

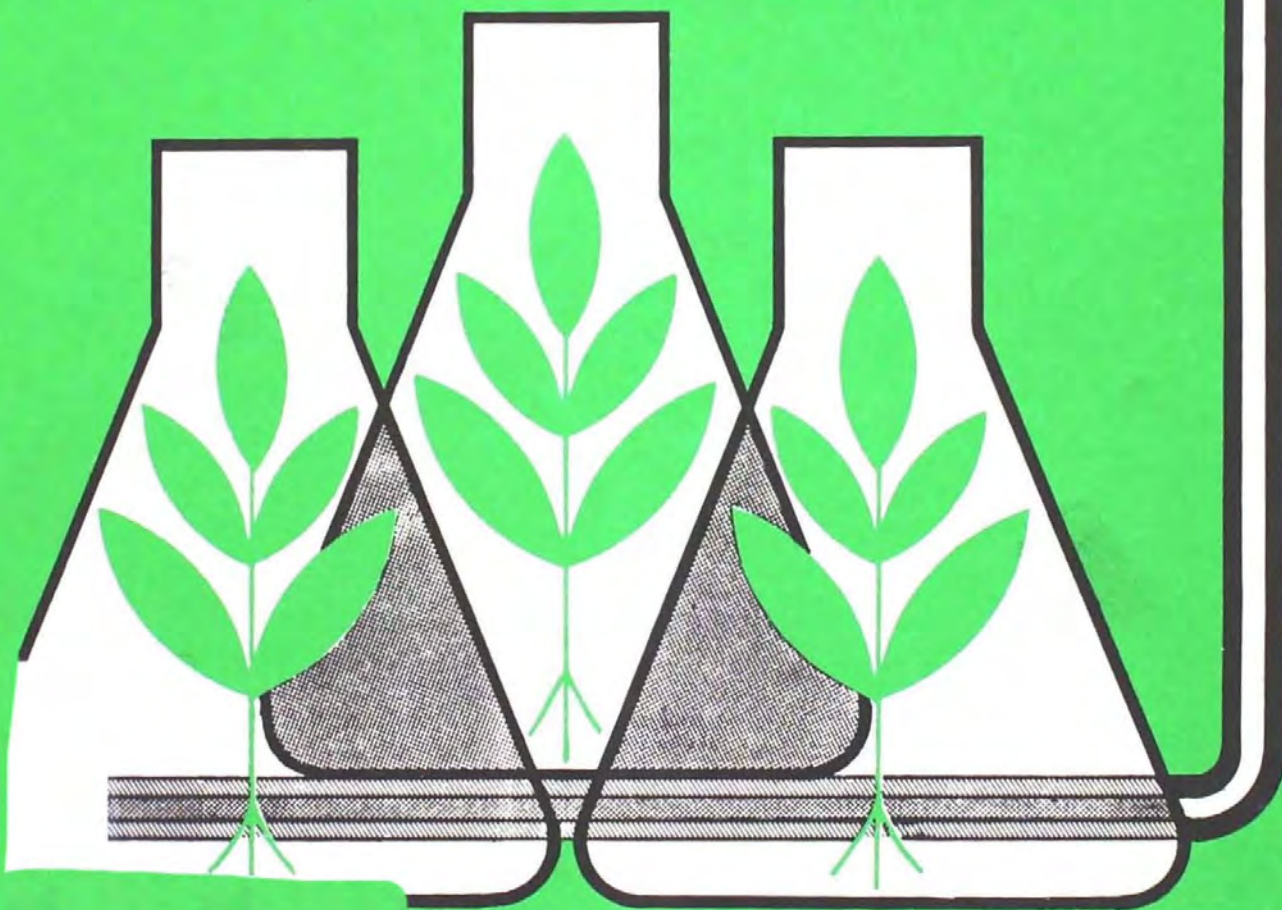


Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Vinculada ao Ministério da Agricultura
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças - CNPH
Brasília, DF

ANAIS DO 1º SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

1 a 3 de outubro, 1985
Brasília, DF



Departamento de Difusão de Tecnologia
Brasília, DF
1986

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: José Sarney

Ministro da Agricultura: Iris Rezende Machado

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Presidente: Ormuz Freitas Rivaldo

Diretores: Ali Aldersi Saab

Derli Chaves Machado da Silva

Severino de Melo Araújo



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças - CNPH
Brasília, DF

**ANAIS DO 1.º SIMPÓSIO NACIONAL
DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

**1 a 3 de outubro de 1985
Brasília, DF**

Departamento de Difusão de Tecnologia
Brasília, DF
1986

Copyright © EMBRAPA - 1986

EMBRAPA-CNPH. Documentos, 1

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao:

Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças - CNPH
BR 060, km 9 - Brasília/Anápolis - Fazenda Tamanduá
Telefone: (061) 556.5011
Caixa Postal 11.1316
70000 Brasília, DF

Tiragem: 500 exemplares

Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais,
1., Brasília, DF, 1985.

Anais do 1. Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1986.

109 p. (EMBRAPA-CNPH. Documentos, 1).

1. Planta - Cultura de tecidos - Congresso. 2. Planta - Engenharia Genética - Congresso. I. Título.

CDD 581.0724063

PROMOÇÃO

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE HORTALIÇAS – CNPH

APOIO

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO – CNPq
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS – ABCTP

AGRADECIMENTOS

BIOMATRIX S.A.
BIOPLANTA TECNOLOGIA DE PLANTA LTDA.
CENIBRA FLORESTAL S.A.
COMPANHIA AGRÍCOLA FLORESTAL SANTA BÁRBARA
DURATEX S.A.
KLABIN DO PARANÁ AGROFLORESTAL S.A.
NESTLÉ – COMPANHIA INDUSTRIAL COMERCIAL BRASILEIRA DE PRODUTOS ALIMENTARES

I SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE HORTALIÇAS – CNPH

PRESIDENTE: RUI LUIZ VAZ

COORDENADOR: ANTONIO CARLOS TORRES

COMISSÃO ORGANIZADORA:

- ADONAI GIMENEZ CALBO
- ALBANO SALUSTIANO PEREIRA
- ANTONIO CARLOS GUEDES
- ANTONIO CARLOS TORRES
- ECILDA L. DOS S. SOUZA
- FAUSTO F. DOS SANTOS
- MARIA FÁTIMA B.F. LIMA
- NOZOMU MAKISHIMA
- ORLANDO CAMPELO RIBEIRO
- RAFAEL E. JABUONSKI
- RENATO A. DE SOUZA
- ROBERTO VICENTE COBBE
- VERA SHOLZE BORGES
- WELLINGTON PEREIRA

SUMÁRIO

Cultura de tecidos: potencial e aplicação Rui Luiz Vaz	9
CULTURA DE TECIDOS	
Cultura de ovários in vitro Antonio Carlos Torres	13
Propagação de couve-flor in vitro Antonio Carlos Torres & José de Almeida Souza	19
Produção de plantas de batata livres de vírus Ecilda L. dos S. Souza & José de Almeida Souza	21
Cultura de embrião Claudinei Andreoli	25
A embriogênese somática e suas aplicações Frédéric J. Bakry	29
Clonagem in vitro de orquídeas através de ápices radiculares Gilberto B. Kerbauy	33
Cultura de tecidos e biotecnologia Linda Styer Caldas	37
Clonagem e melhoramento de plantas in vitro Otto J. Crocomo; A. Natal Gonçalves & J.B. Cabral	39
Metodologia de seleção in vitro para resistência a fatores causadores de estresse Rolf Dieter Illg	45
Cultura de tecidos do alho: alta frequência de regeneração de plantas a partir de calos Rolf Dieter Illg	49
Cultura de tecidos e metabolismo secundário Ruy de Araújo Caldas	51
Preservação de germoplasma por processo criobiológico Silvio Lopes Teixeira	53
Produção e uso de haplóides Walter Handro	57
ENGENHARIA GENÉTICA	
Microorganismos termofílicos, celulolíticos e amilolíticos; isolamento e avaliação Carlos R. Félix; Sérgio B. Silva; Cirano J. Ulhoa; Cláudio da Cunha & Ruy de A. Caldas	63
Síntese e clonagem do ds-cDNA correspondente a um gene específico Edgar Cunha Filho	67

A cultura de protoplastos, embriões, óvulos, ovários e a polinização *in vitro* são técnicas alternativas que podem ser usadas na recuperação de híbridos raros, em situações onde ocorrem mecanismos de incompatibilidade sexual, que impedem o desenvolvimento normal de sementes. Isto possibilitaria a transferência de genes desejáveis, presentes em espécies silvestres, para espécies cultivadas.

As técnicas de biologia molecular e engenharia genéti-

ca parecem ser as grandes promessas do futuro, para o melhoramento genético das plantas. Entretanto, qualquer previsão, agora, sobre onde se poderá chegar com tais métodos, não passa de mera especulação.

Somente um trabalho integrado de todos os segmentos dos métodos *in vitro* possibilitará avanços significativos na criação de genótipos superiores, que poderão atender à crescente demanda de alimentos em nosso País.

