

Pré-tratamento a 4°C no cultivo de micrósporos isolados de soja.

Rodrigues, Lia Rosane¹; Mariath, Jorge Ernesto de Araujo²

¹Pesquisador IV da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Caixa Postal 44, Veranópolis, RS, Brasil, fone 54 3441 1374, e-mail: liarr@ufrgs.br. ²Professor Titular do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

A haplodiploidização é uma ferramenta biotecnológica ainda indisponível para o melhoramento da soja (*Glycine max*) (Croser *et al.*, 2006). Recentemente, Rodrigues *et al.* (2006) desenvolveram um procedimento inédito para isolamento de micrósporos e pólen imaturo dessa espécie, gerando suspensões com densidade e pureza satisfatórias ao estabelecimento de cultivos para obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides. Porém, pequena proporção de estruturas multicelulares foi obtida em cultivos preliminares com a cultivar BRSMT Uirapuru nesse sistema.

O cultivo de micrósporos isolados permite o teste de condições de cultivo adequadas à embriogênese do micrósporo na ausência de tecidos estaminais, evitando a proliferação preferencial de células diplóides conforme registrado no cultivo de anteras de soja (Rodrigues *et al.*, 2005a).

No cultivo de anteras de soja, estruturas embriogênicas de origem haplóide foram obtidas apenas a partir da geração segregante F₂ do cruzamento entre BRQ96-3065 e BRSMG-Liderança (Rodrigues *et al.*, 2004). As anteras de todas as demais cultivares brasileiras e americanas testadas apenas originaram estruturas embriogênicas de origem estaminal, ou seja, diplóide (Rodrigues *et al.*, 2005a).

Em algumas espécies, uma das respostas embriogênicas dos micrósporos é a formação de núcleos adicionais, em torno dos quais se organizariam novas células separadas por membranas, formando estruturas multicelulares as quais podem originar embriões e plantas em adequadas condições de cultivo (Reynolds, 1997). Em soja, o armazenamento de botões florais a 4°C no escuro aumentou significativamente a proporção de pólen com núcleos adicionais (Rodrigues *et al.*, 2005b). Por isso, foi executado um experimento com o objetivo de testar o efeito do pré-tratamento no cultivo de micrósporos isolados de duas cultivares consideradas responsivas, verificando a hipótese de que pólen multinucleado sofreria celularização para originar as estruturas multicelulares anteriormente registradas. Além disso, foi testado se o pré-tratamento também aumenta a proporção de micrósporos de soja responsivos, tal como registrado em cereais (Jähne & Lörz, 1995) e em canola (Gu *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas das cultivares BRSMT Uirapuru and BRSMG Liderança 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, inflorescências imaturas foram coletadas. Em parte do material, micrósporos foram imediatamente isolados de botões florais de 3 mm e estabelecidos *in vitro*. Os micrósporos de outra parte do material vegetal foram estabelecidos *in vitro* após armazenamento das inflorescências por 14 dias a 4°C no escuro dentro de recipientes plásticos contendo papel filtro umedecido. Botões tratados e não tratados foram submetidos à desinfestação e ao procedimento de isolamento em fluxo estéril de acordo com Rodrigues *et al.* (2006). Foi empregado meio de cultivo líquido PTA-15 com 90 g sacarose L⁻¹ e pH 6 (Skinner & Liang 1996) sem reguladores de crescimento. A suspensão foi fracionada em alíquotas de 500 µL, cada uma contendo em torno de 25000 células, estabelecidas em placas Corning® de 24 poços com 5 repetições e incubadas no escuro a 26±1°C. Aproximadamente 5x10⁵ células foram estabelecidas *in vitro*.

Amostras das suspensões iniciais (com e sem pré-tratamento) foram fixadas em solução de Farmer (etanol: ácido acético glacial, 3:1) por 12-24 h a temperatura ambiente; armazenadas em congelador; coradas em carmim acético 0,5%; gotejadas sobre lâminas de vidro; cobertas com lamínula; seladas com esmalte; e levadas ao microscópio para avaliação e quantificação dos constituintes em campo claro. Os constituintes das suspensões iniciais foram classificados de acordo com a morfologia nas categorias: tétrades, micrósporos íntegros, pólen imaturo (uninucleado) íntegro, pólen maduro (binucleado) íntegro, micrósporos e pólen plasmolizados, micrósporos e pólen enucleados; micrósporos e pólen rompidos.

As respostas ao cultivo foram analisadas ao microscópio a partir de amostras coletadas aos 14, 21 e 28 dias (exceto suspensões pré-tratadas, que foram descartadas antes dos 28 dias devido ao aparecimento de contaminação fúngica). As amostras foram preparadas e analisadas do mesmo modo que as suspensões iniciais.

