.; McGRANAHAN, G.; AHMADI, H. Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L Cv Manregian. **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 5, p. 301-304, 1988.

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

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v.120, p. 1-6, 2001.

PALAVRAS-CHAVES:

Androgênese; Embriogênese; Haplodiploidização; Gametófito; Embriões.