

# PERSPECTIVAS DA BIOTECNOLOGIA PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS<sup>1</sup>

MARIA IRENE B. DE MORAES FERNANDES<sup>2</sup>

**RESUMO** - O papel da Biotecnologia como apoio ao melhoramento é analisado. É discutida a possibilidade de atuação do melhorista de plantas na identificação e seleção de variantes genéticas úteis ao nível da planta inteira (que é insubstituível), da célula, do cromossomo ou das macromoléculas portadoras da informação genética (conhecida como tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética no sentido estrito). É abordado com mais detalhes o papel da cultura de tecidos no melhoramento vegetal enfatizando-se, principalmente, as perspectivas do uso de haplóides e da variação somaclonal.

Termos para indexação: engenharia genética, DNA recombinante, cultura de embriões, cultura de tecidos, cultura de anteras, haplóides, cruzamentos interespecíficos, variação somaclonal, engenharia cromossômica.

## PERSPECTIVES OF BIOTECHNOLOGY IN PLANT BREEDING

**ABSTRACT** - The role of biotechnology as a support to plant breeding is discussed in this paper. The plant breeder when working in the identification and selection of useful genetic variation needs to assess the whole plant. This kind of assessment cannot be replaced, so far. However, it can be supported by cellular works on tissue culture, on chromosome engineering or by manipulating macromolecules that are carriers of genetic information (DNA-recombinant technology or genetic engineering). The perspectives of tissue culture are emphasized, mainly in relation to the use of haploids and somaclonal variation.

Index terms: genetic engineering, recombinant DNA, embryo culture, tissue culture, anther culture, haploides, interspecific crosses, somaclonal variation, chromosome engineering.

## INTRODUÇÃO

A publicidade resultante da divulgação da tecnologia do DNA recombinante, que envolve a manipulação do material genético em nível molecular, despertou expectativas de mudanças para a humanidade, similares à revolução industrial, à revolução da química e à da informática. A tecnologia do DNA recombinante tem sido definida como engenharia genética no sentido estrito.

Por outro lado, a regeneração de plantas em escala ampla, através da cultura de células, tecidos ou órgãos *in vitro*, abriu um horizonte totalmente novo para a biologia vegetal. Este horizonte ampliou-se ainda mais quando se tornou possível associar o uso da cultura de tecidos com a tecnologia do DNA recombinante. O uso destas técnicas

tem sido denominado biotecnologia, engenharia genética ou engenharia biogenética (Knopf 1983). Esta área de pesquisa está sendo considerada por muitos como inteiramente nova. Entretanto, a manipulação ou reestruturação dos genomas dos seres vivos não é recente. Se observarmos as diferenças que ocorrem, atualmente, entre cultivares comerciais de espécies como o milho, o trigo ou a soja, em relação a seus ancestrais selvagens, teremos a evidência do resultado da biotecnologia que já foi praticada, inicialmente, apenas pela natureza e, mais tarde, também pelo homem, à medida que a agricultura e a genética se desenvolveram.

A evolução representa o resultado da biotecnologia praticada pela natureza. O homem, no melhoramento das plantas cultivadas, usa esquema metodológico similar: criação da variabilidade, seleção de genótipos para as características desejadas e manutenção da uniformidade destes genótipos visando ao seu uso pelo agricultor, pelo consumidor ou pela companhia industrial (Fig. 1). A tarefa do melhorista é, pois, modificar a informação genética das plantas cultivadas, adaptando a estrutura de uma população vegetal ao nível da célula, do tecido e do indivíduo ao ecossistema de cultivo em

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 14 de abril de 1986. Palestra apresentada no Curso de Atualização em Genética promovido pela Regional Sul da Sociedade Brasileira de Genética, Biênio 82/84. CNPT/EMBRAPA, Passo Fundo, RS (Outubro-1984).

<sup>2</sup> Bel. H. Nat., Dra. em Genética, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), Caixa Postal 569, CEP 99100 Passo Fundo, RS.

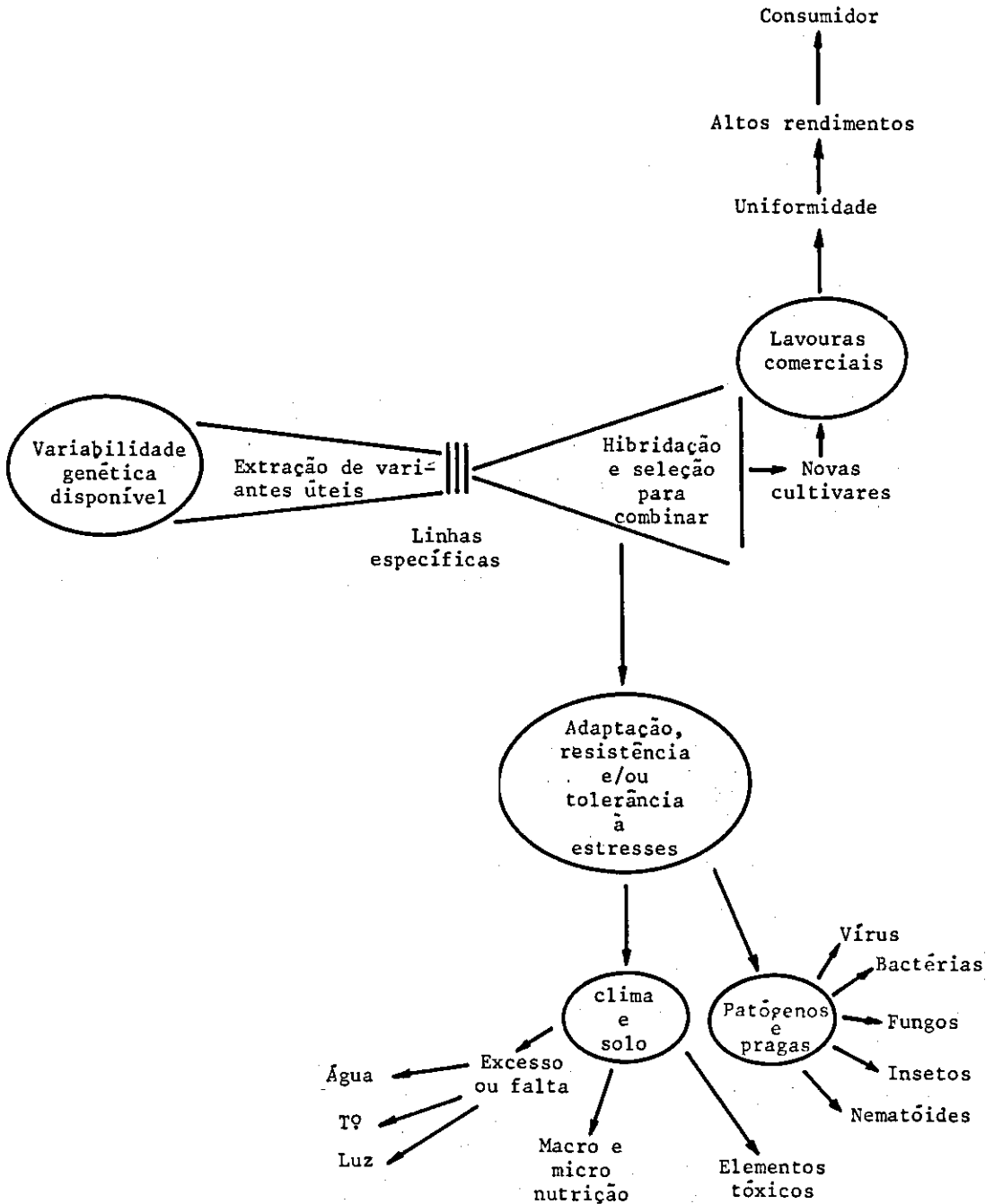


FIG. 1. Etapas principais do trabalho de melhoramento das plantas cultivadas.

uso, visando a atender as necessidades do homem.

A aplicação mais óbvia das novas técnicas da biotecnologia para as plantas está no melhoramento e no lançamento de novas cultivares. Simmonds (1983) enfatiza que "tendo em vista o papel central do melhorista na estratégia para o desenvolvimento das culturas, não há dúvida que ele deverá, no futuro, estar tão familiarizado com as novas tecnologias como com as necessidades do mercado que ele deve satisfazer".

### A BIOTECNOLOGIA E OS NÍVEIS DE ATUAÇÃO DO MELHORISTA

A grande expectativa criada, atualmente, em torno da biotecnologia se baseia no nível em que ela pode ser praticada, pelo uso da tecnologia do DNA recombinante.