CULTURA DE TECIDOS

The use of Ti-plasmids in plant genetic engineering Eugen S. Gander	77
Tissue culture and genetic engineering; complementary tool for potato improvement John H. Dodds & Jesse M. Jaymes	83
Utilização da biologia molecular para o melhoramento da qualidade nutritiva do feijão Luiz A.B. de Castro	89
Produção de α -amilase por microorganismos recombinantes Spartaco A. Filho & Maria B.N.S. de Souza	93
PROGRAMA DE PESQUISA APRESENTADO PELOS PARTICIPANTES	
Micropropagação do abacaxi <i>in vitro</i> José R.S. Cabral	99
Produção de haplóides de cacaueteiro pelo cultivo de embrião de sementes chochas <i>in vitro</i> Luiz R.M. Pinto; Antonio V.P. dos Santos; Messias G. Pereira & Geraldo A. Carletto	101
Cultura de anteras e embriões <i>in vitro</i> como apoio ao melhoramento do trigo no CNPT/EMBRAPA Maria I.B. de M. Fernandes & Vanderlei da R. Caetano	103
<i>Datura insignis</i> , Barb.Rodr.: cultura de tecidos, ultra-estrutura foliar e obtenção de protoplastos M.A. Esquibel; F.C. Miguens; R.D. Machado & C.G. Costa	107
Conservação de germoplasma vegetal Marisa de Goes	109

CULTURA DE TECIDOS: POTENCIAL E APLICAÇÃO

Rui Luiz Vaz¹

A biotecnologia inclui uma multiplicidade de técnicas e processos de utilização de sistemas celulares de plantas, animais e microorganismos para geração de bens ou serviços. Na área de saúde, produtos importantes como o interferon e a insulina são apenas alguns exemplos da potencialidade do uso de agentes biológicos na solução de problemas do Homem. Na agricultura, as técnicas biotecnológicas apresentam grande potencial no aumento da produtividade das culturas. Nas últimas décadas, isso foi conseguido mediante o uso de fertilizantes, irrigação, controle fitossanitário, herbicidas, mecanização e desenvolvimento de variedades melhoradas e condicionadas, em geral, ao uso de insumos. Todas estas práticas envolvem altos custos, impossibilitando sua adoção generalizada em países subdesenvolvidos. É necessário utilizar as recentes inovações biotecnológicas para desenvolver genótipos adaptados às condições adversas do meio, como solos de baixa fertilidade, e mais resistentes a pragas e doenças. Utilizar, também, métodos que nos possibilitem economia de insumos, mediante o uso de *Rhizobium*, por exemplo, na fixação simbiótica de nitrogênio, e de micorrizas para melhor aproveitamento do fósforo do solo pelas plantas.

Uma das estratégias para atingir tais objetivos é o uso da técnica de cultura de tecidos, que tem sido um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus e de outros patógenos, na propagação clonal rápida, no desenvolvimento de variedades melhoradas, na preservação de gemoplasma e no melhor entendimento dos princípios básicos relacionados com a fisiologia, bioquímica e desenvolvimento das plantas.

OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS

As doenças estão entre os principais fatores responsáveis pela redução da produtividade das culturas. Isto é bastante evidente em plantas propagadas pelos métodos assexuais convencionais (estaquia, garfagem, tubérculos, bulbos e outras estruturas vegetativas) que, em geral, estão infectadas por uma ou mais viroses. Portanto, o processo de recuperação e estabelecimento de plantas livres de patógenos é importante. Um exemplo prático é o da cultura da batata, cuja produção pode ser aumentada de 25 a 30% em plantações originadas de tubérculos livres de vírus. A eliminação de viroses mediante cultura de tecidos é baseada

na premissa de que a concentração do vírus decresce, progressivamente, no corpo da planta com o decréscimo do estágio de desenvolvimento das folhas, chegando a ser nula no ápice vegetativo. Da excisão e cultura de partes da planta, presumidamente não infectadas com viroses, e posterior regeneração *in vitro*, normalmente resultam plantas livres de vírus. Este processo está estabelecido para um grande número de espécies, bastando apenas aplicá-lo corretamente.

PROPAGAÇÃO CLONAL RÁPIDA

Este método tem como principal objetivo a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo. É uma técnica bastante eficiente, e as plantas produzidas são, em geral, livres da maioria das doenças. O explante inicial pode ser retirado de várias partes da planta, embora as mais usadas sejam gemas caulinares apicais e gemas laterais. Após a desinfestação, os explantes são introduzidos em frascos contendo meio de cultivo, o que provoca a diferenciação de brotações que, após seu desenvolvimento, são separadas individualmente e transferidas para um meio de cultivo da mesma composição, quando o objetivo for a indução e diferenciação de novas brotações, ou são colocados em meio nutritivo que permita a formação e desenvolvimento do sistema radicular, formando assim uma planta.

Um inconveniente a ser considerado é o aparecimento de variantes somaclonais. Com prática e experiência é possível manter a incidência destes em nível baixo.

Esta técnica, no futuro, também tem a potencialidade de ser estendida à cultura de células, para obtenção de embriões assexuais que, após encapsulados, podem ser manipulados à semelhança de sementes.

DESENVOLVIMENTO DE VARIEDADES MELHORADAS

A tecnologia de manipulação de células, tecidos e órgãos *in vitro* é promissora para o melhoramento genético das plantas. Variantes somaclonais, neste caso, são de grande significância para obtenção de cultivares com características agronômicas superiores, como tolerância a doenças, a herbicidas, à salinidade e à seca, qualidades essas que podem ser aliadas a um alto valor nutricional. No Havaí, uma das variedades comerciais de cana-de-açúcar resistente ao vírus do Mosaico foi selecionada mediante o uso das técnicas de cultivo *in vitro*. Em outros trabalhos realizados nos EUA, variantes de tomate, mais produtivas, com maior tamanho de fruto e porcentagem de sólidos solúveis, foram obtidas a partir de cultura de explantes foliares. Na China, os programas de melhoramento genético de arroz e do trigo foram bastante simplificados pela utilização de haplóides. Isto possibilitou a criação de mais de 80 variedades comerciais da primeira espécie e mais de 20 da segunda, até o presente.

¹ Eng.º-agr.º, Ph.D., Fisiologia Vegetal, EMBRAPA/CNP Hortaliças, C.P. 07.0218, 70359 Brasília, DF.

A cultura de protoplastos, embriões, óvulos, ovários e a polinização *in vitro* são técnicas alternativas que podem ser usadas na recuperação de híbridos raros, em situações onde ocorrem mecanismos de incompatibilidade sexual, que impedem o desenvolvimento normal de sementes. Isto possibilitaria a transferência de genes desejáveis, presentes em espécies silvestres, para espécies cultivadas.

As técnicas de biologia molecular e engenharia genéti-

ca parecem ser as grandes promessas do futuro, para o melhoramento genético das plantas. Entretanto, qualquer previsão, agora, sobre onde se poderá chegar com tais métodos, não passa de mera especulação.

Somente um trabalho integrado de todos os segmentos dos métodos *in vitro* possibilitará avanços significativos na criação de genótipos superiores, que poderão atender à crescente demanda de alimentos em nosso País.

CULTURA DE TECIDOS

CULTURA DE OVÁRIOS IN VITRO

Antonio Carlos Torres¹

ABSTRACT - Culturing of excised ovaries began with La Rue in 1942. Nitsch (1951) improved the procedure and succeeded in obtaining development of tomato and gherkin fruits **in vitro**. Ovary cultures have now been reported for nearly 40 species. The growth patterns of fruits **in vitro** and **in vivo** have been essentially the same; however, the final size of fruits raised **in vitro** have been usually smaller than those obtained **in vivo**. Viable seeds have been obtainable in some ovary cultures. Most plant species have required for ovary growth **in vitro** a nutrient medium that contains mineral salts, vitamins and sugar. Currently, there is very little research activity with ovary culture, as compared with other aspects of plant tissue culture.

INTRODUÇÃO

O interesse pela cultura de flores **in vitro** iniciou-se com os trabalhos de La Rue (1942). Ele cultivou flores de 92 espécies de angiospermas e observou, em alguns casos, o crescimento dos ovários e o enraizamento do pedicelo. Na Tabela 1 são listadas referências sobre cultura de pistilo e ovários. Revisões sobre o assunto foram publicadas por Rangan (1982) e Yang & Zhou (1982).

IMPORTÂNCIA

A cultura de flores **in vitro** fornece um sistema controlado para estudar aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento de frutos (Nitsch 1963, Johri & Sehgal 1963 e Rangan 1982) e formação de sementes (Johri & Guha 1963). A esta vantagem juntam-se as utilizações deste método no melhoramento de plantas, que não podem ser obtidas pelos processos normais de cruzamento, na indução de haplóides partenocárpicos e no contorno de problema de abscisão das flores antes que a fertilização ocorra.

PARÂMETROS QUE AFETAM A CULTURA DE OVÁRIOS ISOLADOS

de

1. Desinfestação do explante

A desinfestação consiste na remoção de organismos superficialmente associados com o tecido. Várias formulações químicas podem ser usadas para esta finalidade. A escolha do agente desinfestante e a duração do tratamento varia com o grau de infestação e a sensibilidade do tecido (Yeoman & MacLeod 1977). A Tabela 2 lista os reagentes mais comuns e o tempo de contato na desinfestação de explantes de ovários.

2. Estádio de desenvolvimento do explante

O ótimo estágio para o excisão dos ovários varia com a espécie de planta e o objetivo do trabalho.

