Etapas da Androsporogênese e da Androgametogênese de *Phaseolus vulgaris* L. de Acordo com o Tamanho do Botão Floral

Lia Rosane Rodrigues[1], Cíntia Silva Beauvalet[2],
João Marcelo Santos de Oliveira[3] e Jorge Ernesto de Araujo Mariath[4]

Introdução

Phaseolus vulgaris L. (2n=2x=22) [1] é uma espécie de destacada importância econômica e alvo de inúmeros estudos genéticos. O detalhamento da esporogênese e da gametogênese é essencial para a seleção genética do feijoeiro, pois são eventos essenciais à fecundação, à embriogênese zigótica e, em conseqüência, à produção de sementes - produtos de importância econômica dessa espécie. Além disso, os sistemas de cultivo *in vitro* que aceleram etapas da seleção genética do feijoeiro ainda requerem otimização. Uma vez que alguns desses sistemas empregam os tecidos estaminais como material inicial, torna-se necessária a descrição precisa das etapas do desenvolvimento e da condição fisiológica inicial das células a serem induzidas à morfogênese *in vitro*. Para atender a essas demandas, foram estudadas as etapas da androsporogênese e da androgametogênese da cultivar Guapo Brilhante de *P. vulgaris*, relacionando ao tamanho do botão floral.

Material e métodos

A. Material Vegetal

Sementes da cv. Guapo Brilhante de *P. vulgaris* foram postas a germinar em vasos dentro de uma casa de vegetação no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Durante o cultivo, as temperaturas do ar variaram de 14 a 30 ^{o}C. Iniciado o florescimento, botões florais imaturos foram coletados. No Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRGS, as brácteas dos botões foram removidas e eles foram separados ao estereomicroscópio em sete grupos, conforme a medida longitudinal.

B. Preparação Histológica

Cinqüenta botões de 1,0 a 4,0 mm foram fixados em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% [2] em tampão fosfato de sódio pH 7,2; desidratados em série alcoólica [3] e infiltrados em hidroxietilmetacrilato. Ao micrótomo de guias, foram obtidas seções de 3 a 6 μm, que foram coradas em azul de toluidina O 0,05%[4].

C. Preparação Citológica

Cem botões de 1,0 a 4,5 mm foram fixados por 12 a 24 h a temperatura ambiente em solução de Farmer (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1) e armazenados em congelador. As anteras desses botões foram excisadas ao estereomicroscópio, esmagadas com carmim acético 0,5% sobre lâmina histológica, cobertas com lamínula, seladas com esmalte e estocadas em refrigerador por 24 h para análise ao microscópio em campo claro. Todas as categorias integrantes da androsporogênese e da androgametogênese foram contadas e registradas em uma planilha. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e de igualdade das variâncias e à análise da variância (ANOVA). Adicionalmente, anteras de cinco botões florais frescos foram esmagadas com reagente de Lugol sobre lâmina, cobertas com lamínula e observadas ao microscópio em campo claro.

Resultados e discussão

A. Observações Histológicas

A ontogenia da antera, a formação das células arquesporiais, a androsporogênese e a androgametogênese apresentaram similaridades com os poucos registros disponíveis para *P. vulgaris* [5] (Fig. 2A, D e E). Porém, foram observadas alterações, como núcleos simétricos pareados antes da citocinese, ao final da meiose II (Fig. 2B) e também andrósporos e andrófitos com morfologia atípica, com citoplasma pouco denso, sem depósito de amido e sem o completo desenvolvimento da intina (Fig. 2F), apesar de a exina ser similar a dos andrósporos e andrófitos típicos. Esse padrão de desenvolvimento atípico tem sido registrado em várias espécies vegetais [6].

B. Observações Citológicas

Todas as etapas da androsporogênese e da androgametogênese foram observadas dentro da amplitude de tamanhos incluída no estudo (Fig. 1). As categorias contabilizadas foram: 1. CMM (células-mãe do andrósporo ou células arquesporiais) ocorrendo apenas em botões ≤ 1,5 mm (Fig. 2A). 2. Meiócitos (células em qualquer fase da meiose) em botões de 1,5 mm até, excepcionalmente, 3,0 mm. 3. Tétrades (quatro esporos revestidos por calose) em botões de 1,5 mm até, excepcionalmente, 3,0 mm. A grande maioria das tétrades (97,87%) apresentou morfologia típica, sendo que 1,97% apresentaram pelo menos um dos esporos com nucléolo extra e 0,16% apresentaram um esporo

1. Pesquisadora da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 44, Veranópolis, RS, CEP 95330-000.
E-mail: liarr @ufrgs.br
2. Estudante do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
3. Professor do Instituto Metodista Porto-Alegrense.
4. Pesquisador do CNPq e Professor Titular do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43423, sala 206, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970.
Apoio Financeiro: CNPQ

adicional muito pequeno, sem núcleo aparente (Fig. 2C). 4. Andrósporos (esporos livres com um núcleo não-polarizado) em botões de todos os tamanhos analisados. 5. Andrófitos I (gametófitos com um núcleo polarizado, antes da primeira mitose) em botões ≥ 2,0 mm. 6. Andrófitos II (gametófitos com duas células, generativa e vegetativa, após a primeira mitose, incluindo os diversos estádios de desenvolvimento dos núcleos) em botões ≥ 2,5 mm.

