

# CULTIVO DE ANTERAS X CULTIVO DE MICRÓSPOROS ISOLADOS

Dez razões para uma nova abordagem da embriogênese do micrósporo

## Lia Rosane Rodrigues

PhD, Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências (IB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
liarr@ufrgs.br

## Jorge E.A. Mariath

PhD, Professor Titular do Departamento de Botânica, IB, UFRGS  
jorge.mariath@ufrgs.br

## Maria Helena Bodanese-Zanettini

PhD Professora Titular do Departamento de Genética, IB, UFRGS  
maria.zanettini@ufrgs.br

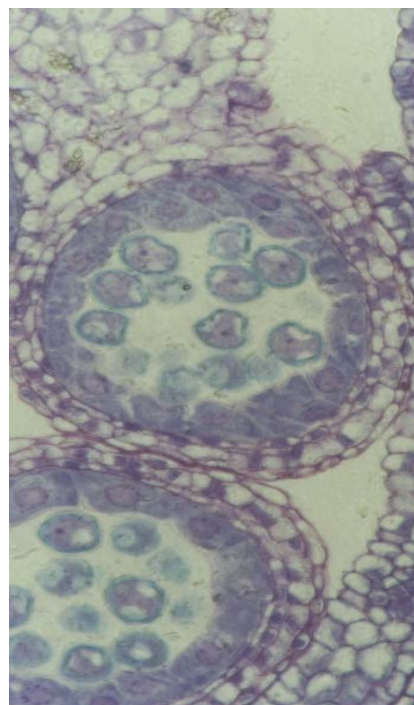
Ilustrações cedidas pelos autores

A regeneração direta de esporófitos a partir de micrósporos ou de pólen foi inicialmente registrada no cultivo de anteras de *Datura innoxia* por Guha e Maheshwari (1964, 1966), quando alguns grãos de pólen apresentaram um desvio de sua rota de desenvolvimento e originaram plantas haplóides.

A partir daquele primeiro registro, cultivos experimentais foram conduzidos para obtenção de indivíduos haplóides de inúmeras espécies vegetais por esta via morfogênica. Nas condições de cultivo propostas, algumas espécies responsivas tornaram-se modelo para o estudo dos fatores que alteram e redirecionam o desenvolvimento gametofítico, dos padrões iniciais das divisões celulares que envolvem a transição direta gametofito-esporófito e das condições de cultivo que aceleram a regeneração de plantas.

A formação direta de plantas a partir do micrósporo ou do pólen requer a ocorrência de divisões celulares atípicas e a síntese das paredes das novas células. À medida que o número destas células aumenta, ocorre a ruptura da parede de exina e a liberação de uma estrutura multicelular com variados graus de organização entre o padrão de desenvolvimento zigótico e calogênico (Maheshwari *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2000). Em condições de cultivo favoráveis, estes conjuntos celulares originam estruturas embriogênicas, que se desenvolvem até regenerar plantas.

O cultivo de anteras *in vitro* con-



**Figura 1:** Seção transversal de parte de uma antera imatura de soja, dentro de um botão floral de comprimento 3,5 mm. Os gametófitos estão cercados pelos estratos parietais, constituídos pelo tapete, pelo endotécio, pela(s) camada(s) média(s) e pela epiderme

solidou-se como sistema morfogênico a tal ponto que, em inúmeros trabalhos, foi apresentado como sinônimo de embriogênese do micrósporo e do pólen. Mais recentemente, o cultivo de micrósporos isolados tem substituído o cultivo de anteras em inúmeros laboratórios e a proporção de trabalhos publicados a respeito deste sistema tem aumentado. Ambos os sistemas servem à pesquisa básica, como modelo para estudo dos diferentes aspectos (molecular, fisiológico,

histológico etc.) da embriogênese e da embriologia *lato sensu*. Além disso, plantas haplóides e duplo-haplóides têm amplo emprego como ferramenta biotecnológica em trabalhos que visam à manipulação de variabilidade genética para o melhoramento das plantas cultivadas, permitindo o mapeamento de genes de interesse agrônomico e a descoberta de mutações. Entretanto, com base em nossa experiência na transição do cultivo de anteras para o cultivo de micrósporos isolados de soja (*Glycine max* L. Merrill), podemos propor, no mínimo, dez razões para a adoção do cultivo de micrósporos isolados:

### **1ª. No cultivo de micrósporos isolados, não há interferência dos tecidos esporofíticos.**

No cultivo de anteras, os micrósporos são estabelecidos *in vitro* envolvidos pelos estratos parietais, constituídos pelo tapete, pelo endotécio, pela(s) camada(s) média(s) e pela epiderme (Figura 1). Também está presente o tecido conectivo que, no botão floral, une a antera ao filete e, conseqüentemente, ao receptáculo floral (Mariath *et al.*, 2003). Em geral, as condições de cultivo não favorecem a proliferação destes tecidos. Também tem se assumido que os tecidos da planta que já ingressou em fase reprodutiva, como são os estratos parietais e o conectivo, apresentam pouco ou nenhum potencial morfogênico. Porém, no cultivo de anteras de algumas espécies vegetais, estes tecidos apresentaram capacidade de proliferação. Uma destas espécies é a soja (Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, *in press*).