Nitsch (1951) observou que ovários de *Cucumis anguria* excisados 4-5 dias após a polinização produziram sementes com 6 a 7% de poder germinativo. Entretanto, ovários isolados 3 dias após a polinização produziram sementes inviáveis e aqueles inoculados mais cedo não formaram sementes. Em *Lycopersicon esculentum*, frutos partenocárpicos foram desenvolvidos **in vitro** a partir de ovários isolados 2 dias antes da antese, na antese e 2 a 4 dias após a antese (Nitsch 1951). Sementes viáveis de *Anethum graveolens*, *Trachyspermum ammi* e *Foeniculum vulgare* foram obtidas em cultura de ovários inoculados, respectivamente, aos 3, 6 e 7 dias após a polinização (Johri & Sehgal 1966). Inomata (1968) conseguiu recuperar sementes híbridas do cruzamento entre duas espécies incompatíveis, *Brassica chinensis* x *B. pekinensis*, mediante a utilização da técnica de cultura de ovários excisados 4 dias após a polinização. Crescimento e maturação **in vitro** de frutos de *Prunus cerasus* foram observados a partir de ovários inoculados 45 dias após a floração (Wittenbach & Bukovac 1980).

3. Partes florais

O crescimento dos frutos e a formação de sementes **in vitro** podem ser beneficiados pela preservação do cálice ou brácteas, por ocasião da inoculação dos ovários. Provavelmente, estas duas estruturas são fontes de compostos nitrogenados essenciais (Nitsch 1963, Guha & Johri 1966). Desta forma, ovários de *Iberis amara*, cultivados aos 1, 2 e 4 dias após a polinização, produziram frutos normais somente quando o cálice foi deixado intacto (Maheshwari & Lal 1961). Em trabalho realizado com *Hyoscyamus niger* (Bajaj 1966), ovários excisados 3 dias após a polinização produziram frutos normais apenas quando o cálice não era removido na ocasião da inoculação. Em *Nicotiana tabacum*, pistilos cultivados desprovidos de cálice desenvolveram

¹ Eng.^o-agr.^o, Ph.D. Fisiologia Vegetal, EMBRAPA/CNP Hortaliças, C.P. 07.0218, 70359 Brasília, DF.

TABELA 1. Plantas em que a cultura de ovário já foi relatada.

Espécies de plantas	Referências
<i>Aerva tomentosa</i>	Murgai (1959)
<i>Allium cepa</i>	Guha (1962), Johri & Guha (1963), Guha & Johri (1966)
<i>Althaea rosea</i>	Chopra (1962)
<i>Ammi majus</i>	Sehgal (1972)
<i>Anethum graveolens</i>	Johri & Sehgal (1963, 1966)
<i>Antirrhinum majus</i>	Usha (1965), Balatkova & Tupy (1973)
<i>Brassica pekinensis</i> x <i>Brassica chinensis</i>	Inomata (1968)
<i>Brassica campestris</i>	Inomata (1976)
<i>Citrus aurantifolia</i>	Mitra & Chaturvedi (1972)
<i>C. sinensis</i>	Mitra & Chaturvedi (1972), Gülsen et al. (1981)
<i>C. maxima</i>	Mitra & Chaturvedi (1972)
<i>C. lemon</i>	Gülsen et al. (1981)
<i>Chrysanthemum</i> spp.	Watanabe (1977)
<i>Cucumis anguria</i>	Nitsch (1951)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Johri & Sehgal (1966)
<i>Fragaria ananassa</i>	Bajaj & Collins (1968)
<i>F. chiloensis</i> x <i>F. virginiana</i>	De Capite (1955)
<i>Glycine max</i>	Obendorf et al. (1983)
<i>Haworthia turgida</i>	Majumbar (1970)
<i>Hordeum vulgare</i>	La Croix et al. (1962)
<i>Hyoscyamus niger</i>	Bajaj (1966)
<i>Iberis amara</i>	Maheshwari & Lal (1961)
<i>Linaria maroccana</i>	Sachar & Baldev (1958)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nitsch (1949a, 1949b, 1951, 1963), Kano (1962)
<i>L. peruvianum</i>	Torres (1984)
<i>L. pimpinelifolium</i>	Jansen & Bonner (1949)
<i>Nicotiana rustica</i>	Rao (1965), Rao & Rangaswamy (1972)
<i>N. tabacum</i>	Dulieu (1963, 1966), McHugen (1982)
<i>Oryza sativa</i>	Nishi & Mitsuoka (1969), Beauville (1980), Chang & Hong-Yuan (1981)
<i>Paspalum alium</i>	Bovo & Quarín (1983)
<i>Pelargonium</i> x <i>domesticum</i>	Dodd (1983)
<i>Petunia violacea</i>	Shivanna (1965)
<i>Phlox drummondii</i>	Rau (1956)
<i>Pisum sativum</i>	De Capite (1955), Baldev et al. (1965), Hahn et al. (1974), Krechting et al. (1978)
<i>Prunus cerasus</i>	Wittenbach & Bukovac (1980)
<i>Ranunculus sceleratus</i>	Sachar & Guha (1962)
<i>Trachyspermum ammi</i>	Johri & Sehgal (1966)
<i>Trifolium repens</i>	Richards & Rupert (1980)
<i>T. umbiguum</i>	Richards & Rupert (1980)
<i>Triticum aestivum</i>	Rédei & Rédei (1955), Donovan & Lee (1977)
<i>T. spelta</i>	Rédei & Rédei (1955)
<i>Tropaeolum majus</i>	Sachar & Kanta (1958)
<i>Zea mays</i>	Sladky & Havel (1976), Gengenbach (1977), Dhaliwal & King (1978), Havel & Novák (1981)

frutos de tamanho menor e com poucas sementes, quando comparados com aqueles cultivados com cálice intacto.

Entretanto, a integridade do cálice e outras partes florais parecem não ser regra geral. Crescimento de frutos e desenvolvimento de sementes *in vitro* têm sido observados em cultura de ovários de *Nicotiana tabacum* (Dulieu 1966) e *Pisum sativum* (Hahn et al. 1974), desprovidos de cálice.

4. Constituintes do meio de cultivo

Em algumas espécies de plantas, por exemplo: *Cucumis anguria* (Nitsch 1951), *Tropaeolum majus* (Sachar & Kanta 1958), *Iberis amara* (Maheshwari & Lal 1961) e *Nicotiana tabacum* (Dulieu 1966), o desenvolvimento de frutos *in vitro* ocorre em um meio nutritivo simples, com-

TABELA 2. Reagentes e período de exposição empregados na desinfestação de explantes de ovários.

Espécies de plantas	Desinfetantes	Tempo (min.)	Referências
<i>Allium cepa</i>	Água clorada	5-10	Guha (1962)
<i>Anethum graveolens</i>	Água clorada	7-10	Johri & Sehgal (1966)
<i>Chrysanthemum species</i>	Hipoclorito de sódio 10%	10	Watanabe (1977)
<i>Citrus lemon</i>	Hipoclorito de cálcio 9%	30	Gülşen et al. (1981)
<i>Citrus sinensis</i>	Hipoclorito de cálcio 9%	30	Gülşen et al. (1981)
<i>Fragaria ananassa</i>	Água clorada 5%	5	Bajaj & Collins (1968)
<i>Glycine max</i>	Hipoclorito de cálcio 10%	20	Obendorf et al. (1983)
<i>Iberis amara</i>	Hipoclorito de cálcio 10%	20	Maheshwari & Lal (1961)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hipoclorito de cálcio 5%	10	Nitsch (1951)
<i>Oryza sativa</i>	Cloreto de mercúrio 0,1%	12	Chang & Hong-Yuan (1981)

posto de sais minerais, vitaminas e açúcar. Em outras espécies, *Lycopersicon esculentum* (Nitsch 1949a,b e 1951, Kano 1962), *Aerva tormentosa* (Murgai 1959), *Anethum graveolens* (Johri & Sehgal 1963), *Hyoscyamus niger* (Bajaj 1966) e *Allium cepa* (Johri & Guha 1963) é necessário um meio mais complexo, contendo, além dos componentes descritos, substâncias reguladoras de crescimento, extrato de frutos e outros suplementos.

Em geral, a formulação salina de Murashige & Skoog (1962) é usada como ingrediente básico na maioria dos trabalhos de cultura de ovário.

a) Nitrogênio

É um componente do meio básico, geralmente suplementado na forma de nitrato (Nitsch 1951, De Capite 1955, Rau 1956 e Sachar & Kanta 1958) ou nitrato de amônio (Nishi & Mitsuoka 1969, Gengenbach 1977, Kano & Asashira 1978). Nitrogênio adicionado na forma de cloreto de amônio e uréia tem efeito inibitório. O crescimento dos frutos *in vitro* é limitado quando o meio é desprovido de nitrogênio.

b) Ferro

Niimi (1974) comparou o efeito de NaFeEDTA e citrato férrico no desenvolvimento *in vitro* de ovários de *Petunia hybrida*. O desenvolvimento dos óvulos era normal em meio contendo NaFeEDTA, e abortavam em meio suplementado com citrato férrico.

c) Hidrato de carbono

É um componente indispensável à cultura de ovários. Sacarose é, em geral, a fonte de carbono usada. A concen-

tração varia entre 2 e 12%. A sacarose foi ótima na concentração de 2% para o desenvolvimento de ovários de *Triticum aestivum* (Donavan & Lee 1977); 3%, para formação de sementes viáveis em *Fragaria ananassa* (Bajaj & Collins 1968), *Chrysanthemum* (Watanabe 1977) e *Trifolium repens* (Richards & Rupert 1980); 4%, para o cultivo de ovários de *Nicotiana rustica* (Rao & Rangaswamy 1972), *Hyoscyamus niger* (Bajaj 1966) e *Pisum sativum* (Srivastava et al. 1980); e 12%, para o crescimento máximo de frutos de *Lycopersicon esculentum* (Torres 1984).