Foram observadas categorias com aspecto degradado, tal como: 1. Andrósporos e andrófitos plasmolizados, em botões ≥ 2,0 mm, totalizando 5,58%. 2. Andrósporos e andrófitos sem núcleo aparente, em botões ≥ 2,0 mm, totalizando 0,61%. 3. Esporodermes vazias (núcleo e citoplasma ausentes) em botões ≥ 2,0 mm, totalizando 0,80%. 4. Andrósporos e andrófitos de diâmetro muito inferior ao dos típicos, sem núcleo aparente.

Outras categorias com morfologia atípica também foram registradas: 1. Andrósporos atípicos [6] em botões ≥ 2,0 mm, totalizando 0,06% (Fig. 2F). 2. Andrófitos com dois núcleos simétricos, em botões de 2,0 a 3,0 mm, totalizando 0,35% (Fig. 2G). 3. Andrófitos com núcleo vegetativo contendo dois a três nucléolos de diâmetros iguais ou diferentes, em botões de 2,0 e 2,5 mm, totalizando 0,08% (Fig. 2H). 4. Andrófitos tetraporados, em botões ≥ 2,5 mm, totalizando 0,04% (Fig. 2I). 5. Andrófitos com três e quatro nucléolos compactos distribuídos irregularmente no citoplasma, indicativos da presença de núcleos extranumerários ou desorganizados, similares aos registrados em *Glycine max* [7], totalizando 0,04% (Fig. 2J-L).

C. Considerações Finais

A regularidade da meiose é um fator essencial para a viabilidade dos gametófitos. Apesar de o feijoeiro ser diplóide, foram encontradas alterações, possivelmente resultantes de falhas da meiose e até mesmo de ocasionais duplicações cromossômicas, indicando certo grau de instabilidade na meiose da cultivar analisada.

Os estádios transicionais entre a androsporogênese e a androgametogênese (andrósporo e andrófito I) constituem o momento adequado à indução à embriogênese *in vitro*. Houve efeito altamente significativo do tamanho do botão floral sobre o número de observações dessas duas categorias (Pr>F<0,001), as quais corresponderam a aproximadamente 75% das observações nos botões de 2,0 e 2,5 mm. Portanto, botões de comprimento entre 2,0 e 2,5 mm, sem as brácteas, devem ser usados em sistemas que visam à regeneração de plantas haplóides e duplo-haplóides [8].

Além disso, os tecidos estaminais esporofíticos de *P. vulgaris* apresentam características estruturais e desenvolvimentais similares às registradas para *G. max* [9], o que indica o potencial para indução à embriogênese clonal *in vitro*, a partir das células estaminais esporofíticas [10].

Os resultados desse estudo estão subsidiando o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que visam acelerar as etapas da seleção genética do feijoeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos agrônomos Rodrigo Favretto (FEPAGRO-RS), pelo fornecimento de sementes, e Claudimar Fior (Jardim Botânico-FZB-RS), pelo cultivo das plantas.

Referências

[1] KARPECHENKO, G. D. 1925. On the chromosomes of Phaseolinae. *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding 14*: 143-148.

[2] MCDOWELL, E.M. & TRUMP, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 100*: 405-414.

[3] JOHANSEN, D.A. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co., 1940. 523p.

[4] FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany, 55*: 123-142.

[5] SUZUKI, K.; TAKEDA, H.; TSUKAGUSHI, T. & EGAWA, Y. 2001. Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. *Sexual Plant Reproduction, 13*: 293-299.

[6] HORNER, M. & STREET, H.E. 1978. Pollen dimorphism – Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Annals of Botany, 42*: 763–771.

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

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

[9] ALBERTSEN, M.C. & PALMER, R.G. 1979. A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male sterile (ms1) and male fertile soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *American Journal of Botany, 66*: 251–265.

[10] RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S de; MARIATH, J.E de A. & BODANESE-ZANETTINI, M.H. 2005. Embryogenic potential of soybean staminal tissues. *Plant Cell Culture & Micropropagation, 1* (2): 95-101.

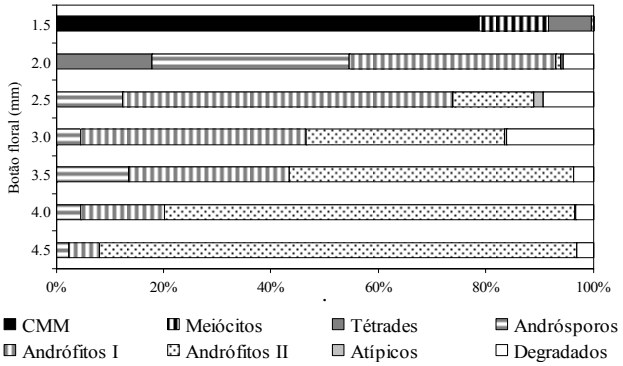


Figura 1 (página anterior). Percentagem das categorias contabilizadas na avaliação citológica da androsporogênese e da androgametogênese, em um total de 11.148 observações, em botões florais imaturos da cv. Guapo Brilhante de *P. vulgaris*.