Aproximadamente 200 observações foram feitas por lâmina, totalizando 3577 observações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do cultivo, as suspensões de Uirapuru apresentaram 41% de micrósporos, 11% de pólen imaturo (sendo ambas as categorias consideradas responsivas), 26% de pólen maduro e 22% de degradados ou atípicos. Liderança apresentou 60% de micrósporos, 19% de pólen imaturo, 13% de pólen maduro e 8% de degradados ou atípicos.

Protoplastos de micrósporos e pólen ocorreram independentemente do tratamento e do tempo *in vitro*. Em outras espécies, protoplastos de micrósporos e pólen são obtidos com a exposição a agentes osmóticos ou enzimas, que podem agir tanto sobre a calose na fase de tétrade, quanto sobre a exina e a intina da parede, em estádios mais avançados. Tais células podem responder ao cultivo, pois protoplastos de micrósporos de canola apresentaram divisões celulares *in vitro* (Sun *et al.*, 1999).

Após 28 dias *in vitro*, a proporção de micrósporos e de pólen íntegros em Uirapuru e Liderança decresceu de 78 e 92% para 50 e 42%, respectivamente. A maioria dessas células tomou uma rota degradativa e plasmolizou. Outra pequena proporção apresentou um destino divergente da rota gametofítica.

O pólen com núcleos simétricos é incapacitado ao processo de fecundação devido à ausência das células vegetativa e generativa, pois é resultante de divisão atípica do micrósporo, atribuída a inúmeros fatores, principalmente à expressão de alelos defectivos na geração gametofítica (Wilson & Yang, 2004). Foi registrado 1,7 e 0,5% de pólen simétrico nas suspensões de Uirapuru e Liderança, respectivamente, antes do cultivo. Diferentemente do que foi registrado nas cultivares IAS-5 e MG/BR 46 Conquista (Rodrigues *et al.*, 2005b), a proporção de pólen de Liderança com núcleos simétricos foi similar nos dois tratamentos. Nos cultivos de Uirapuru, material pré-tratado apresentou proporção superior de pólen simétrico (2,4% contra 0,9% em material não tratado).

Em ambos os tratamentos, alguns micrósporos apresentaram aumento no tamanho, coloração citoplasmática mais intensa e parede fina, provavelmente distendida. O aumento do volume celular dos micrósporos já foi registrado em várias espécies, sendo associado ao início da resposta embriogênica desde as observações de Sangwan & Norrel (1975).

Diferentemente do que foi registrado nas cultivares IAS-5 and MG/BR 46 Conquista (Rodrigues *et al.*, 2005b), não foram observados grãos de pólen multinucleados em botões pré-tratados antes do cultivo. Essa categoria correspondeu a 0,5% das observações *in vitro* apresentando características similares as registradas anteriormente.

Uma pequena proporção das células dividiu-se em resposta ao cultivo, correspondendo a 0,1% do total de observações. Em ambas as cultivares, foram registrados grãos de pólen com até quatro células envolvidas pela parede de exina, ainda que bastante distendida. Na cultivar Liderança, também foram registradas estruturas multicelulares com até cinco células, assim denominadas pela ausência da parede.

Tais grãos de pólen e estruturas multicelulares apresentaram núcleos diferentes dos núcleos das células generativa e vegetativa. As estruturas multicelulares podem ter derivado tanto de divisões celulares de protoplastos de micrósporos quanto da ruptura da parede de exina mediante o aumento do número de células, do mesmo modo como foi registrado em canola por Ilic-Grubor *et al.* (1998).

As cultivares apresentaram respostas contrastantes em relação à formação de estruturas multicelulares. Em Uirapuru, somente micrósporos sem pré-tratamento originaram pólen multicelular somando 0,3% do total de observações dessa cultivar. Em Liderança, micrósporos de ambos os tratamentos formaram 0,1% e 0,3% do total de observações na cultivar.

A ocorrência de pólen e estruturas multicelulares não foi associada ao pré-tratamento. A proporção com que eles ocorreram também não pode ser associada à de pólen multinucleado. Assim, não é possível afirmar que a condição de pólen multinucleado precede a de multicelular.

A ocorrência de divisões celulares *in vitro* abre perspectivas para potencialização desse sistema, que requererá a continuidade dos trabalhos para otimização das condições de cultivo, até que seja possível maior proporção de células responsivas e a obtenção inédita de estádios mais avançados do desenvolvimento embriogênico *in vitro*.