A maneira pela qual o meio de cultivo contendo açúcar é esterilizado tem efeito no crescimento subsequente dos ovários. Johri & Guha (1963), em trabalho com cultura de ovários de *Allium cepa*, comprovaram o efeito da autoclavagem e esterilização a frio de meios nutritivos contendo, respectivamente, L - arabinose, celobiose, D - dextrose, D - galactose, lactose, D - levulose, maltose, D - manose, D - melibiose, rafinose, L - ranose, L - sorbose, sacarose e xilose. Os meios autoclavados foram os que promoveram um melhor crescimento dos frutos *in vitro*. A sacarose foi o açúcar mais efetivo na promoção do crescimento de fruto e da formação de sementes. Ball (1953) e Street (1957) sugerem que durante a autoclavagem a sacarose é hidrolizada, o que favorece melhor o crescimento dos tecidos.

d) Vitaminas

A adição de vitaminas ao meio de culturas tem sido uma prática geral em cultura de ovários. A mistura das vitaminas de White (1954) e glicina, modificada nas concentrações dos componentes individuais, tem sido frequentemente empregada (Sachar & Kanta 1958, Maheshwari & Lal 1961, Bajaj & Collins (1968). Entretanto, a suplementação com vitaminas não se faz necessária para culturas de ovários de *Phlox drummondii* (Rau 1956), *Allium sativum* (Guha & Johri 1966) e *Antirrhinum majus* (Balatkova & Tupy 1973).

e) Substâncias reguladoras de crescimento

A resposta à suplementação do meio nutritivo com substâncias reguladoras de crescimento depende da espécie. Exemplos de plantas cujos ovários são capazes de se desenvolverem em meio desprovido de hormônios são: *Linaria maroccana* (Sachar & Baldev 1958), *Tropaeolum majus* (Sachar & Kanta 1958), *Althaea rosea* (Chopra 1962), *Nicotiana tabacum* (Dulieu 1963), *Petunia violacea* (Shivanna (1965) e *Antirrhinum majus* (Balatkova & Tupy 1973).

Em *Iberis amara*, a incorporação ao meio nutritivo de 5 mg/ml de AIA proporcionou crescimento máximo do ovário e desenvolvimento normal do embrião. Substituição do AIA por 2,4-D inibiu o desenvolvimento do embrião (Maheshwari & Lal 1961). Frutos partenocárpicos de *Lycopersicon esculentum* foram obtidos pela cultura de ovários não-polinizados, em meio suplementado com ácido nafto-xiacético (Nitsch 1951) ou 2,4-D (Kano 1962). A inclusão de GA₃, AIA e cinetina no meio de cultivo inibiu o desenvolvimento de embriões em ovários de *Althaea rosea* (Chopra 1962). Crescimento máximo de frutos de *Anethum graveolens*, maiores que os produzidos in natura, foram obtidos in vitro suplementando o meio nutritivo com cinetina a 0,1 mg/l (Johri & Sehgal 1963).

f) Substâncias complexas

Caseína hidrolizada, água de coco, extrato de malte e suco de frutos têm sido adicionados aos meios de cultivo para promover maior crescimento dos frutos e desenvolvimento de sementes em cultura de ovários de algumas espécies.

g) Condições de incubação

Temperatura

Em geral, temperaturas entre 20 e 30°C têm sido adequadas para cultura de ovários. Temperatura constante de 25°C foi satisfatória para cultura de ovários de *Anethum graveolens* (Johri & Sehgal 1963), *Haworthia turgida* (Majumbar 1970), *Zea mays* (Uchimiya et al. 1971), *Antirrhinum majus* (Balatkova & Tupy 1973). Em *Lycopersicon esculentum*, frutos partenocárpicos foram obtidos mediante cultura de ovários no regime de temperatura diurna/noturna de 27/17°C, respectivamente (Nitsch 1951).

Luz

Inomata (1976) obteve maior produção de sementes de *Brassica campestris* spp. *chinensis* em cultura de ovários expostos à baixa intensidade luminosa (300-500 lux). Luz difusa de 100 a 2.000 lux de intensidade foi usada na cultura de ovários de *Hyoscyamus niger* (Bajaj 1966) e *Fragaria*

ananassa (Bajaj & Collins 1968). Em geral, intensidade luminosa de 1.000 lux tem sido adequada para cultura de ovários de diversas espécies.

REFERÊNCIAS

- BAJAJ, Y.S.P. Growth of *Hyoscyamus niger* ovaries in culture. *Phyton*, 23:57-62, 1966.
- BAJAJ, Y.S.P. & COLLINS, W.B. Some factors affecting the in vitro development of strawberry fruits. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 93:326-33, 1968.
- BALATKOVA, V. & TUPY, J. The significance of the methods of stigmatal and placental pollination in vitro in *Antirrhinum majus* L.; seed and callus formation on placentae. *Biol. Plant.*, 15:102-6, 1973.
- BALDEV, B.; LANG, A. & AGATEP, O. Gibberellin production in pea seeds developing in excised pods; effect of growth retardant AMO-1618. *Science*, 147:115-56, 1965.
- BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissue. *Bull. Torrey Bot. Club.*, 80:409-11, 1953.
- BEAUVILLE, M.A. Obtention d'haploides in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz, *Oryza sativa* L. C.R. Acad. Sci. Paris, 290:489-92, 1980.
- BOVO, A.O. & QUARIN, C.L. Obtención de plantas de *Paspalum alium* (Gramineae) a partir del cultivo in vitro de ovarios jóvenes. *Phyton*, 43:29-34, 1983.
- CHANG, Z. & HONG-YUAN, Y. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. *Plant Sci. Lett.*, 20:231-7, 1981.
- CHOPRA, R.N. Effect of some growth substances and calyx on fruit and seed development in *Althaea rosea* Cav. In: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH, ed. *Plant embryology; a symposium*. New Delhi, 1962. p.170-81.
- DE CAPITE, L. La coltura dei frutti in vitro da fiori recise di *Fragaria chiloensis* Ehrh. x *F. virginica* Duch., var. Marshall e di *Pisum sativum* L. var. Zelka. *Ric. Sci.*, 25:532-8, 1955.
- DHALIWAL, S. & KING, P.J. Direct pollination of *Zea mays* ovules in vitro with *Z. mays mexicana* and *Sorghum bicolor* pollens. *Theor. Appl. Genet.*, 53:43-6, 1978.
- DODD, J.B. In vitro pollination of selected *Pelargonium x hortorum* Bailey and *Pelargonium x domesticum* Bailey genotypes. Ames, Iowa State University. 1983. 80p. Tese Mestrado.
- DONOVAN, G.R. & LEE, J.W. The growth of detached wheat heads in liquid culture. *Plant Sci. Lett.*, 9:107-13, 1977.
- DULIEU, H.L. Sur la fecondation in vitro chez le *Nicotiana tabacum* L. C.R. Acad. Sci. Paris, 256:3344-6, 1977.