Esta tecnologia pode ser usada, no melhoramento, ao "nível molecular", através da indução de mutações específicas no material genético (DNA), o qual pode ser isolado, cortado por enzimas de restrição em pontos definidos e reconstruído em combinações diversas pelas enzimas ligases. Posteriormente o DNA é incorporado aos chamados "veículos de clonagem", que podem ser plasmídeos (DNA extracromossomal), ou bacteriófagos. Pelo processo de transformação genética, o DNA estranho é incorporado à célula hospedeira, onde poderá se expressar

(Knopf 1983) (Fig. 2).

Já a manipulação para o melhoramento, em "nível celular", (Fig. 3) se baseia na totipotência da célula vegetal: células germinais, (o tecido germinal é aquele que irá dar origem às células reprodutivas) ou somáticas, cultivadas em meios artificiais (sólidos ou suspensões) adequados no que se refere às condições físicas (luz e temperatura apropriadas) e químico-nutricionais (proporções corretas de sais, açúcares e hormônios), podem regenerar plantas viáveis e férteis. Esta tecnologia abriu perspectivas para a agricultura em áreas tão diversas como hibridação somática entre espécies distintas ou incompatíveis, mutação e seleção em nível celular, utilizando a variação somaclonal, (ver item a Utilização da Variação Somaclonal . . .), clonagem de genótipos, preservação de gemoplasma e melhoramento gamético, através da cultura de anteras ou pólen, originando plantas haplóides. A cultura de tecidos, quando associada à tecnologia do DNA recombinante, permite o isolamento, a modificação e a transferência precisa e específica da expressão gênica. As aplicações práticas incluem a produção de compostos farmacêuticos, a limpeza viral, a multiplicação rápida de culturas de propagação demorada ou difícil, a seleção *in vitro* para resistência a patógenos ou suas toxinas, ou para tolerância a agroquímicos e a estresses ambientais variados, além do uso de haplóides através de cultura de anteras ou pólen, abreviando o tempo necessário para a obtenção de novas cultivares. Esta última técnica apresenta perspectivas muito promissoras para o arroz, o trigo, a cevada e o fumo (Riley et al. 1979, Foroughi-Wehr et al.

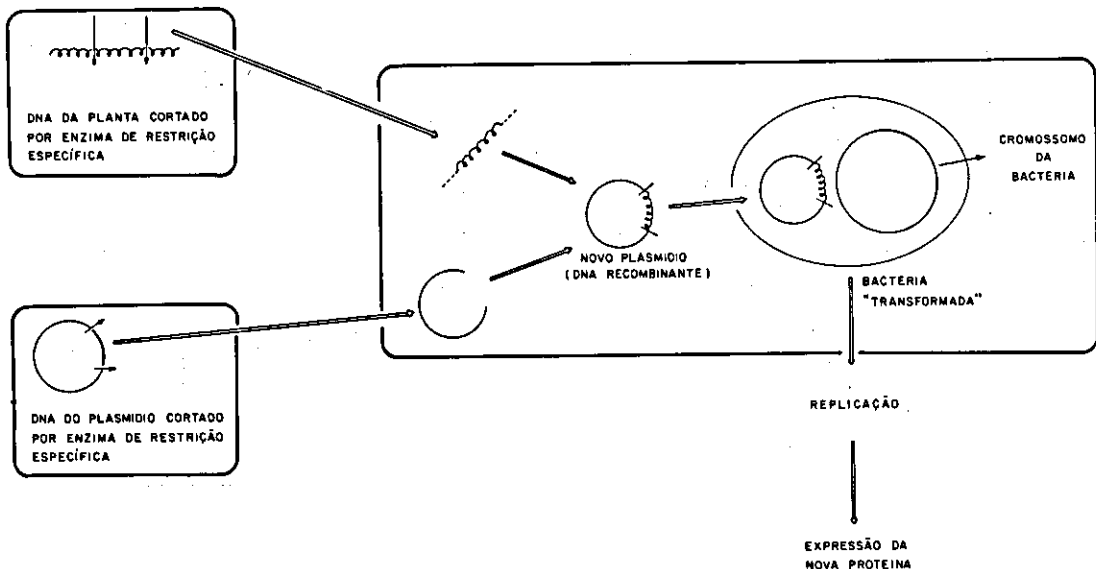


FIG. 2. Biotecnologia no nível molecular: etapas da transformação genética de bactérias utilizando a tecnologia do DNA recombinante.

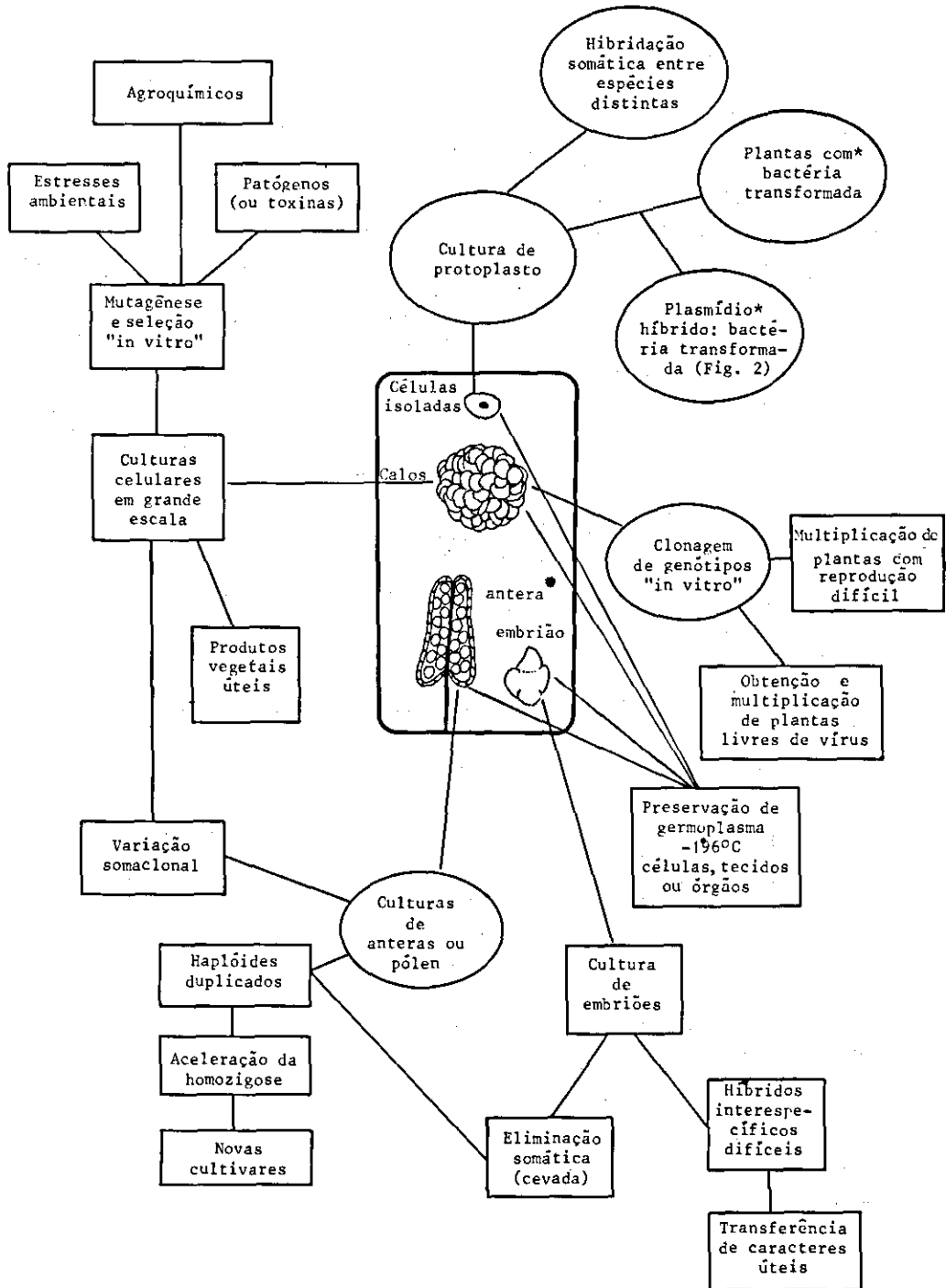


FIG. 3. Biotecnologia ao nível das células: as possibilidades de aplicação da biotecnologia em plantas através da cultura de protoplastos, células, tecidos ou órgão associada\* ou não à tecnologia do DNA recombinante.

1982, Wenzel 1980). O cultivo de embriões, obtidos de cruzamentos entre gerações segregantes de cultivares comerciais de cevada e a espécie selvagem *Hordeum bulbosum*, também origina plantas haplóides porque os cromossomos desta última são eliminados nas primeiras divisões celulares do embrião, o que já permite o uso eficiente desta técnica como recurso para acelerar o melhoramento de cevada (Kasha 1974) (Fig. 4).