A presença de células haplóides nos calos embriogênicos derivados do conectivo pode aumentar a confusão entre eventos morfogênicos no cultivo de anteras (Altamura *et al.*, 1992; Woodward e Puonti-Kaerlas, 2001; Rodrigues, 2004). Pouco se sabe a respeito da origem destas células haplóides, mas, em calos embriogênicos de raízes de *Arabidopsis thaliana*, foram atribuídas à redução do tipo meiótica e associadas a desdiferenciação celular (Yihua *et al.*, 2001).

Mesmo não se proliferando *in vitro*, os tecidos esporofíticos também podem ter um efeito inibitório ou seletivo sobre a embriogênese dos micrósporos (Hoffmann *et al.*, 1982; Van Geyt *et al.*, 1985).

### **2ª. Em micrósporos isolados, os tratamentos são aplicados diretamente sobre as células-alvo do cultivo.**

No cultivo de anteras, a presença dos tecidos esporofíticos pode retardar ou neutralizar o efeito das condições de cultivo indutoras da embriogênese do micrósporo ou mascarar a resposta morfogênica, impedindo conclusões efetivas a respeito dos tratamentos.

### **3ª. O cultivo de micrósporos isolados permite a separação dos constituintes da suspensão**

Em geral, diferentes estádios da microsporogênese e da microgametogênese estão transcorrendo dentro de uma mesma antera, o que impede que células em estádios específicos do desenvolvimento sejam estabelecidas *in vitro*.

No cultivo de micrósporos isolados, por meio de centrifugação com gradientes (de sacarose, percoll e manitol) e de filtração através de malhas de náilon de 15 a 500 µm, os constituintes de um mesmo cultivo podem ser separados em populações homogêneas. Estes recursos permitem separar populações de micrósporos e gametófitos para comparação entre os estádios (Kyo e Harada, 1986); separar os micrósporos responsivos, de maior tamanho, da maioria não-responsiva; e reunir volume suficiente de material em cada estágio de desenvolvimento para a execução de estudos citológicos e moleculares (Maraschin *et al.*, 2003).

### **4ª. A competição entre estruturas embriogênicas por espaço e nutrientes é evitada no cultivo de micrósporos isolados**

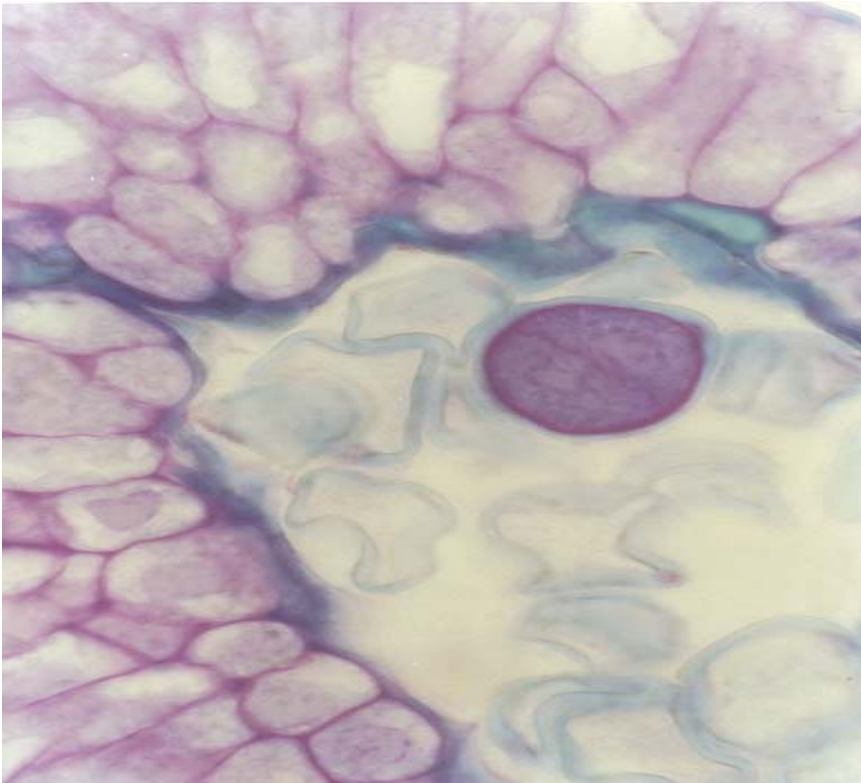
Quando a proporção de



**Figura 2:** Gametófitos de soja isolados em meio de cultivo líquido. Os núcleos generativo e vegetativo apresentam reação fluorocromática ao 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