- DULIEU, H.L. Pollination of excised ovaries and culture of ovules of *Nicotiana tabacum* L. *Phytomorphology*, 16:69-75, 1966.
- GENGENBACH, B.G. Development of maize caryopses resulting from *in vitro* pollination. *Planta*, 134:91-3, 1977.
- GUHA, S. *In vitro* production of onion seeds. In: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH, ed. *Plant embryology*; a symposium. New Delhi, 1962. p.182-7.
- GUHA, S. & JOHRI, B.M. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. *Phytomorphology*, 16:353-64, 1966.
- GÜLSEN, Y.; ALTMAN, A. & GÖREN, R. Growth and development of *Citrus* pistils and fruit explants *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 53:295-300, 1981.
- HAHN, H.; ZACKS, R. & KENDE, H. Cytokinin formation in pea seeds. *Naturwiss.*, 61:170, 1974.
- HAVEL, L. & NOVÁK, F.J. *In vitro* pollination of maize (*Zea mays* L.); proof of double fertilization. *Plant Cell Rep.*, 1:26-8, 1981.
- INOMATA, N. *In vitro* culture of ovaries of *Brassica* hybrids between 2x and 4x. I. Culture medium. *Jap. J. Breed.*, 18:139-48, 1968.
- INOMATA, N. Culture *in vitro* of excised ovaries in *Brassica campestris* L. I. Development of excised ovaries in culture media, temperature and light. *Jap. J. Breed.*, 26:229-36, 1976.
- JANSEN, L.L. & BONNER, J. Development of fruits from excised flowers in sterile culture. *Am. J. Bot.*, 36:826, 1949.
- JOHRI, B.M. & GUHA, S. *In vitro* development of onion plants from flowers. In: MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S., ed. *Plant tissue and organ culture*; a symposium. Ranchi, Catholic Press, 1963. p.215-23.
- JOHRI, B.M. & SEHGAL, C.B. Chemical induction of polyembryony in *Anethum graveolens* L. *Naturwiss.*, 50:47-8, 1963a.
- JOHRI, B.M. & SEHGAL, C.B. Growth of ovaries of *Anethum graveolens* L. In: MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S., ed. *Plant tissue and organ culture*; a symposium. Ranchi, Catholic Press, 1963b. p.245-56.
- JOHRI, B.M. & SEHGAL, C.B. Growth responses of ovaries of *Anethum*, *Foeniculum* and *Trachyspermum*. *Phytomorphology*, 16:364-78, 1966.
- KANO, K. *In vitro* culture of tomato ovaries. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.*, 31:197-206, 1962.
- KANO, T. & ASASHIRA, T. Effects of some plant growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.*, 47:195-202, 1978.
- KRECHTING, H.C.J.M.; VARGA, A. & BRINSMA, J. Absence of cytokinin biosynthesis in pea seeds developing *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 87:91-3, 1978.
- LA CROIX, L.J.; NAYLOR, J. & LARTER, F.N. Factors controlling embryo growth and development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Can. J. Bot.*, 40:1515-23, 1962.
- LA RUE, C.D. The rooting of flowers in sterile culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 69:332-41, 1942.
- MAHESHWARI, N. & LAL, M. *In vitro* culture of ovaries of *Iberis amara* L. *Phytomorphology*, 11:17-23, 1961.
- MAJUMBAR, S.K. Production of plantlets from the ovary wall of *Haworthia turgida* var. *pallidifolia*. *Planta*, 90:212-4, 1970.
- McHUGEN, A. Some aspects of growth characteristics of tobacco pistils *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 162-9, 1982.
- MITRA, G.C. & CHATURVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vitro* growth emasculated flower buds of *Citrus* spp. *Bull. Torrey Bot. Club*, 99:184-9, 1972.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15:473-97, 1962.
- MURGAI, P. *In vitro* culture of the inflorescence flowers and ovaries of an apomitic *Aerva tomentosa* Forsk. *Nature*, 184:72-3, 1959.
- NIIMI, Y. Effect of Fe-EDTA on the development of isolated ovules of *Petunia hybrida*. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 43:77-83, 1974.
- NISHI, T. & MITSUOKA, S. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. *Jap. J. Genet.*, 44:341-6, 1969.
- NITSCH, J.P. Culture of fruits *in vitro*. *Science*, 110:449, 1949a.
- NITSCH, J.P. Obtention de fruits charnus en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 229:445-6, 1949b.
- NITSCH, J.P. Growth and development of excised ovaries. *Amer. J. Bot.*, 38:556-77, 1951.
- NITSCH, J.P. The *in vitro* culture of flowers and fruits. In: MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S., ed. *Plant tissue and organ culture*; a symposium. Ranchi, Catholic Press, 1963. p.198-214.
- OBENDORF, R.L.; RYTKO, G.T. & BYRNE, M.C. Soya bean seed growth and maturation by *in vitro* pod culture. *Ann. Bot.*, 51:217-27, 1983.
- RANGAN, T.S. Ovary, ovule and nucellus culture. In: JOHRI, B.M., ed. *Experimental embryology of vascular plants*. Berlin, Springer-Verlag, 1982. p.105-29.
- RAO, P.S. The *in vitro* fertilization and seed formation in *Nicotiana rustica* L. *Phyton*, 22:165-7, 1965.
- RAO, P.S. & RANGASWAMY, N.S. *In vitro* development of the pollinated pistils of *Nicotiana rustica* L. *Bot. Gaz.*, 133:350-5, 1972.
- RAU, M.A. Studies in the growth *in vitro* of excised ovaries. I. Influence of colchicine on the embryo and endosperm in *Phlox drummondii* Hock. *Phytomorphology*, 6:90-6, 1956.

- RÉDEI, G. & RÉDEI, C. Rearing wheats from ovaries cultured in vitro. *Acta Bot.*, 2:183-6, 1955.
- RICHARDS, K.W. & RUPERT, E.A. In vitro fertilization and seed development in *Trifolium*. *In Vitro*, 16:925-31, 1980.
- SACHAR, R.C. & BALDEV, B. In vitro culture of ovaries of *Linaria maroccana* Hook. *Curr. Sci.*, 27:104-5, 1958.
- SACHAR, R.C. & GUHA, S. In vitro growth of achenes of *Ranunculus sceleratus* L. In: COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH, ed. *Plant embryology*; a symposium. Poona, 1962. p.224-53.
- SACHAR, R.C. & KANTA, K. Influence of growth substances on artificially cultured ovaries of *Tropaeolum majus* L. *Phytomorphology*, 8:202-18, 1958.
- SEHGAL, C.B. In vitro induction of polyembryony in *Ammi majus* L. *Curr. Sci.*, 41:263-4, 1972.
- SHIVANNA, K.R. In vitro fertilization and seed formation in *Petunia violacea* Lindl. *Phytomorphology*, 15:183-5, 1965.
- SLADKY, Z. & HAVEL, L. The study of the conditions for the fertilization in vitro in maize. *Biol. Plant.*, 18:469-72, 1976.
- SRIVASTAVA, P.S.; VARGA, A. & BRUINSMA, J. Growth in vitro of fertilized ovules of pea, *Pisum sativum* L., with and without pods. *Z. Pflanzenphysiol.*, 98:347-54, 1980.
- STREET, H.E. Nutrition and metabolism of plant tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19:467-85, 1957.
- TORRES, A.C. In vitro culture of ovaries of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) Mill. Riverside, University of California, 1984. 155p. Tese Ph.D.
- UCHIMIYA, H.; KAMEYA, T. & TAKAHASHI, N. In vitro culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and ovaries in *Zea mays*. *Jap. J. Breed.*, 21:247-50, 1971.
- USHA, S.V. In vitro pollination in *Antirrhinum majus* L. *Curr. Sci.*, 34:511-3, 1965.
- WATANABE, K. Successful ovary culture and production of F₁ hybrids and androgenic haploids in Japanese *Chrysanthemum* species. *J. Hered.*, 68:317-20, 1977.
- WHITE, P.R. The cultivation of animals and plant cells. 2.ed. New York, Ronald Press, 1954.
- WITTENBACH, V.A. & BUKOVAC, M.J. In vitro culture of sour cherry fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105:277-9, 1980.
- YANG, H.Y. & ZHOU, C. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor. Appl. Genetics*, 63:97-104, 1982.
- YEOMAN, M.M. & MACLEOD, A.J. Tissue (callus) culture-techniques. In: STREET, H.E., ed. *Plant tissue and cell culture*. Berkeley, University of California Press, 1977. p.31-59.

PROPAGAÇÃO DE COUVE-FLOR IN VITRO

Antonio Carlos Torres¹
José de Almeida Souza²

ABSTRACT - Explants of about 4 mm in length taken from the surface of the marketable curd of cauliflower were cultured on medium composed of Murashige and Skoog salts, 3% sucrose, and in mg/l: i - inositol, 100; thiamine . HCl, 1,0; pyridoxine . HCl, 0,5; nicotinic acid, 0,5; glycine, 2; kinetin, 1,0; indole -3- butiric acid, 4,0; and agar, 8,000. The pH of the medium was set at 5,7. The cultures were illuminated 16 hr per day with 1,000 lux cold white light and exposed to a constant temperature of 27°C. Under these conditions shoots were obtained within 30 days.

INTRODUÇÃO

O uso de híbridos de Brássicas no Brasil tem sido muito aumentado nos últimos anos. Atualmente, existem no mercado várias companhias competindo pela oferta de tais materiais. Há grande necessidade de procurar melhores híbridos, daí a necessidade de se trabalhar com maior número possível de linhagens para aumentar a probabilidade de obter as melhores combinações.

Pelo processo normal de obtenção de linhagens parentais homozigotas para o gen S, que confere a auto-incompatibilidade em Brássicas, normalmente levaria de 4 a 5 anos. Primeiramente, deve-se proceder à: identificação de plantas auto-incompatíveis na geração So; obtenção e reconhecimento de plantas homozigotas para os gens da série S nas gerações subseqüentes; multiplicação da população de plantas auto-incompatíveis; e produção de híbridos F₁ entre as linhagens (Ikuta 1969).

A estabilização das linhagens parentais dos híbridos requer, sucessivamente, várias autofecundações. Por outro lado, sua manutenção exige polinização manual das flores no estágio de botão floral. Este procedimento leva as plantas a uma rápida endogamia, a qual se manifesta de várias formas, sendo uma delas a perda da capacidade reprodutiva das linhagens.

Mediante o uso das técnicas de cultura de tecidos, poder-se-ia manter indefinidamente linhagens de híbridos, contornando assim os problemas da endogamia e eliminando também a trabalhosa tarefa de autopolinização manual dos botões florais para a manutenção das mesmas (Crisp & Walkey 1974; Anderson & Cartens 1977; Torres et al. 1978).

DIFERENCIAÇÃO DE PARTE AÉREA

Plantas de couve-flor, variedade Piracicaba Precoce, em estágio de colheita, foram utilizadas como fonte de explantes. Estes, de 3 a 4 mm de comprimento, retirados da superfície da cabeça, foram desinfestados em solução de hipoclorito de cálcio a 2%, durante 10 minutos, e em seguida lavados 3 vezes em água destilada esterilizada.

O meio nutritivo consistia em macro e microelementos de Murashige & Skoog (1962), 3% sacarose e em mg/l: i-inositol, 100; tiamina . HCl, 1,0; piridoxina . HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5; glicina, 2,0; ágar, 8.000; ácido 3-indolbutírico, 4,0; cinetina 1,0; com pH ajustado a 5,7 ± 0,1. O meio foi distribuído em quantidades de 25 ml por frasco de 130 ml. Os frascos foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados a 121°C e 1,05 kg/cm², durante 15 minutos.