Até recentemente, tinha sido possível para o homem praticar a biotecnologia apenas ao nível de "planta inteira". Neste nível, a criação da variabilidade para a seleção pelo melhorista pode ser obtida somente por mutação ou hibridação e a obtenção dos genótipos desejados se baseia em probabilidades. Mutagênicos químicos, radiações ionizantes ou genes mutadores (como o sistema 5B do trigo descrito na Fig. 5), são utilizados no primeiro caso (Sears 1965, 1972). No segundo, a variabilidade pode ser obtida por hibridações artificiais, tanto entre cultivares, combinando características úteis (melhoramento convencional), como entre espécies distintas: um exemplo do

último caso é a ressíntese experimental do trigo hexaplóide, que foi efetuada por McFadden & Sears (1944), pela primeira vez, tornando disponíveis genes de outro modo inacessíveis ao melhoramento. A Fig. 6 ilustra a obtenção de uma linhagem de trigo sintético (PF 834001), que expressa a resistência ao oídio (*Erysiphtis graminis*) encontrada nas espécies afins usadas como genitoras no cruzamento original. A cultura do embrião híbrido, em meio artificial, permite sua sobrevivência, substituindo o endosperma que degenera. A linhagem assim obtida pode ser trabalhada do mesmo modo que as normalmente utilizadas pelo melhorista, sem necessidade de recursos de laboratório (Riley & Kimber 1966).

Um exemplo da combinação dos dois métodos (mutação e hibridação) foi a obtenção por Sears (1956), através de um monumental trabalho de engenharia cromossômica, da cultivar de trigo Transfer, portadora de resistência à ferrugem da folha transferida de *Aegilops umbellata* (Fig. 7).

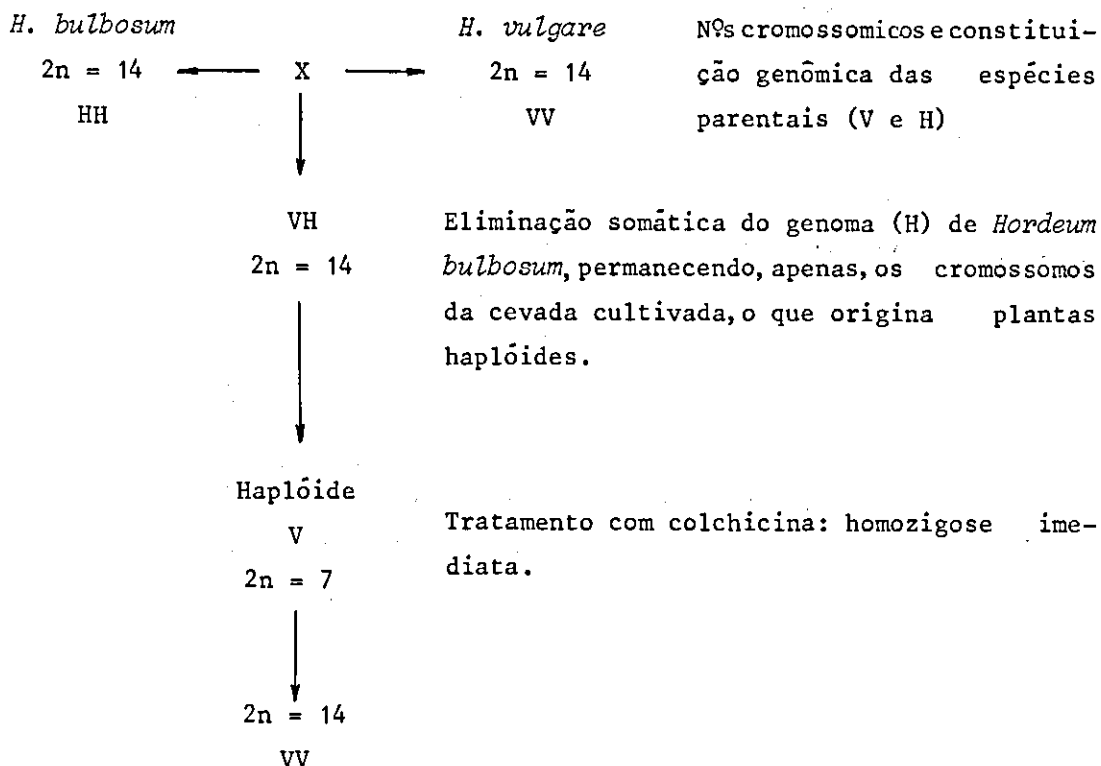


FIG. 4. O uso da hibridação interespecífica como método de obtenção de haploidia na cevada. Os embriões híbridos, cultivados em meio especial, regeneram plantinhas haplóides que, duplicadas com colchicina, originam linhas homozigotas imediatamente, simplificando o trabalho da avaliação do melhorista por não envolver plantas heterozigotas (A cevada é um cereal de autofecundação estando, portanto, adaptada à homozigose; ver também a Fig. 8b).

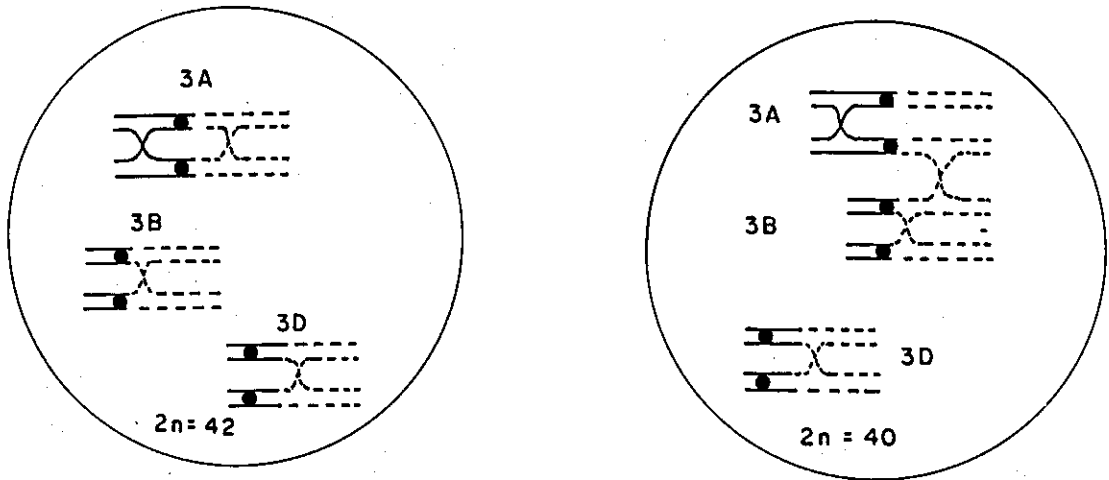


FIG. 5. A ausência do cromossomo 5 do genoma B do trigo faz com que todos os cromossomos, ao invés de se associarem, normalmente, aos pares, formem associações múltiplas, indicando a ocorrência de homologia parcial (homeologia) entre os diferentes genomas que constituem o trigo hexaplóide atual ( $2n = 42$ , AABBDD). O trigo atual tem três conjuntos de sete pares de cromossomos, cada um de uma espécie ancestral. Apesar de formar, normalmente, 21 pares, quando o cromossomo 5 do genoma B está ausente, inúmeras associações múltiplas são formadas, permitindo recombinações não convencionais. Considera-se que o cromossomo 5B (seu braço longo) é portador de um gene ou complexo gênico que limita as associações aos pares estritamente homólogos, sendo crítico para a fertilidade do trigo, pois permite a segregação regular dos cromossomos e a produção de gametas balanceados. Por exemplo, na figura, está ilustrado o comportamento dos pares cromossômicos do trigo 3A, 3B e 3D, (os outros não estão representados) cada um originado de uma espécie ancestral, na presença e na ausência do cromossomo 5B. O mesmo pode acontecer com quaisquer conjuntos homeólogos.

a) Células-mãe de pólen de plantas com o cromossomo 5B presente.

Regiões não-homólogas nos três pares.

Regiões ainda homólogas.

Quando o cromossomo 5B está presente (a), o pareamento (preferencial) ocorre apenas entre pares estritamente homólogos, restringindo a recombinações genéticas aos cromossomos homólogos.

b) Células-mãe de pólen de plantas com o cromossomo 5B ausente.

Quando o cromossomo 5B está ausente (b), o pareamento pode ocorrer entre cromossomos parcialmente homólogos, quaisquer (ex. 3A, 3B ou 3D) permitindo a translocação de segmentos sem necessitar recorrer ao uso da irradiação.