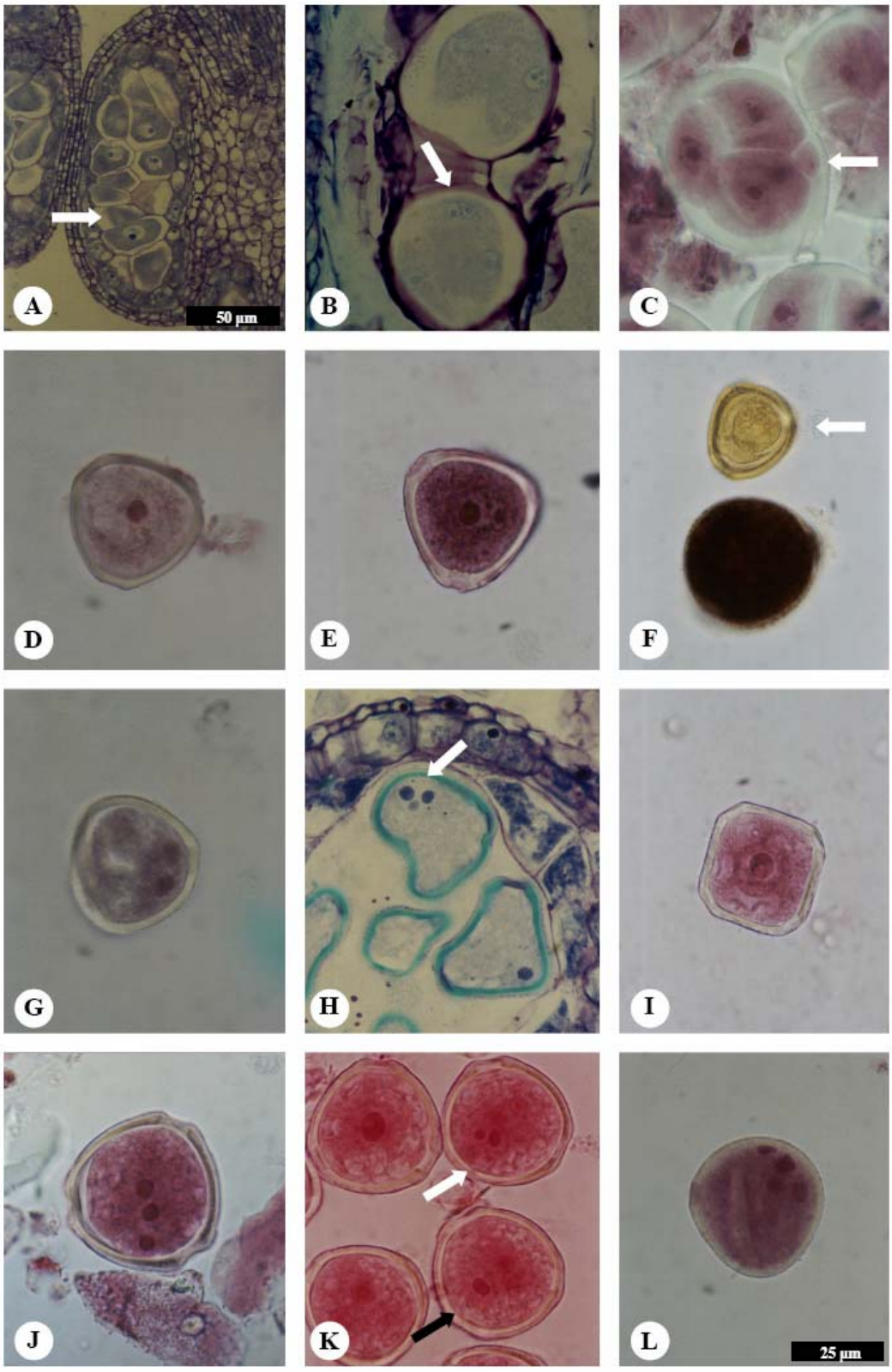


Figura 2. Detalhes da androsporogênese e da androgametogênese da cv. Guapo Brilhante de *P. vulgaris* registrados em seções histológicas coradas com azul de toluidina (A, B e H) e em esmagamentos corados com carmim acético (C-E, G, e I-L) e reagente de Lugol (F). A. Depósito de calose (seta) pelas células arquesporiais. B. Alteração no arranjo nuclear ao final da meiose II: pareamento de núcleos (seta). C. Tétrade com um esporo adicional muito pequeno e sem núcleo aparente (seta). D. Andrósporo típico. E. Andrófito típico. F. Andrósporo com morfologia atípica (seta) ao lado de andrófito típico cuja coloração marrom indica o acúmulo de amido. G. Andrófito com núcleos simétricos polarizados. H. Andrófito cujo núcleo contém três nucléolos. I. Andrófito tetraporado. J-L. Andrófitos com três (seta preta) e quatro (seta branca) nucléolos com distribuição irregular. A barra de 25 µm aplica-se às figuras B-L.