A inoculação foi feita em capela de fluxo laminar introduzindo-se os explantes, individualmente, em cada frasco. Após inoculação, os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 1.000 lux, ciclo fotoperiódico 16 horas e temperatura de 27° ± 2°C constante.

OBTENÇÃO DE PLÂNTULA

Após diferenciação e desenvolvimento da parte aérea, repicaram-se, individualmente, porções apicais desta, de 2 a 3 cm de comprimento, para recipientes que continham meio de cultivo composto de sais minerais de Murashige & Skoog (1962), 3% sucrose e em mg/l: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl 0,5; ácido nicotínico, 0,5; glicina, 2,0; ágar, 8.000; e ácido 3-indolbutírico, 3. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1. Após a inoculação, o material foi incubado nas mesmas condições descritas acima.

¹ Eng^o-agr^o, Ph.D., Fisiologia Vegetal, EMBRAPA/CNP Hortaliças, C.P. 07.0218, 70359 Brasília, DF.

² Laboratorista, EMBRAPA/CNP Hortaliças.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.E. & CARTENS, J.B. Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleracea* (Italica Group), for use in F₁ hybrid seed production. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 102:69-73, 1977.
- CRISP, P. & WALKEY, D.G.A. The use of aseptic meristem culture in cauliflora breeding. *Euphytica*, 23:305-13, 1974.
- IKUTA, H. Utilização da auto-incompatibilidade na variedade de couve-flor de verão 'Piracicaba Precoce n.^o 1', para produção de sementes híbridas F₁. *Relat. ci. Inst. Gen. ESALQ, Piracicaba*, 1969, p.153-74.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15:473-97, 1962.
- TORRES, A.C.; DELLA VECCHIA, P.T. & CALDAS, L.S. Propagação vegetativa de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* subvar. *cauliflora* D.C.) *in vitro* visando ao melhoramento de cultivares de verão. *R. Ceres*, 25:602-9, 1978.

PRODUÇÃO DE PLANTAS DE BATATA LIVRES DE VÍRUS

Ecilda Luci dos Santos Souza¹
José de Almeida Souza²

ABSTRACT - Since 1984 the National Vegetable Crop Research Center (CNPH/EMBRAPA) has been producing pre-basic potato seeds. Virus-free plants have been obtained through shoot tip culture techniques, and tested for X, Y, S and leaf-roll viruses. In the shoot tip cultures and rapid propagation MS medium supplemented with 0.5 mg/l of GA₃ has been used. Parts of the apical portion of the shoots are transferred to a medium consisting of MS salts supplemented with 0.05 mg/l of ANA, 0.05 mg/l of KIN, 0.2 mg/l of GA₃, and 0.6% of agar for enhancing the process of differentiation and development of the root system. The potato seed then obtained is delivered to EMBRAPA's Service of Basic Seed Production (SPSB) for multiplication.

INTRODUÇÃO

A batata é um alimento importante devido ao seu alto valor nutritivo, sendo rica em carboidratos, sais minerais, aminoácidos e vitaminas, e também pela eficiência de produção por unidade de área num curto espaço de tempo. No Brasil, a cultura da batata ainda não atingiu maior importância, devido principalmente a fatores como: elevado custo de produção; baixa produtividade; e necessidade de expansão para novas regiões ainda sem tradição com a mesma.

Na década de 50, teve início a produção de batata-semente, através do Projeto ETA n.º 10 e da Cooperativa Agrícola de Cotia. Somente em 1972, pelo acordo Brasil - Alemanha, foi criado um Centro de Multiplicação de Batata-semente, em Santa Catarina, atualmente sede da Gerência Local de Canoinhas, do Serviço de Produção de Sementes Básicas (SPSB) da EMBRAPA.

Em 1973/74, foram importadas 673 mil caixas, decrescendo para 250 mil no período de 1983/84.

A batata-semente certificada é produzida nos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais e São Paulo. Anualmente são plantados aproximadamente 200 mil hectares de batata para consumo, necessitando de 10 milhões de caixas. Em 1983 o Brasil produziu 70% dessa necessidade, importou 2,5% e o restante da batata plantada foi de origem desconhecida. Dentre as principais doenças que justificam a importação, destacam-se a murcha bacteriana e as de origem virótica, que causam grandes perdas, como o vírus do enrolamento da folha (PLRV) e o vírus Y (PVY).

Até recentemente quase todos os testes de vírus em batata eram feitos visualmente, permitindo um alto índice de escape. Hoje, com o advento de técnicas como Látex e

ELISA, é possível testar rapidamente um grande número de amostras; bem como detectar concentrações muito baixas de vírus, as quais não seriam percebidas visualmente.

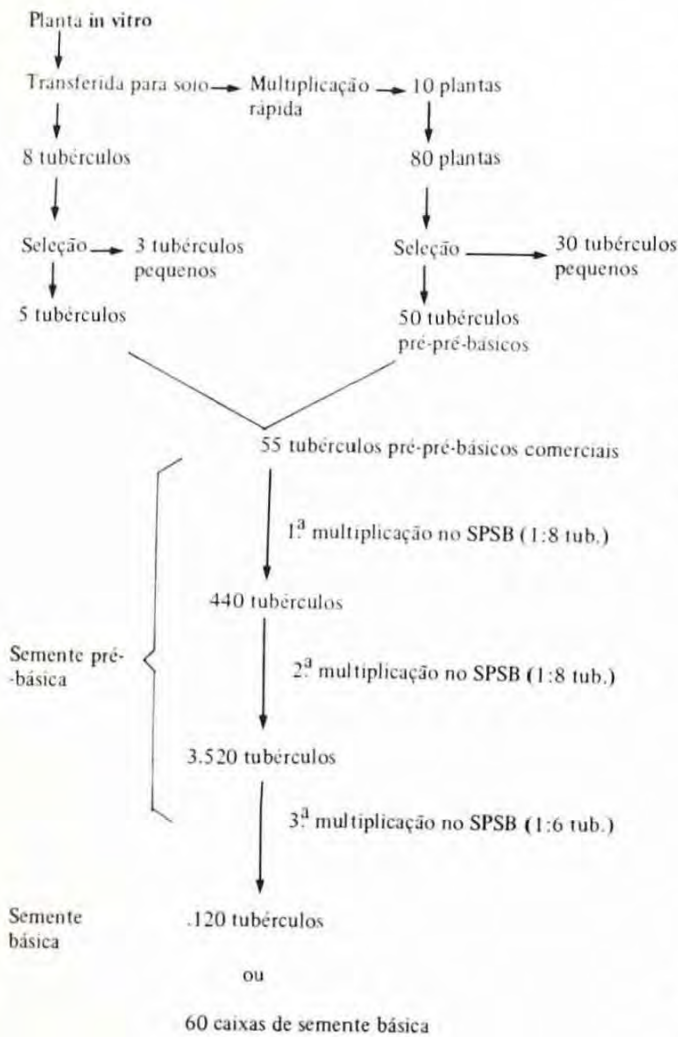
Para a obtenção de plantas sadias, a partir de material infectado, usa-se a cultura de meristemas, associada ou não à quimioterapia, ou à termoterapia.

Há aproximadamente quatro anos o Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH) vem trabalhando com a cultura de meristemas e indexação de plantas para a produção de lotes sadios de clones provenientes dos programas de melhoramento e, nos últimos dois anos, para a produção de batata-semente pré-pré-básica.

Inicialmente, o material a ser limpo é testado para os vírus X (PVX), Y (PVY), S (PVS), enrolamento da folha (PLRV) e para o viróide do broto afilado (PSTV). A seguir, é efetuada a cultura de meristemas, que consiste na retirada dos meristemas do ápice e dos brotos laterais em crescimento. Esses meristemas são inoculados em meio líquido, contendo macro e micronutrientes, segundo Murashige & Skoog (1962), acrescido de 3% de sacarose, vitaminas e 0,5 mg/l de ácido giberélico (GA₃), que constituem o meio n.º 1. Após a formação de uma pequena planta, a partir de cada meristema, esta é seccionada e transferida para outros meios: 1) O ápice da planta, contendo três a quatro gemas, é inoculado em meio contendo sais minerais de Murashige & Skoog, acrescido de 3% sacarose, vitaminas, 0,6% de ágar, 0,05 mg/l de ácido naftaleno acético, 0,05 mg/l de cinetina e 0,2 mg/l de ácido giberélico, que constituem o meio n.º 2; 2) O restante da planta é cortado em pequenos pedaços, contendo uma gema, e são inoculados em meio líquido (meio n.º 1). Ambos os tubos contêm o mesmo número de identificação. Quinze a vinte dias após, as plantas produzidas no meio sólido são testadas para os vírus X, Y, S e o enrolamento da folha. As plantas sadias são propagadas *in vitro* por multiplicação rápida (meio n.º 1) e enraizadas (meio n.º 2), e então transferidos para vasos, em casa de vegetação. Periodicamente, as plantas em casa de vegetação são inspecionadas e testadas por amostragem. Aí as plantas produzem, em média, oito tubérculos cada, dos quais cinco são de padrão comercial (semente pré-

¹ Eng.º-agr.º, M.Sc., Fitotecnia, EMBRAPA/CNP Hortaliças C.P. 07.0218, 70359 Brasília, DF.

² Laboratorista, EMBRAPA/CNP Hortaliças.



-pré-básica) e três menores, que são utilizados em nova multiplicação (Fig. 1).