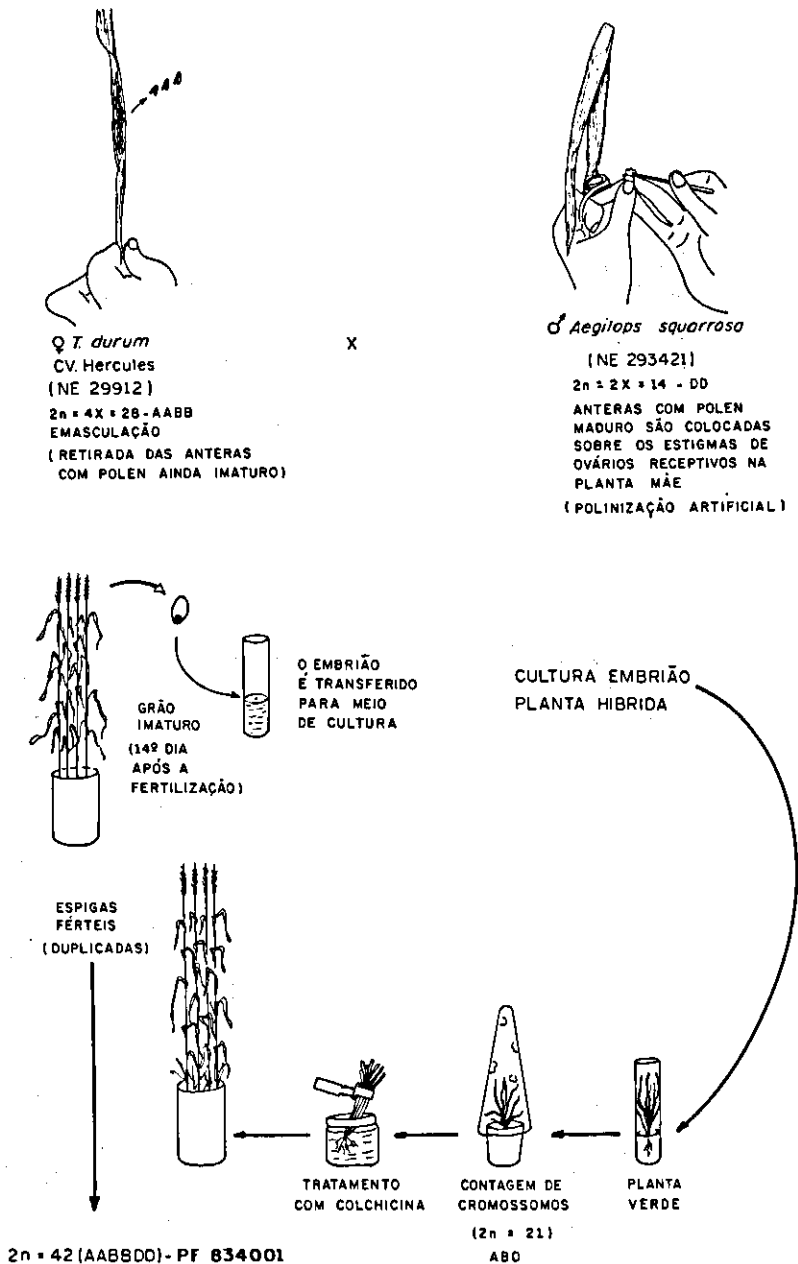


FIG. 6. Para a utilização de genes de *Aegilops squarrosa* ( $2n = 14$ , DD), um cruzamento semelhante ao que deu origem ao trigo atual é feito artificialmente: no caso *T. durum* ( $2n = 28$ , AABB) é cruzado com *Ae squarrosa* ( $2n = 14$ , DD). O embrião híbrido ( $2n = 21$ , ABD) deve ser cultivado em meio especial pois o endosperma degenera a partir do décimo quarto dia após a fertilização. O meio de cultura substitui o endosperma permitindo que o embrião dê origem a uma plantinha viável. Esta tem seus cromossomos duplicados com colchicina atingindo o número de  $2n = 42$  e a constituição genômica do trigo atual (AABBDD). (CNPT, EMBRAPA, P. Fundo, RS).

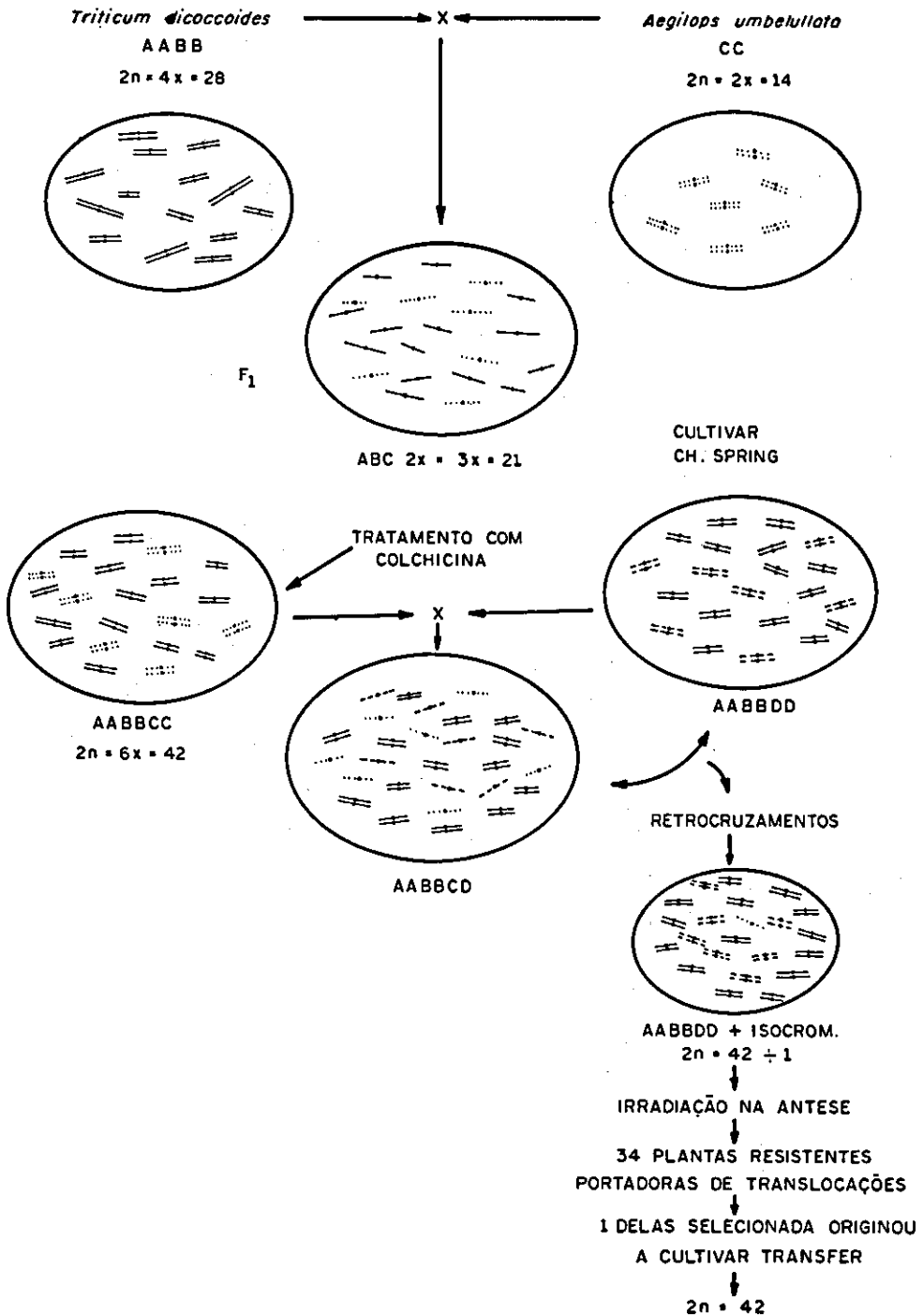


FIG. 7. Através de um sofisticado trabalho de engenharia cromossômica, Sears (1956) transferiu a resistência à ferrugem da folha de *Aegilops umbellata* para o trigo comum (cultivar Chinese spring), originando a cultivar transfer.



Ao nível de seleção da "planta inteira", o melhorista lida com probabilidades, como já foi enfatizado, e a substituição genética pode envolver a transferência de características indesejáveis, impossíveis de separar em virtude da ligação genética. A seleção dos genótipos desejados é feita a campo e sua propagação para fins comerciais é efetuada posteriormente, obedecendo a esquemas que dependem do modo de reprodução da cultura.