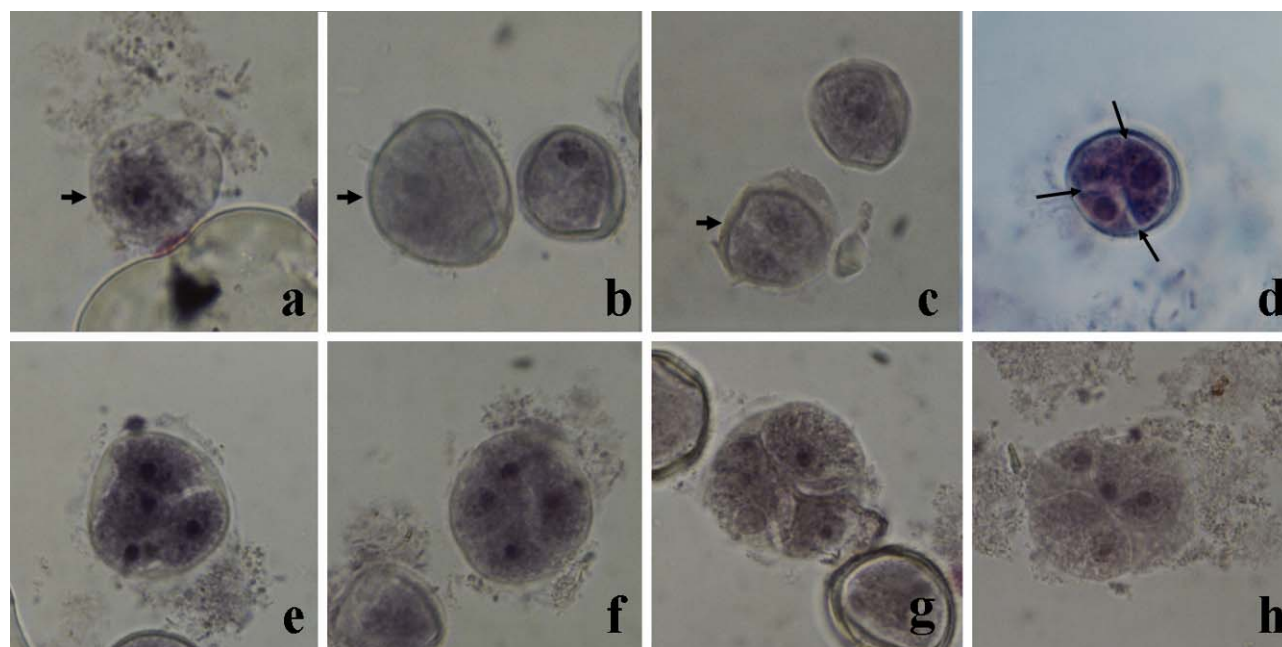


Figura 1. Observações de micrósporos e pólen isolados das cultivares de soja BRSMG-Liderança (a, b, d, f, g, h) e BRSMT Uirapuru (c, e) aos sete dias de cultivo. a) Protoplasto de pólen imaturo oriundo de botão sem pré-tratamento. b) Aumento do volume celular em micrósporo (seta) de material sem pré-tratamento. c) Núcleos simétricos em pólen sem pré-tratamento. d) Pólen com três células a partir de material não pré-tratado. As setas destacam a separação entre citoplasmas. e) Pólen com quatro células a partir de material não pré-tratado. Destaca-se a distensão da parede devido ao aumento do volume e número de células. f) Estrutura de quatro células a partir de material sem pré-tratamento. g) Estrutura de quatro células a partir de material pré-tratado. h) Estrutura de cinco células a partir de material pré-tratado. Em a, e, f e h observam-se conteúdos citoplasmáticos extravasados oriundos do processo de isolamento e de ruptura durante o cultivo.

CONCLUSÃO

A maioria dos micrósporos e do pólen imaturo tomou uma rota degradativa por plasmólise. Pequena proporção apresentou aumento de tamanho e divisões celulares *in vitro*, formando pólen multicelular (até 4 células dentro da parede) e estruturas multicelulares

(até 5 células sem parede). Não houve indícios de que o pólen multinucleado originou pólen e estruturas multicelulares por meio de celularização após pré-tratamento.

REFERÊNCIAS

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.

GU, H.H.; HAGBERG, P.; ZHOU, W.J. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 137-143, 2004.

ILIC-GRUBOR, K.; ATTREE, S.W.; FOWKE, L.C. Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 329-333, 1998.

JÄHNE, A.; LÖRZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, v.109, p. 1-12, 1995.

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

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.; 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, 2005a.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A.; IRANÇO, L.B.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Anther culture and cold treatment of floral buds increased symmetrical and extra nuclei frequencies in soybean pollen grains. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 101-104, 2005b.

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, p. 287-289, 2004.

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

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.

SUN, M.; KIEFT, H.; ZHOU, C.; VAN LAMMEREN, A. A co-culture system leads to the formation of microcalli derived from microspore protoplasts of *Brassica napus* L. cv. Topas. **Protoplasma**, v. 208, p. 265-274, 1999.

WILSON, Z.A.; YANG, C.Y. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. **Reproduction**, v. 128, p. 483-492, 2004.

PALAVRAS-CHAVES:

Glycine max, androgênese, embriogênese, pré-tratamento, haplodiploidização