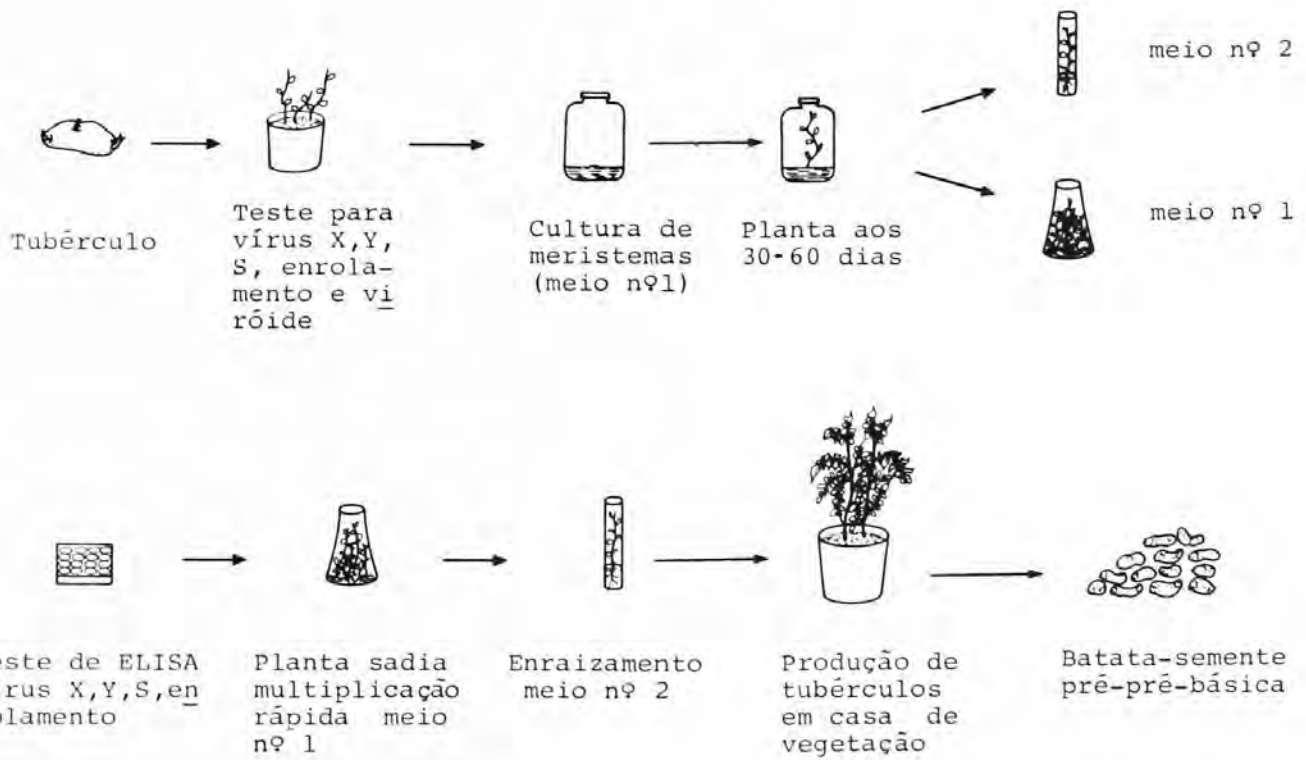
Além de multiplicação rápida, em larga escala, para a produção de plantas *in vitro*, utiliza-se também a multiplicação rápida, em casa de vegetação. A partir de uma planta produzida *in vitro* podem ser obtidas sessenta caixas de semente básica, num período de dois anos, de acordo com o seguinte esquema:

Em 1984/85, o CNPH enviou ao SPSB 29 mil tubérculos. Ao final de três multiplicações pelo SPSB, serão produzidos 11,136 milhões de tubérculos, o que representa cerca de 32 mil caixas. Considerando que no final do mês de setembro de 1985 uma caixa de batata-semente importada custará em média 16 dólares (um dólar= 10 mil cruzeiros), conclui-se que 32 mil caixas correspondem a uma economia de importação de 512 mil dólares ou 5 bilhões de cruzeiros.

REFERÊNCIAS

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15:473-97, 1962.

Figura 1.



CULTURA DE EMBRIÃO

Claudinei Andreoli¹

ABSTRACT - In this article, the different factors affecting *in vitro* embryo culture are reviewed. The practical applications and limitations of that technique are also discussed.

INTRODUÇÃO

O ponto marcante que expandiu o campo da cultura de embriões foi a descoberta de que estes poderiam ser separados dos tecidos maternos e de reserva, e cultivados assepticamente em substrato artificial. Hanning (1904) é considerado o pioneiro na cultura de embrião. Ele cultivou, *in vitro*, embriões relativamente maduros de *Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Cochlearia danica*, em meios salinos suplementados com açúcar. Suas observações forneceram respostas para a identificação dos fatores que controlam o crescimento de embriões cultivados. Por exemplo, a função do endosperma líquido, a necessidade de uma concentração de sacarose como fonte de energia, e um alto potencial osmótico no substrato, para crescimento dos embriões.

Subseqüentemente, avanços na técnica da cultura de embriões foram estendidos a várias espécies de planta. Knudson (1922) fez germinar embriões de orquídeas na ausência de fungo simbiótico, em meio de ágar contendo açúcar. O estímulo ao crescimento de embriões de orquídeas por um carboidrato simples sugere a função da micorriza na conversão de amido e de outros polissacarídeos em forma reduzida. A propagação não-simbiótica de orquídeas, em escala comercial, deve aos princípios deste experimento.

Dieterisch (1924) fez importantes observações nos estudos de fisiologia, crescimento e germinação de embriões. Embriões cultivados *in vitro*, usualmente não apresentam um período de repouso como ocorre em semente intacta. Além disso, foi constatado que no meio nutritivo de Knop, suplementado com 2,5-5% de sacarose, os embriões tornaram-se fisiologicamente maduros e germinaram normalmente. Porém, aqueles ainda imaturos germinaram diretamente para plântulas, divergindo dos estádios da embriogenia normal. Dieterisch introduziu o termo "Kunstuche Fruhgebrit" para expressar este tipo de crescimento, agora conhecido como germinação precoce em cultura de embrião. Salienta-se que este fenômeno é aplicado a algumas sementes (embriões) de espécies vivíparas, por exemplo: mutantes de *Zea mays* L., certas cultivares de *Triticum aestivum* L. e *Arachis hypogaea* L. Este aspecto de germinação precoce é discutido posteriormente.

As aplicações práticas das técnicas de cultura de embriões foram demonstradas nos trabalhos de Laibach (1925, 1929). Plântulas híbridas resultantes do cruzamento de *Linum perene* e *L. anstrianum* foram obtidas a partir de embriões excisados de sementes. Desde então, esta técnica tem sido extensivamente usada para produzir híbridos raros em situações onde o mecanismo de incompatibilidade sexual ocorre. Em adição, esta técnica oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento.

Do ponto de vista técnico, as duas mais importantes considerações na cultura do embrião são: a composição do meio de cultura e a excisão do embrião. A composição do meio e a preparação asséptica do embrião variam entre as espécies. Recentes revisões sobre o assunto foram feitas por Bhojwani & Razdan (1983) e Nortog (1965, 1973).

PARÂMETROS QUE AFETAM A CULTURA DE EMBRIÃO

Fonte de explante

A seleção da planta a ser usada para a cultura de embrião é normalmente prognosticada pelas prioridades e pelos objetivos do trabalho. Entretanto, se a escolha existe como prática inicial, é recomendável começar com embriões que são facilmente dissecados. Por exemplo, embriões maduros de algumas leguminosas e alguns citros de sementes grandes são ótimos materiais de partida. Por outro lado, maior cuidado no uso desta técnica é necessário quando sementes de *Daucus carota* L. e *Apium graveolens* L. são utilizadas.

Desinfestação do explante

Os embriões zigóticos, protegidos dentro de um sistema estéril no tecido ovular, não necessitam de desinfestação superficial. Entretanto, os frutos são desinfestados segundo os métodos descrito por Bhojwani & Razdan (1983). Após esta assepsia, os embriões são excisados e cultivados em meio nutritivo.

Em orquídeas onde as sementes não possuem endosperma funcional e o tegumento é muito reduzido, ovários inteiros são desinfestados e cultivados (Raghavan 1976).

¹ Eng^o-agr^o, Ph.D., Fisiologia de Sementes, EMBRAPA/CNPHTaliças, C.P. 07.0218, 70359 Brasília, DF.

Excisão do embrião

Para a cultura de embriões *in vitro*, geralmente é necessário removê-los dos seus tecidos embrionários. Os embriões maduros podem ser isolados com relativa facilidade abrindo-se as sementes. As sementes com tegumento duro são dissecadas após imergi-las em água (Raghavan 1976). Embriões menores exigem mais cuidados na excisão, havendo necessidade de uma lupa estereoscópica (60-80x). Detalhes na excisão de embrião em vários estádios de desenvolvimento de *Capsella bursa-pastoris* e *Hordeum vulgare* foram descritos por Raghavan & Torrey (1963) e Norstog (1965).