A seleção natural também discrimina a planta inteira, do mesmo modo que o melhorista, por isto a atuação do último, neste nível, nunca poderá ser substituída. Entretanto, apesar do melhoramento depender, basicamente, do julgamento do melhorista, ele pode se apoiar em critérios objetivos, utilizando metodologias mais ou menos sofisticadas para minimizar os enganos que são inerentes à subjetividade humana.

Duvick (1983) considera que, embora "muitas das promessas da biotecnologia possam também ser cumpridas pelo melhoramento convencional e de que outras sejam exequíveis apenas em um futuro distante", as perspectivas de aplicação imediata estão, em primeiro lugar, na fitopatologia. Esta permite a identificação de moléstias viróticas mais rápida e precisamente do que os anti-soros atuais, usando o cDNA ou DNA complementar, assim denominado por ser obtido a partir do RNA viral. Em segundo lugar, no melhoramento através de transformação genética de bactérias fixadoras de nitrogênio das leguminosas, que podem ser adaptadas a outras culturas e pelo uso, em larga escala, de plantas homocigotas, através da indução da haploidia (ver item seguinte). Por outro lado, como é necessário o conhecimento da regulação de qualquer gene, antes que ele seja inserido e expresso na planta, "o progresso no conhecimento da biologia e da genética de nossas plantas cultivadas deverá ser considerável nos próximos anos". Neste trabalho, são discutidas, com maiores detalhes, as implicações genéticas e as perspectivas, para o melhoramento, da cultura de tecidos. Revisões amplas dos assuntos aqui abordados podem ser encontradas em Kasha (1974), Thomas et al. (1979), Sharp & Larsen et al. (1979), Riley et al. (1979), Sala et al. (1980), Thorpe (1981), Crocomo & Ochoa-Alejo (1983), Kosuge et al. (1983), Yeoman et al. (1980).

#### CULTURA DE TECIDOS E HAPLOIDIA NO MELHORAMENTO

Mutações de importância científica e econômica são difíceis de serem detectadas em plantas diplóides ( $2n$  cromossomos) heterocigotas, principalmente porque estas mutações são, em geral, recessivas. Entretanto, numa planta haplóide, que apresenta apenas a metade do patrimônio genético ( $n$  cromossomos), todas as mutações podem ser rapidamente detectadas, já que todos os genes estão em dose simples. Após a duplicação do número cromossômico, que pode ser espontânea ou induzida pela colchicina (alcalóide de origem vegetal, extraído do

*Colchicum autumnale*), a homocigose é obtida imediatamente, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata, sendo também restaurada a fertilidade, pois a planta haplóide é estéril (Fernandes & Picard 1983).

O uso de plantas haplóides, além de facilitar a análise genética, eliminando as complexidades do estado heterocigoto, representa também, para os programas de melhoramento, a economia de vários anos no tempo necessário para obtenção de novas linhagens, o que é ilustrado na Fig. 8.

Plantas haplóides podem ser obtidas de vários modos: a partir do gameta masculino por culturas de anteras ou pólen isolado; por eliminação de um genoma completo, após hibridações interespecíficas, como ilustrado na Fig. 4 e, finalmente, pelo desenvolvimento da oosfera (gameta feminino) sem fertilização (partenogênese). No primeiro caso, os resultados são muito encorajadores para culturas como o fumo, o trigo, o arroz e a cevada; no segundo, estão limitados à cevada, até o momento; e, no terceiro, não se encontrou referência de resultados aplicados. Portanto, a cultura de anteras ou pólen permanece sendo a técnica mais promissora.

Nas angiospermas, a fase gametofítica ocorre logo após a meiose. O micrósporo sofre uma divisão mitótica assimétrica que dá origem ao grão de pólen com duas células desiguais: uma com um núcleo altamente condensado (generativo) e outra, com um núcleo difuso (vegetativo). A primeira divide-se novamente, originando os dois gametas masculinos: um, fertilizará a oosfera e o outro, o endosperma.

Os embriões haplóides, através da cultura de anteras, podem originar-se a partir da célula vegetativa (com degeneração posterior da célula generativa) ou por divisão mitótica simétrica, ao invés de assimétrica, do micrósporo haplóide originado da meiose. Portanto, a célula gamética masculina pode reverter seu desenvolvimento dando origem a um novo indivíduo (Vasil et al. 1979) (Fig. 9).

Os genes do RNA ribossomal e transferidor do grão de pólen parecem ser desligados 24 horas após a primeira mitose (Mascarenhas 1971). Depois deste momento, não seria mais possível reverter o desenvolvimento e a célula seguiria a rota normal para a formação do pólen (Vasil 1973). As células que, no momento da cultura, não tivessem chegado ao ponto crítico, poderiam potencialmente reverter, formando plantas normais. As anteras que ficam com coloração marrom na cultura, originam embriões enquanto que as que mantêm aparência normal, dificilmente o fazem. É possível que algum produto da parede da antera em degeneração dispare o mecanismo que permite a formação dos embriões haplóides (Mii 1976).

A organização e as características da cromatina dos dois núcleos do grão de pólen mostram que o generativo condensado tem histonas em estado ativo de supressão da transcrição, enquanto o núcleo vegetativo difuso, com his-

tonas ausentes ou em forma inativada ou estruturalmente alterada, permitiria a continuação da transcrição sob condições apropriadas, aceitando a reversão do desenvolvimento (Vasil et al. 1979).

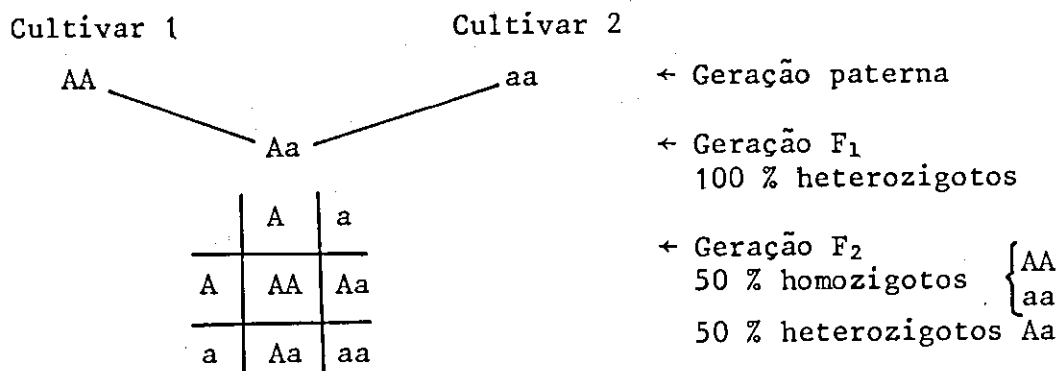


FIG. 8a. As vantagens de haploidia no melhoramento das plantas autofecundadas. Quando são efetuados cruzamentos entre cultivares, deseja-se obter novas combinações genéticas superiores em produtividade, em adaptação ou em resistência a patógenos. Na geração F<sub>2</sub> após os cruzamentos, ocorre a heterozigose e são necessárias sete gerações de autofecundação para que as novas combinações se tornem homozigotas. Na geração F<sub>3</sub>, a população será constituída dos homozigotos da geração anterior e mais a metade dos heterozigotos que segregarão, novamente, de maneira semelhante à ocorrida na geração F<sub>2</sub>. Assim, a população será, agora, constituída de 75% de homozigotos (50% + 25%). Na geração F<sub>4</sub>, passará a 87,5% de homozigotos (75% + 12,5%), até atingir a homozigose quase total na geração F<sub>7</sub>. Depois, as linhagens devem ser avaliadas quanto ao rendimento e à adaptação a vários ambientes, e suas sementes multiplicadas, o que exige um tempo elevado (10 - 14 anos) entre a execução dos cruzamentos e a disponibilidade de novas cultivares comerciais.

