

OBTENÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES A PARTIR DA CULTURA *IN VITRO* DE ANTERAS DE *NICOTIANA TABACUM*, CV. "GOIANO" IAC-70⁽¹⁾

IN VITRO PRODUCTION OF HAPLOID PLANTS FROM ANTERS OF *NICOTIANA TABACUM*, CV. "GOIANO" IAC-70

Walter Handro ⁽²⁾

RESUMO

Anteras de *N. tabacum* cv. "goiano" IAC-70 foram cultivadas asépticamente em meio de cultura sintético. Em 5-10% das culturas parte dos grãos de pólen diferenciam-se produzindo embriões e plântulas, que emergem das anteras após 20 dias em cultura. Essas plantinhas crescem, atingem a floração, não produzindo nem frutos nem sementes. No trabalho são descritos os pormenores das técnicas utilizadas para obtenção desses haplóides androgênicos.

SUMMARY

Anthers from *N. tabacum* cv. "goiano" IAC-70 were cultured aseptically on a synthetic medium. After 20 days, numerous plantlets projected out of the anthers (5-10% of the cultures). These haploid plants raised from pollen grains, grow and reach to flower, but they are sterile.

INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de anteras para obtenção de haplóides a partir de grãos de pólen tem sido utilizada com sucesso para inúmeras espécies (cf. Sunderland, 1973; Handro, 1974). Nitsch (1969) descreve a obtenção de haplóides a partir de grãos de pólen para diversas espécies e variedades de *Nicotiana*. Neste trabalho apresenta-

(1) Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Dept.º de Botânica, com auxílio da FAPESP (projeto Biológicas 73/1207).

(2) Dept.º de Botânica, Inst. de Biociências.

mos resultados e pormenores das condições de cultura de anteras de *N. tabacum* cv. "goiano" IAC-70.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *N. tabacum* cv. "goiano" IAC-70 foram cultivadas a partir de sementes, no Dept.º de Botânica do Inst. de Biociências da U.S.P., até atingir a floração. Nessa fase, botões de vários tamanhos foram coletados, retirando-se as anteras, e verificando-se para cada caso, o estágio dos grãos de pólen. Verificou-se que nesta variedade os botões entre 8-10 mm apresentam grãos num estágio pouco anterior a última divisão mitótica, que geralmente é a fase mais propícia para que ocorra a diferenciação desses micrósporos em embriões, quando em cultura.

Para a cultura propriamente dita, botões foram coletados, esterilizados em solução aquosa de hipoclorito de cálcio a 5% durante 5 minutos, lavando-se em seguida em água esterilizada, duas vezes, operando-se já em condições assépticas. As anteras são retiradas dos botões, eliminando-se os filetes, e colocadas sobre o meio de cultura.

O meio de cultura básico utilizado foi o seguinte:

- a) *macroelementos* (segundo Murashige e Skoog, 1962): KNO_3 , 1,9 g/l; NH_4NO_3 , 1,65 g/l; CaCl_2 , 0,44 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,37 g/l; KH_2PO_4 , 0,17 g/l.
- b) *microelementos* (segundo Nitsch, 1969): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg/l; H_3BO_3 , 10 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg/l.
- c) *vitaminas* (segundo Nitsch, 1969): glicina, 2 mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; ácido nicotínico, 5 mg/l; piridoxina-HCl, 0,5 mg/l; tiamina-HCl, 0,5 mg/l; biotina, 0,05 mg/l; ácido fólico, 0,5 mg/l.
- d) *Ferro*: 1 ml por litro de meio, de uma solução estoque contendo 5,57 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 7,45 g de Na_2EDTA por litro de água.

Ao meio acrescenta-se ainda *sacarose* (20 g/l), e *agar* "Bacto-Difco" (7 g/l). Antes da adição do agar o pH do meio é ajustado para 5,5. O meio pronto é distribuído em tubos de cultura 150 x 25 mm, ou "erlenmeyers" de 50 ml (20 ml de meio por frasco). Os frascos são fechados com algodão hidrófilo ou tampas especiais inox "Bellco" (Morton, 1957), e em seguida autoclavados (120°C, 1 atmosfera, 20 minutos).

Reguladores de crescimento como auxinas e citocininas são acrescentados ao meio de cultura antes do mesmo ser autoclavado. Em nossos experimentos usamos basicamente quatro tratamentos: meio básico sem reguladores (MB); MB + AIA (ácido indolil-acético), 500

$\mu\text{g}/\text{l}$; MB + BA (benziladenina), 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ e MB + AIA + BA. De cada tratamento são feitas 12 culturas.