micrósporos responsivos no cultivo de anteras é grande, o desenvolvimento dos grãos de pólen multicelulares e das estruturas embriogênicas a partir de um mesmo sítio, o lóculo da antera, pode gerar competição por espaço e nutrientes, causar alterações morfoanatômicas ou impedir a continuidade do desenvolvimento de algumas estruturas, o que caracterizaria um tipo de seleção *in vitro*. No cultivo de micrósporos, é possível transferir seletivamente as estruturas embriogênicas para uma condição em que possam completar a histodiferenciação, principalmente quando o desenvolvimento não é sincronizado entre elas. A competição pelo efeito posicional não apenas é evitada, como o acréscimo de meio líquido pode compensar uma superprodução de estruturas embriogênicas.

### **5ª. A proporção de micrósporos responsivos é sempre superior no cultivo de micrósporos isolados**



**Figura 3:** Lóculo de uma antera de soja após 18 dias de cultivo. As condições *in vitro*, principalmente a indução sob a luz e a presença de 2,4-D no meio, desencadearam aumento de volume, desdiferenciação e proliferação de células dos estratos parietais, simultaneamente à degradação da maioria dos micrósporos e gametófitos (compare com a Figura 1). Apenas um grão de pólen permanece vivo, apresentando divisão celular simétrica característica do desvio da rota gametofítica. Porém, a resposta vigorosa dos tecidos esporofíticos dificulta ou impede a embriogênese a partir deste gametófito

Nos trabalhos em que os dois sistemas foram comparados, o cultivo de micrósporos isolados foi sempre mais eficiente, mesmo em diferentes meios nutritivos (Ma *et al.*, 2004) e a produção de esporófitos androgênicos foi cinco a dez vezes superior (Siebel e Pauls, 1989; Hoekstra *et al.*, 1992).

### **6ª. O cultivo de micrósporos isolados permite recursos adicionais de manipulação genética**

Protoplastos de micrósporos podem ser obtidos pelo emprego de combinações de enzimas (Sun *et al.*, 1999). Sendo similar a outros cultivos de células em meio líquido, o cultivo de protoplastos de micrósporos pode permitir o desenvolvimento de técnicas para manipulação e geração de variabilidade genética, como a indução de mutações (Barro *et al.*, 2001), a fusão de protoplastos e a transformação genética (Stöger *et al.*, 1995).

### **7ª. O estabelecimento de micrósporos isolados *in vitro* é um sistema mais rápido e prático para algumas espécies vegetais.**

Para o cultivo de anteras *in vitro*, é necessária a remoção individual das anteras do interior de botões florais imaturos. Para o estabelecimento de micrósporos isolados, é possível executar um procedimento massal, que inicia com a maceração dos botões florais desinfestados. Conforme as características morfológicas dos botões florais imaturos e as condições ambientais em que estes botões são obtidos, o estabelecimento de micrósporos isolados é mais simples (Duijs *et al.*, 1992). Entretanto, isso não é regra. O estabelecimento de micrósporos isolados de soja, cujos pequenos botões florais apresentam muitos tricomas, é bem mais trabalhoso do que o estabelecimento de anteras (Rodrigues, 2004).

### **8ª. O acompanhamento dos cultivos de micrósporos isolados pode ser feito com todas as técnicas já empregadas para o cultivo de anteras e ainda dispensa esmagamentos**

O acompanhamento dos cultivos que visam à embriogênese do micrósporo, tanto no cultivo de anteras quanto no cultivo de micrósporos isolados, pode empregar microscopia em campo claro, fluorescência (Figura 2), seções histológicas e uma série de estudos moleculares.

No cultivo de anteras, os estratos parietais e o conectivo permanecem nos esmagamentos e interferem na microscopia. Quando estes tecidos apresentam potencial morfogênico, podem originar estruturas embriogênicas similares às derivadas dos micrósporos, tanto na observação do explante ao estereomicroscópio quanto em esmagamentos para análise ao microscópio. Isso ocorre porque, em geral, não há diferença nos padrões iniciais de desenvolvimento entre os dois tipos de embrião. Além disso, o embrião somático inicial apresenta depósitos parietais de calose e de pectinas que podem ser confundidos com a parede do pólen na observação em microscopia de campo claro.