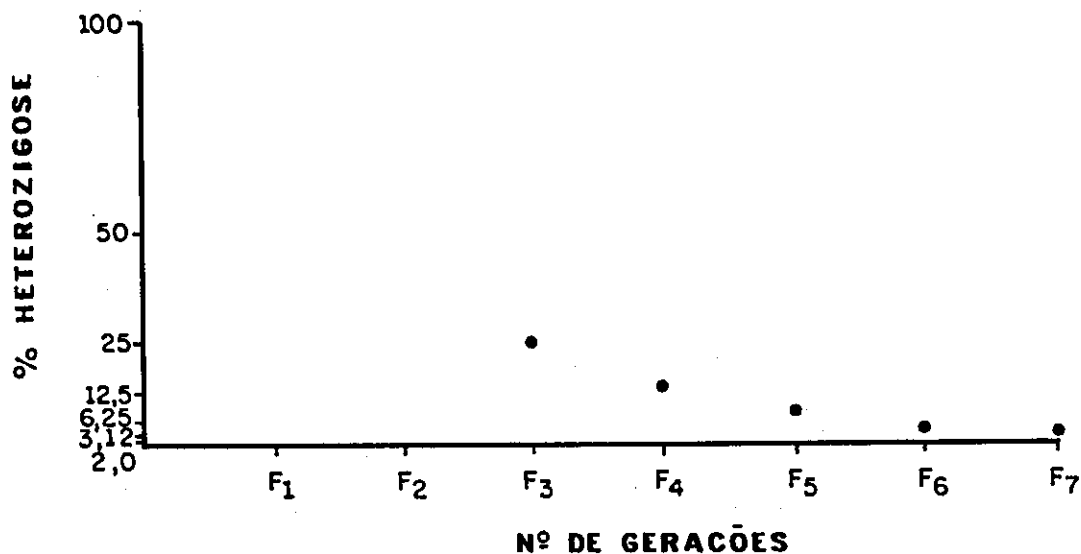


FIG. 8b. Curva teórica da volta à homozigose em gerações sucessivas de autofecundação, após o cruzamento entre linhas homozigotas.

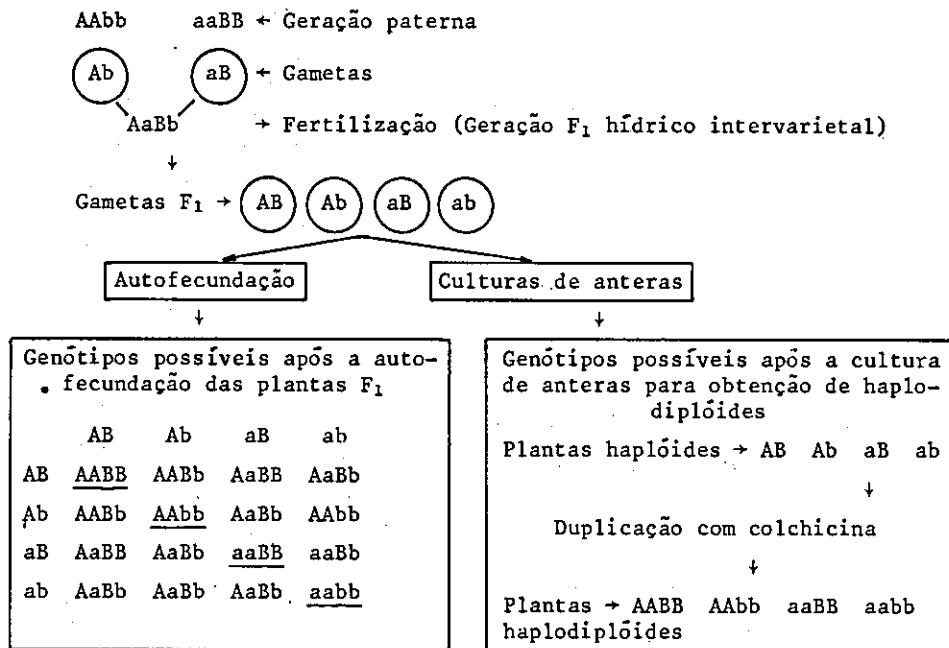


FIG. 8c. As vantagens do uso da haploidia no melhoramento quando as cultivares genitoras diferirem, teoricamente, por dois pares de genes numa cultura de autofecundação. Se o genótipo procurado for o duplo recessivo aabb, por exemplo, o melhorista tem a probabilidade de 1/16 de encontrá-lo na população, isto se for usada a autofecundação convencional, pois são 16 os genótipos possíveis; se for usada a haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de 1/4, pois não ocorrerão os genótipos heterozigotos. Numa cultura de autofecundação, onde a homozigose é a regra, o melhorista necessitará da raiz quadrada do tamanho de população normalmente utilizada pelos métodos convencionais ( $\sqrt{16} = 4$ ) para ter, teoricamente, a mesma chance de selecionar o genótipo desejado, o que representará economia de espaço, tempo e de recursos.

As pesquisas, visando à ampliação do uso da cultura de anteras no melhoramento, têm sido realizadas através de dois enfoques principais: o fisiológico e o genotípico. No primeiro, é importante o conhecimento do papel das interações entre os componentes do meio de cultura, principalmente hormonais, que “disparam” as divisões celulares morfogenéticas, bem como os fatores que permitem a sobrevivência dos embriões e sua diferenciação correta. Este conhecimento é crítico para a melhora da eficiência dos trabalhos atualmente em andamento e para a utilização desta tecnologia no melhoramento de outras plantas cultivadas. No segundo caso, a identificação dos fatores genéticos relacionados à “capacidade androgenética”, que é a capacidade de um genótipo de formar embriões em meio de cultura e diferenciá-los, originando plantas verdes viáveis, permite que seja efetuada seleção para disseminação desta característica nos blocos de cruzamento (Picard 1984, Foroughi-Wehr et al. 1982, Fernandes & Picard 1983, Schaeffer et al. 1979).

Diversos estudos, principalmente em cevada, mostram que a variabilidade obtida por cultura de anteras de plan-

tas pertencentes à populações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, é comparável, ou até superior, à variabilidade obtida por outros métodos como: “Single seed descent”, “Bulk” ou “Pedigree”, permitindo, portanto, o mesmo nível de discriminação para o melhorista (Friedt & Foroughi-Wehr 1983). Choo et al. (1982), por exemplo, mostraram que ocorreram distribuições similares para rendimento, porte e precocidade quando linhagens duplo-haplóides, obtidas por cultura de anteras de cevada, foram comparadas com as obtidas por “Single seed descent”.

#### A UTILIZAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DE PLANTAS ORIGINADAS A PARTIR DO CULTIVO DE CÉLULAS OU TECIDOS ISOLADOS

Até recentemente, poucos pesquisadores na área de cultura de células vegetais se preocupavam com a análise detalhada das plantas regeneradas ou consideravam a manipulação das células cultivadas dentro de um contexto genético. Como, para sua multiplicação, as plantas originadas a partir de células ou tecidos cultivados não passam

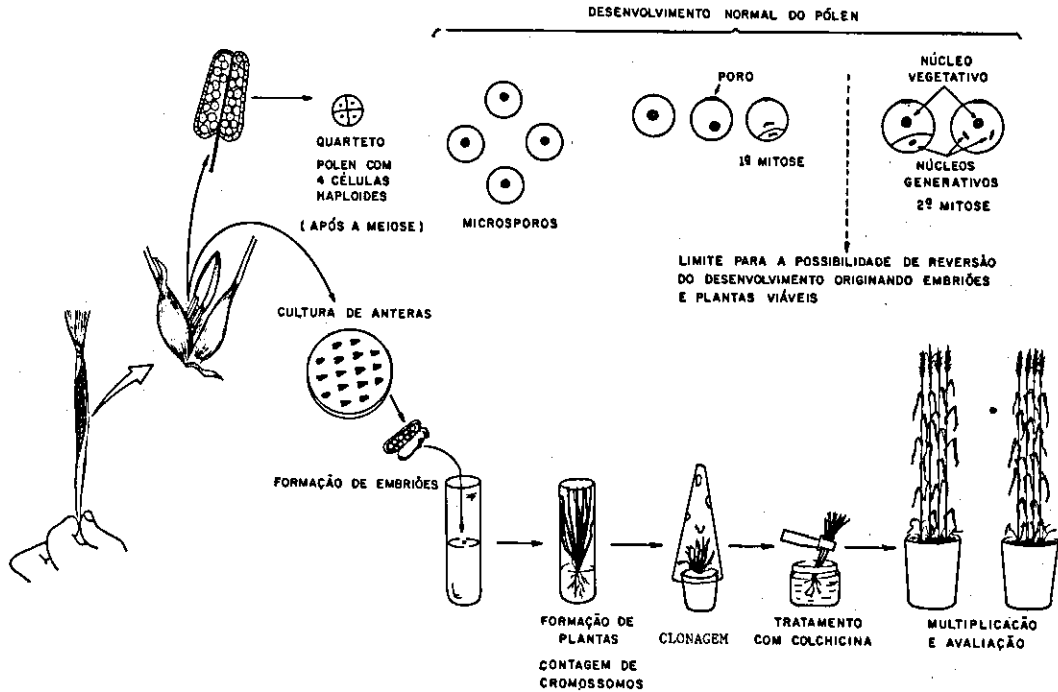


FIG. 9. Cultura de anteras em trigo para obtenção de plantas haplóides.

pelo processo de reprodução sexual, a pressuposição de sua uniformidade genética está fora de qualquer dúvida, sendo admitidas apenas mutações ocasionais como eventuais fontes de variação. As mutações, entretanto, são eventos raros e a observação de variantes em frequências inesperadamente altas, nas linhagens obtidas por cultura, que foi denominada variação somaclonal, despertou grande interesse pelas perspectivas de seu uso no melhoramento e pelo seu valor científico. Esta variação foi explicada, em alguns casos, como consequência de alterações dos números cromossômicos que são observados com frequência nos tecidos cultivados em meios artificiais. Aneuploidia e poliploidia ocorrem, frequentemente, em somaclones de culturas como batata, arroz, cevada, sorgo, aveia e cebola; alterações na estrutura dos cromossomos (bandas c) foram observadas em culturas de feijão.