Após a semeadura das anteras sobre o meio (3 por tubo), as culturas são mantidas a cerca de 26°C, na luz (4000 lux) ou no escuro.

RESULTADOS

Entre os tratamentos realizados, aquele que melhores resultados apresentou foi onde se adicionou ao meio, AIA e BA. Neste caso, pelo menos 10% das anteras em cultura produziram plantinhas. Entretanto, mesmo as culturas unicamente com o meio básico produziram resultados positivos, embora com menor porcentagem.

Nos casos positivos, após 20 dias em cultura, seja na luz ou não, das anteras emergem plantinhas, em número variado (de uma por antera, até centenas). A partir da emergência das plantinhas da antera, as culturas devem permanecer num ambiente com pelo menos 8 horas de luz, para evitar estiolamento, e temperatura entre 20 e 30°C, até que as plantas atinjam 1-2 cm de altura (figura 1). No caso de anteras que produziram grande quantidade de plantinhas, estas podem ficar concrecidas na parte basal, sem sistema radicular independente. Nesse estágio, as plantinhas foram separadas, e colocadas isoladamente em "erlenmeyers" de 50-100 ml, em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Após 2-3 semanas, as plantas formaram seu sistema radicular, e puderam ser transferidas para pequenos vasos, mantidos nos primeiros dias em câmara úmida. Ao cabo de uma semana as plantas puderam ser transferidas para estufas, ou mesmo para canteiros ao ar livre.

Em canteiros ou vasos, as plantas oriundas da cultura de anteras floresceram normalmente, no mesmo intervalo de tempo necessário para a floração de plantas originadas de sementes. As plantas originadas da cultura de anteras são normais no seu aspecto geral, embora seu porte seja bem menor do que o das plantas oriundas de sementes (figura 2). Após a floração, as plantas oriundas de sementes frutificam normalmente, o que não ocorre com as plantas obtidas pela cultura de anteras (figura 3).

A contagem de cromossomos feita em células de ponta de raiz revelou que as células das plantas desenvolvidas a partir de micrósporos tem 24 cromossomos, ou seja, a metade do número diplóide da espécie.

DISCUSSÃO

O presente trabalho confirma a facilidade de obtenção de haplóides androgênicos em *Nicotiana tabacum*, já descrita para diversos cultivares dessa espécie (cf. Sunderland, 1973). Assim, o material pesquisado neste trabalho confirmou a excepcional capacidade de produção de haplóides nessa espécie, sem que seja necessária a incorpo-