### **9ª. O cultivo de micrósporos isolados permite o acompanhamento ao microscópio da resposta individualizada de cada célula**

No cultivo de anteras, a resposta dos micrósporos envolvidos por tecidos esporofíticos, não pode ser acompanhada sem a destruição dos estratos parietais (Figura 3). O cultivo de micrósporos isolados, entretanto, quando conduzido em meio gelificado ou em meio de dupla fase (uma fase líquida sobre outra gelificada), viabiliza o acompanhamento das divisões de cada célula ao microscópio invertido. Este tipo de acompanhamento não-destrutivo poderá oferecer informações irrefutáveis acerca do suposto potencial embriogênico do pólen atípico do tipo P ou S.

Nas décadas de 1970 e 1980, a

pesquisa em dimorfismo do pólen foi associada ao estudo da androgênese e alguns autores propuseram que micrósporos do tipo P ou S, possivelmente resultantes de alterações meióticas, teriam maior predisposição para tomar a rota de desenvolvimento esporofítico quando estabelecidos *in vitro* (Horner e Street, 1978; Heberle-Bors, 1985). Porém, inúmeros trabalhos demonstraram embriogênese a partir de micrósporos e de grãos de pólen típicos. Uma maneira de esclarecer o papel destes micrósporos atípicos pode ser o acompanhamento individual ao microscópio invertido.

### 10ª. Estudos básicos também requerem a efetiva separação das gerações gametofítica e esporofítica

As mesmas suspensões de micrósporos e grãos de pólen que podem ser submetidas ao cultivo visando à embriogênese também podem servir para estudos básicos da fisiologia da microsporogênese e da microgametogênese e da expressão gênica na geração gametofítica.

Apesar de o cultivo de micrósporos isolados ser pouco difundido no Brasil, é um sistema promissor para abordagem da androgênese nas numerosas espécies vegetais para as quais ainda não foram desenvolvidos protocolos. Nossa experiência comprova que ajustes simples permitem implantar este sistema em um laboratório equipado para outros tipos de cultivo, por isso, esperamos que esse trabalho motive os pesquisadores brasileiros a adotá-lo.

### Bibliografia Citada

- Altamura MM, Cersosimo A, Majoli C e Crespan M (1992) Histological study of embryogenesis and organogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. *Protoplasma* 171:134-141
- Barro F, Fernández-Escobar J, de la Vega M e Martín A (2001) Double haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plat Breed.* 120:262-264
- Duijs JG, Voorrips RE, Visser DL e Custers JBM (1992) Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 60:45-55
- Guha S e Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 4957:497
- Guha S e Maheshwari SC (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 5057:97-98
- Heberle-Bors E (1985) *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theor. Appl. Genet.* 71:361-374
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwse JD, Heidekamp F e van der Mark F (1992) Anther culture and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv 'Igri'. *Plant Sci.* 86:89-96
- Hoffmann F, Thomas E e Wenzel G (1982) Anther culture as a breeding tool in rape. II. Progeny analysis of androgenetic lines and induced mutants from haploid cultures. *Theor. Appl. Genet.* 61:225-232
- Horner M e Street HE (1978) Pollen dimorphism – Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann. Bot.* 42:763-771
- Kyo M e Harada H (1986) Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol.* 79:90-94
- Ma R, Guo Y e Pulli S (2004) Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76:147-157
- Maheshwari SC, Rashid A e Tyagi AK (1982) Haploids from pollen grain - Retrospect and Prospect. *Am. J. Bot.* 69:865-879
- Maraschin S de F, Lamers GEM, Pater BS, Spaink HP e Wang M (2003) 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 54:1033-1043
- Mariath JEA, Santos RP e Bittencourt NS (2003) Flor. In: *Appezzato-da-Glória B e Carmelo-Guerreiro SM (eds) Anatomia Vegetal* (pp.329-373). Editora UFV, Viçosa
- Rodrigues LR (2004) Eventos Embriogênicos em Tecidos Estaminais de *Glycine max* (L.) Merrill (Tese de Doutorado) PPGGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- Rodrigues LR, Oliveira JMS, Mariath JEA & Bodanese-Zanettini MH (*in press*) Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*
- Rodrigues LR, Terra TF, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2004) Origin of embryo-like structures in soybean anther culture investigated using SSR marker. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77:287-289
- Siebel J e Pauls KP (1989) A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 78:473-479
- Stöger E, Fink C, Pfosser M e Heberle-Bors E (1995) Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Rep.* 14:273-278
- Sun M, Kieft H, Zhou C e van Lammeren A (1999) A co-culture system leads to the formation of microcalli derived from microspore protoplasts of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma* 208:265-274
- Van Geyt J, D'Halluin K e Jacobs M (1985) Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzücht.* 95:325-335
- Wang M, Van Bergen S e Van Duijn B (2000) Insights into a key development switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol.* 124:523-530
- Woodward B e Puonti-Kaerlas J (2001) Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120:1-6
- Yihua C, Lihua Z, Yuxuan G e Zhenghua C (2001) Meiosis-like reduction during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37:654-657