Mas, em outros casos, a natureza genética da variação continuava desconhecida (Larkin & Scofield 1983).

Na estação experimental havaiana dos plantadores de cana, na indústria do fumo e na floricultura, foi observado pela primeira vez o potencial da variação somaclonal. No entanto, os estudos mais detalhados deste tipo de variação foram efetuados em duplo-haplóides de fumo. O possível efeito mutagênico da colchicina foi eliminado para explicar a variação das linhas que, teoricamente, seriam total-

mente homocigotas quando se verificou que duplo-haplóides espontâneos também mostraram heterogeneidade. Um segundo ciclo de cultura de anteras, a partir de duplo-haplóides, originou ainda variação adicional. Há sugestões de que os variantes seriam resultantes da fusão dos núcleos generativo e vegetativo do grão de pólen, os quais teriam diferenças epigenéticas, mas esta afirmação necessita de maiores investigações (De Paeppe et al. 1981). Variações herdáveis foram descritas, também, em somaclones derivados de protoplastos de fumo, de nabo, de arroz, de milho e de trigo para resistência a doenças e herbicidas, respostas hormonais e caracteres agrônomicos como número de grãos e peso de 1000 grãos. A variação somaclonal encontrada na batata por Shepard e seu grupo é descrita na Fig. 10. (Shepard 1981, Secor & Shepard 1981, Shepard et al. 1980).

Há, também, descrição de variação de origem citoplasmática em milho, originada pela perda de fragmentos do DNA mitocondrial, modificando a resposta à toxina do *Helminthosporium maydis* e recuperando o macho-fertilidade. Esta variação foi, matematicamente, transmitida. As investigações comprovam que a variação não era preexistente e foi induzida pelas condições de cultura. Algumas mutações somaclonais são mais frequentes como, por exemplo, folhas enroladas, resistência à hidroxiurea e ao herbicida picloram no fumo, e resistência à toxina do

*Helminthosporium sacharum* na cana-de-açúcar (Larkin & Scowcroft 1983).

Verifica-se, pois, que o cultivo das células isoladas abre perspectivas para a manipulação de plantas como se fossem microrganismos, mostrando a possibilidade de seleção de genótipos a partir de populações de células em condições de cultivo onde ocorre uniformidade fisiológica e de desenvolvimento. No entanto, os esforços para selecionar mutantes obtidos *in vitro*, através da variação soma-

cional, mostraram que as células não se comportam como organismos unicelulares independentes, mas são componentes de sistemas de desenvolvimento altamente complexos (os tecidos e órgãos). Características agrônomicas importantes como rendimento não são expressão do genótipo-celular, mas resultam da diferenciação de células, tecidos e órgãos que ocorre na planta inteira. Genótipos que expressam mutações favoráveis em meio de cultura, como resistência a herbicidas, por exemplo, não o expressam sempre nas plantas daí regeneradas.

BATATA (CULTIVAR RUSSET BURBANK; ESTÉRIL)

Obtenção de 1.700 linhagens originadas de protoplastos de folhas (somaclones)

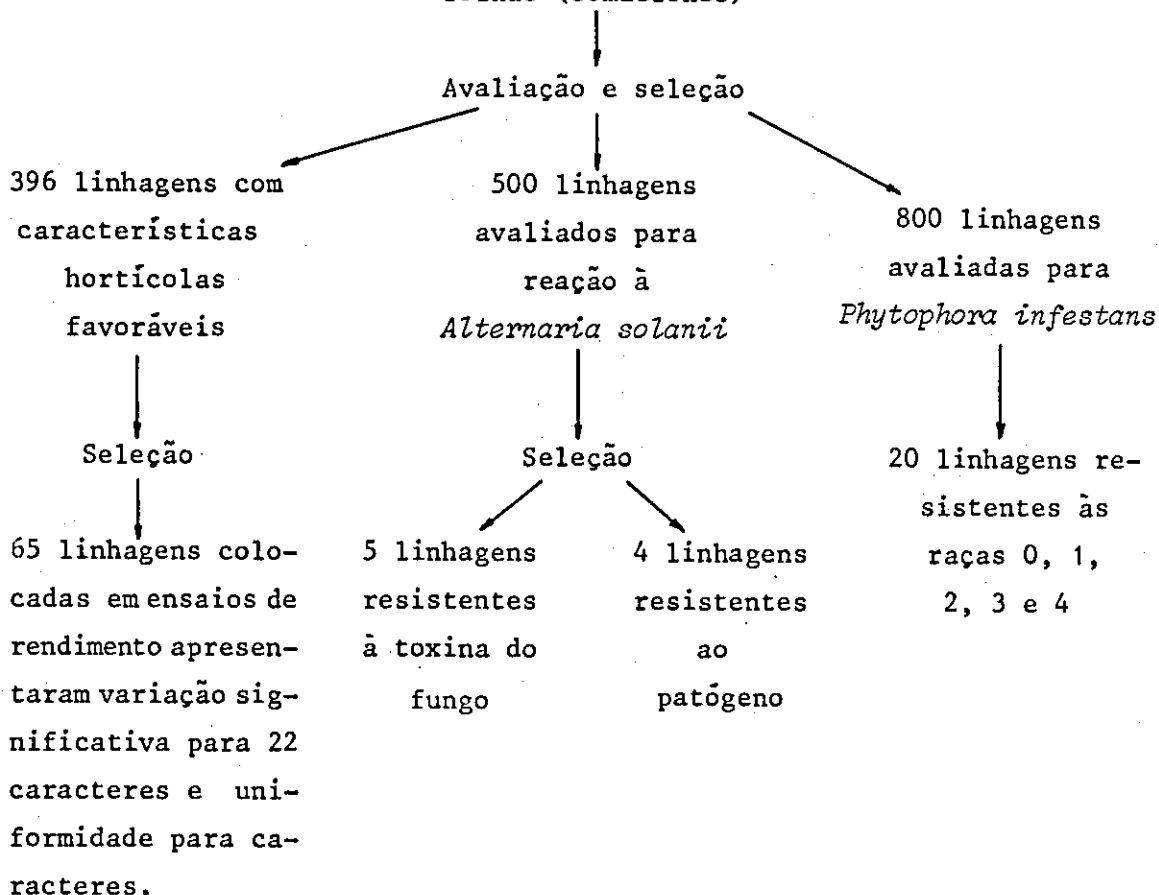


FIG. 10: Resultados obtidos por Shepard e seu grupo, evidenciando a ocorrência de variação somaclonal na batata (Secor & Shepard 1981).

Uma interpretação (Chaleff 1983) sugere que, em contraste com as mutações genéticas que seriam mudan-

ças do DNA ou cromossomo, as mutações epigenéticas refletiriam modificações na expressão gênica, caracteri-

zando-se por estabilidade através das divisões mitóticas e por reversibilidade quando tivessem que atravessar os processos da meiose e da diferenciação. Seriam definidas pela capacidade de persistir após as divisões celulares que seguem a remoção das condições indutoras, mas não se expressariam nas plantas regeneradas ou na sua descendência sexual. No momento, a transmissão de um caráter após a reprodução sexual é o critério aceitável que distingue uma modificação genética de uma modificação epigenética. O fenômeno denominado "habituação" é que melhor explicaria a variação epigenética. A necessidade de suplementação exógena de hormônios como auxinas e citoquininas para células de fumo em cultura, por exemplo, pode ser perdida e as células se multiplicariam sem necessidade de adição de hormônios ao meio.