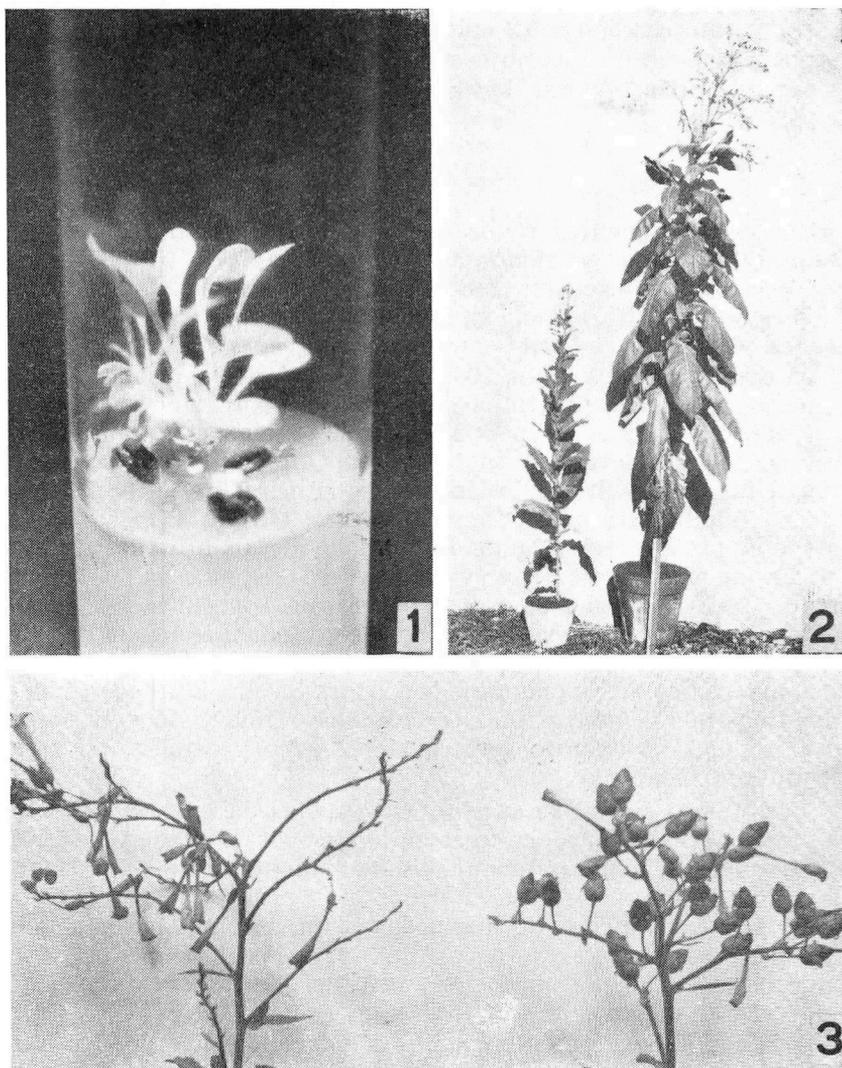


Fig. 1 — Plantinhas emergindo das anteras (30 dias após o início da cultura).
Haploid plants emerged from the anthers (one-month-old culture).

Fig. 2 — Planta haplóide em floração, ao lado de planta diplóide de mesma idade.
Flowering plants of haploid (left) and diploid (right) *N. tabacum* cv. "goiano" IAC-70.

Fig. 3 — Inflorescências de planta haplóide e diplóide: nas plantas haplóides as flores velhas caem; nas diplóides, formam-se frutos.
Sterile inflorescence of haploid plant (left), and fertile inflorescence of diploid plant, with numerous fruits.

ração de hormônios ao meio de cultura. É provável que nos tecidos da antera ocorra um balanço hormonal favorável, que permite esse tipo de embriogênese. Entretanto, a adição de auxina e citocinina aumenta a taxa de produção de haplóides, como acontece na maioria dos casos descritos na literatura.

A técnica de obtenção de haplóides utilizando a cultura de anteras *in vitro* tem apresentado resultados bastante promissores, seja pelo número de espécies onde essa técnica é aplicável, ou ainda pelas perspectivas abertas para estudos sobre diferenciação celular e genética.

A maior parte dos trabalhos que utilizam esta técnica resume-se ainda na procura das condições ideais para a obtenção de haplóides de certas espécies, ou na pesquisa de espécies onde mais facilmente ocorre o fenômeno. Entretanto, a facilidade proporcionada por esta técnica para obtenção de plantas haplóides em grande número, poderá permitir, dentro em breve, uma série de estudos especialmente sobre fenômenos de crescimento e metabolismo dessas plantas. No caso particular de plantas produtoras de certos compostos peculiares, especialmente isoprenóides ou compostos aromáticos (muitas das quais de interesse farmacológico), praticamente nada se sabe quanto a possíveis variações qualitativas ou quantitativas dessas substâncias em indivíduos haplóides.

Nesse aspecto, diferentes espécies e variedades de *Nicotiana* e de outras Solanáceas podem se constituir em excelentes materiais de pesquisa, pela ocorrência de diversos alcalóides. Dessa maneira, estudos realizados com plantas haplóides poderão trazer contribuições interessantes para a genética, fitoquímica e metabolismo.

Para que esses estudos sejam possíveis é necessário o estabelecimento das condições básicas para a obtenção de haplóides em certas espécies e suas variedades, para o que este trabalho é a primeira contribuição de nosso laboratório.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- HANDRO, W. — 1974 — Progressos recentes no controle da morfogênese vegetal. *Ciência e Cultura*, 26(4):340-346.
- MORTON, H. E. — 1957 — Stainless-Steel closures for replacement of cotton plugs in culture tubes. *Science*, 125(3285):1248.
- MURASHIGE, T. e F. SKOOG — 1962 — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- NITSCH, J. P. — 1969 — Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19(4):389-404.
- SUNDERLAND, N. — 1973 — Pollen and anther culture. p. 205-239, *in* Plant tissue and cell culture, H. E. Street (editor), Blackwell Sci. Publ., Oxford.