De acordo com a revisão de Chaleff (1983), a resistência ao herbicida paraquat, em células de fumo, apresentou mecanismos de resistência variáveis. Em alguns casos, a resistência foi selecionada ao nível de célula via respiração mitocondrial. Outras culturas mostraram resistência de "calos", mas destas, apenas parte das plantas regeneradas foram resistentes ao herbicida no campo. Também no fumo a resistência ao herbicida picloram foi variável: em alguns casos, a resistência ocorreu apenas quando o herbicida foi adicionado ao meio, em outros, na germinação das sementes de plantas originadas de cultivo *in vitro* e, finalmente, houve casos em que ocorreu *in vitro* e a campo. Foi selecionada uma nova mutação estável no nível celular, e com alto grau de tolerância de planta inteira. Experimentos, cuidadosamente conduzidos, mostram que, em muitos casos, a restauração da necessidade de suplementação hormonal, em cultura de plantas regeneradas de células "habituaadas à ausência do hormônio", era uma reversão verdadeira, mantendo-se após a reprodução sexual. Tolerância ao frio e ao herbicida picloram mostraram o mesmo mecanismo. A característica mudada pode desaparecer em muitos casos, porque a diferenciação modifica a expressão do gene mutado. O papel das isozimas (formas múltiplas de enzimas que são codificadas por genes distintos, embora possuam atividade catalítica semelhante) seria importante para explicar estas situações. As várias formas de isozimas seriam sintetizadas em taxas diversas, em momentos distintos do desenvolvimento da planta. Estas mutações poderiam, também, estar ligadas a algum mecanismo disparado pelas condições da cultura ou, talvez, ao comportamento dos "genes saltadores", os quais, por efeito de posição, alteram a expressão de outros genes.

#### CULTURA E FUSÃO DE PROTOPLASTOS NA OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS ENTRE ESPÉCIES DISTANTES

Protoplastos são células desprovidas de parede celular. Para sua obtenção é necessária a degradação da parede celular por enzimas específicas (celulase, pectinase), bem como combinações adequadas de pH, temperatura e a

rápida colocação no meio de cultura. Neste meio, a adição de polietileno glicol favorece a fusão, permitindo a formação de células híbridas tanto homo como heterocarióticas (núcleos geneticamente semelhantes e distintos respectivamente). É possível a fusão de células de espécies distintas, mesmo daquelas distantemente relacionadas, em que a obtenção de híbridos por polinizações artificiais tem sido impossível (Vasil et al. 1979).

As limitações para a obtenção de híbridos entre espécies distantes se referem, principalmente, à ocorrência de eliminação seletiva de todos os cromossomos de uma das espécies, a dificuldades na regeneração de plantas viáveis a partir da célula híbrida e a problemas de esterilidade das plantas híbridas de origem genética, que não podem ser superados com a duplicação dos cromossomos com colchicina. O sucesso destes trabalhos ficou, até o momento, limitado a Solanáceas (revisão em Evans & Flick 1983).

Além da possibilidade de obtenção de híbridos *in vitro*, a cultura de protoplastos permite o transplante de organelas (núcleos, mitocôndria, cloroplastos e cromossomos) e a incorporação de microrganismos e de moléculas de DNA (Crocorno & Ochoa-Alejo 1983).

A combinação de tecnologia do DNA recombinante com a cultura de protoplastos já possibilitou a transferência e a expressão de características de procariotes em eucariotes, (no caso a resistência a um antibiótico da bactéria *E. coli* para a fava), utilizando, como veículo de clonagem, o plasmídeo Ti da *Agrobacterium tumefaciens*, o que abre uma perspectiva de aplicação totalmente nova e, até recentemente, impossível de obter através dos métodos, até agora conhecidos, de apoio ao melhoramento vegetal (Fraleigh et al. 1983).

#### REFERÊNCIAS

- CHALEFF, R.S. Considerations of developmental biology by the plant cell geneticist. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. p.157-70.
- CHOO, T.M.; REINBERGS, E.; PARK, S.J. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 61:215-8, 1982.
- CROCORN, O.J. & OCHOA-ALEJO, N. The potential contribution on cell and plant tissue culture to crop improvement. In: SHEMAIT, L.W., ed. Chemistry and world food supplies; the new frontiers (CHEMRAWN II). s.l., Pergamon, 1983. p.607-19.
- DE PAEPE, R.; BLETON, E.; GNANGBE, F. Basis and extent of genetic variability among double haploid plants obtained by pollen culture in *Nicotiana sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 59:177-84, 1981.
- DUVICK, D.N. Round table discussion on research priorities. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of

- plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. p.482-4.
- EVANS, D.A. & FLICK, C.E. Protoplast fusion; agricultural applications of somatic hybrid plants. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. p.271-88.
- FERNANDES, M.I.B. de M. & PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using Brazilian wheat genotypes. R. bras. Genet., 6(2):261-77, 1983.
- FOROUGH-WEHR, B.; FRIEDT, W.; WENZEL, G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet., 62:233-9, 1982.
- FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMANN, N.L.; WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 80:4803-7, 1983.
- FRIEDT, W. & FOROUGH-WEHR, B. Field performance of androgenetic double haploid spring barley from F<sub>1</sub> hybrids. Z. Pflanzenzuecht., 90:177-84, 1983.
- KASHA, K.J. Haploids from somatic cells. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plants; advances and potential; proceedings. Guelph, University of Guelph, 1974. 421p.
- KNOFF, V.C. Practical aspects of biogenetic engineering in crops. Outlook Agric., 12(2):50-6, 1983.
- KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. 499p.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation and crop improvement. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. p.283-314.
- MCFADDEN, E.S. & SEARS, E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. J. Hered., 37:81-9, 107-16, 1944.
- MASCARENHAS, J.P. RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth. In: HESLOP-HARRISSON, J., ed. Pollen; development and physiology. London, Butterworth, 1971. p.201-22.
- MII, M. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenphysiol., 80:206-14, 1976.
- PICARD, E. Contribution a l'etude de l'heredite et de l'utilisation en selection de l'haploidiplodisation par androgenese *in vitro* chez une cereale autogame; *Triticum aestivum* L. Paris, Universite de Paris-SUD, 1984. 269p. Tese Doutorado.
- RILEY, R.; HERMSEN, J.G.T.; LIE, T.A.; MULDER, E. G.; MIEDEMA, P.; GELDER, W.M.J. van; COCKING, E.C.; POWER, J.B.; SCHILPEROORT, R.A. Methods for the future. In: SNEEP, J.; HENDRIKSEN, A.J.T.; HOLBEK, O., ed. Plant breeding perspectives. Wageningen, PUDOC, 1979. p.321-69.
- RILEY, R. & KIMBER, G. The transfer of alien genetic variation to wheat. In: PLANT BREEDING INSTITUTE, Cambridge, Inglaterra. Annual report (1964-1965). Cambridge, 1966. p.6-36.
- SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O., ed. Plant cell cultures; results and perspectives; proceedings. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical, 1980. 433p. (Developments in plant biology, 5)
- SCHAEFFER, G.W.; BAENZIGER, P.S.; WORLEY, J. Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. Crop Sci., 19:697-702, 1979.
- SEARS, E.R. Chromosome engineering in wheat. In: KIMBER, G. & REDEI, G.P. Stadler genetics symposia. Columbia, University of Missouri, 1972. p.23-8.
- SEARS, E.R. Transfer of genes from wild relatives to wheat. Genetics, 1(5):107-20, 1965.
- SEARS, E.R. The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. Brookhaven Symp. Biol., 9:1-22, 1956.
- SECOR, G. & SHEPARD, J.F. Variability of protoplast-derived potato clones. Crop Sci., 21:102-5, 1981.
- SHARP, W.R. & LARSEN, P.O. Plant cell and tissue culture; current applications and potential. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. Plant cell and tissue culture; principles and applications. Columbus, Ohio State University Press, 1979. p.115-20.
- SHEPARD, J.F. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopathol., 19:145-66, 1981.
- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. Science, 208: 17-24, 1980.
- SIMMONDS, N.W. Plant breeding; the state of the art. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A., ed. Genetic engineering of plants; an agricultural perspective. New York, Plenum, 1983. p.5-25.
- THOMAS, E.; KING, P.J.; POTRYKUS, I. Improvement of crop plants via single cells *in vitro*; an assessment. Z. Pflanzenzuecht., 82:1-30, 1979.
- THORPE, T.A., ed. Plant tissue culture; methods and applications in agriculture. New York, Academic, 1981. 379p.
- VASIL, I.K. The new biology of pollen. Naturwissenschaften, 60:247-53. 1973.
- VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. Adv. Genet., 20:127-215, 1979.
- WENZEL, G. The potential and limits of classical genetics in plant breeding. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O., ed. Plant cell cultures; results and

- perspectives: proceedings. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical, 1980. p.33-48. (Developments in plant biology, 5)
- YEOMAN, M.M.; MIEDZEBRODZKA, M.B.; LINDSEY, K.; MCLAUCHLAN, W.R. The synthetic potential of cultured plant cell. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O., ed. Plant cell cultures; results and perspectives: proceedings. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical, 1980. p.327-43. (Development in plant biology, 5)