Exigências nutricionais

O mais importante aspecto da cultura de embrião é a seleção do meio nutritivo correto, que estimule o desenvolvimento dos embriões. Hanning (1904) e Laibach (1925), usando meios simples, obtiveram sucessos no cultivo de embriões maduros. Entretanto, embriões de pós-fertilização não cresciam e não germinavam. Para superar esta dificuldade têm-se buscado novas alternativas de meios nutritivos, que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário, possibilitando, assim, o cultivo de embriões em vários estádios de desenvolvimento. Portanto, o controle do crescimento do embrião em cultura, comparado às condições naturais, permite-nos especular se o estímulo para crescimento está localizado no embrião ou nos tecidos maternos.

Duas fases de desenvolvimento do embrião têm sido reconhecidas: a) a fase heterotrófica, onde o embrião é dependente das fontes nutricionais do endosperma e dos tecidos maternos; b) a fase autotrófica, em que o embrião é capaz de sintetizar substâncias para seu desenvolvimento a partir de sais minerais e açúcar (Raghavan 1966). Morfológicamente, os embriões de *Capsella* e *Datura* são heterotróficos até a fase globular, e somente no estádio cordiforme tornam-se autotróficos (Raghavan 1966, 1976, 1980). As exigências nutricionais para a cultura de embrião de *Capsella bursa-pastoris* em várias fases da embriogenia é dada na Tabela 1. Pode-se observar que estas exigências tornam-se mais simples com o desenvolvimento do embrião. Salienta-se que o período crítico destas fases varia com a espécie e as condições ambientais (Van Overbeek et al. 1942, 1944, Raghavan & Torrey 1963, 1964).

O cultivo de embriões imaturos, em alguns casos, exige técnicas mais refinadas e meios de cultura mais complexos. Monnier (1976, 1978) desenvolveu um método que permite o crescimento de embriões de *Capsella* no estádio globular sem removê-los da posição original. O método de Monnier consiste no uso de dois meios nutricionais diferentes em uma mesma placa-de-petri.

TABELA 1. Embriogenia em *Capsella bursa-pastoris* (segundo Raghavan 1966).

Estádio de desenvolvimento	Tamanho de embrião (µm)	Necessidades nutricionais
Globular inicial	20-60	desconhecida até 40 µm
Globular final	61-80	(macronutrientes ^a , micronutrientes ^b + vitaminas ^c + 2% sacarose) + IAA (0,1 mg.l ⁻¹) + cinetina (0,001 mg.l ⁻¹) + adenina (0,001 mg.l ⁻¹)
Cordiforme	81-450	meio basal somente
Torpedo	451-700	macronutrientes ^a + vitaminas ^c + 2% sacarose
Embriões maduros	700	macronutrientes ^a + 2% sucrose

a Macronutrientes (mg.l⁻¹): 480 Ca(NO₃)₂·4H₂O, 63 MgSO₄·7H₂O, 63 KNO₃, 42 KCl, 60 KH₂PO₄.

b Micronutrientes (mg.l⁻¹): 0,56 H₂BO₃, 0,36 MnCl₂·4H₂O, 0,42 ZnCl₂, 0,27 CuCl₂·2H₂O, 1,55 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O e 3,08 tartarato férrico.

c Vitaminas (mg.l⁻¹): 0,1 tiamina, 0,1 piridoxina e 0,5 niacina.

Em geral, o desenvolvimento de embriões maduros *in vitro* ocorre em meios nutritivos simples, compostos de sais minerais, vitaminas e açúcares. No caso dos embriões imaturos, entretanto, é necessário um meio mais completo, contendo, além dos componentes acima mencionados, substâncias reguladoras de crescimento, compostos orgânicos e extratos naturais.

Germinação precoce

Embriões imaturos, removidos da semente e cultivados em meio de cultura, não somente superam o estágio de repouso, como também cessam os processos normais de desenvolvimento embriogênico. Nos casos mais específicos, como as espécies vivíparas, *Rhizophora mangle*, *Arachis hypogea* e mutantes de *Zea mays* e *Arabidopsis*, os embriões têm capacidade de germinar quando presos à planta-mãe (Black 1983, King 1982). Assim, isto indicaria que algum fator na semente exerce influência no crescimento contínuo do embrião e previne a germinação precoce.

O ácido abscísico (ABA), conhecido como inibidor da germinação de muitos embriões maduros, também inibe a germinação precoce *in vitro* (Black 1983, King 1982). Recentemente, Ackerson (1984b) demonstrou que a germinação precoce em embriões imaturos de soja poderia ser induzida pela redução do ABA endógeno na semente. Altas concentrações osmóticas de sacarose, manitol (Crouch & Sussex 1981) e polietileno glicol (Andreoli 1985) também inibem a germinação.

Evidências diretas da ação do ABA na prevenção de germinação precoce em embriões imaturos são observadas pela correlação inversa entre a concentração de ABA na semente e sua germinação. Estes dados estão descritos nas observações de Quebedeaux et al. (1976), Ackerson (1984a, b), Hendrix & Radin (1984) e Andreoli & Maguire (Prelo).

A origem do ABA durante a embriogenia *in vitro* é ainda questionável. Ou é proveniente da capacidade de biossíntese do embrião, ou é transportado das células maternas para o embrião. Hendrix & Radin (1984), confirmando a hipótese de Ihle-Dure (1972), observaram que a viviparidade é prevenida pelo ABA originado do tegumento, difundindo-se para o embrião. A germinação de embriões *in vitro* pode ser inibida pelo extrato líquido dos óvulos, bem como pelo ABA aplicado exogeneamente, sugerindo que os fatores inibidores da germinação precoce do embrião residem nos tecidos embrionários da semente. Isto indica que o ABA tem dois mecanismos específicos de ação: um estimular, durante a embriogenia, e outro inibidor, durante a mobilização de reservas na germinação (Ackerson 1984, Andreoli 1985, Andreoli & Maguire 1986).

APLICAÇÕES PRÁTICAS

O embrião, como parte mais importante da semente, representa o começo da nova geração esporofítica, sua multiplicação, reprodução, herança e dispersão. Assim, a cultura de embrião é uma técnica que vem sendo praticada pelos melhoristas de plantas há quase um século.

As aplicações práticas da cultura de embriões têm sido revisadas nos artigos de Raghavan (1976, 1980), e mais recentemente nos trabalhos de Andreoli (1982) e Bhojwani & Razdan (1983). Algumas aplicações serão brevemente citadas adiante.

Uma das práticas mais comuns e aplicadas desta técnica é na obtenção de plântulas híbridas em cruzamentos interespecíficos e intergenéricos, onde barreiras sexuais na formação da semente ocorrem (Brink & Cooper 1941, Cooper & Brink 1945, Choudhury 1955).

Sucessos no cultivo de embriões híbridos interespecíficos têm sido demonstrados em *Melilotus*, *Trifolium*, *Linum*, *Oryza*, *Lycopersicon* e *Hordeum*. Do mesmo modo, híbridos intergenéricos têm sido obtidos em cruzamentos de *Hordeum* x *Secale*, *Hordeum* x *Triticum*, *Hordeum* x *Agropyrum* (Kruse 1974, Cooper et al. 1978) e *Triticum* x *Secale* (Taira & Larter 1983). Em alguns híbridos intergenéricos são necessários alguns tratamentos especiais nos tecidos maternos (Taira & Larter 1977, Cooper et al. 1978).

Outra potencialidade do uso da cultura de embrião é na obtenção de haplóides, mediante a eliminação seletiva de cromossomos pela hibridação distante. Kasho & Kao (1970) observaram que, no cruzamento de *Hordeum vulgare* e *H. bulbosum*, as progênies eram morfológicamente e citologicamente haplóides de *H. vulgare*. Estudos citológicos detalhados têm revelado que nos cruzamentos da dupla fertilização ocorre normalmente, mas a eliminação seletiva dos cromossomos de *bulbosum*, durante as primeiras divisões da embriogenia, permite a formação de embriões só com os cromossomos de *vulgare*. Nestes cruzamentos, o embrião normalmente aborta 10 dias após a polinização. Para obtenção de plantas haplóides, entretanto, é necessário excisar embriões imaturos e cultivá-los em um meio de cultura.

A estas vantagens junta-se a utilização deste método na quebra de dormência de sementes frutíferas e ornamentais, usadas nos programas de melhoramento (Randolph & Cox 1943, Lammerts 1946).

A cultura de embrião é um excelente instrumento para o desenvolvimento da pesquisa na área de embriologia, bioquímica e fisiologia de semente, quanto ao problema de germinação e dormência, bem como quanto à relação endosperma e embrião.

Finalmente, em testes rápidos para determinar a viabilidade da semente, a técnica da cultura de embrião tem sido usada em alguns laboratórios.

REFERÊNCIAS

- ACKERSON, R.C. Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, 35(152):403-13, 1984a.
- ACKERSON, R.C. Abscisic acid and precocious germination in soybeans. *J. Exp. Bot.*, 35(152):414-21, 1984b.

- ANDREOLI, C. Embryo culture and embryogenesis. Pullman, Washington State University, 1982. 13p.
- ANDREOLI, C. Seed physiology studies in carrot (*Daucus carota* L.) and methods for ameliorating its germination. Pullman, Washington State University, 1985. 142p. Tese Ph.D.
- ANDREOLI, C. & MAGUIRE, J.D. Abscisic acid in seed development and germination of carrot. *Amer. J. Bot.* Prelo.
- BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. Zygotic embryo culture. In: **Plant tissue culture; theory and practice.** Amsterdam, Elsevier, 1983. p.119-235.
- BLACK, M. Abscisic acid in seed germination and dormancy. In: ADDICOT, F.T. **Abscisic acid.** New York, Praeger, 1983. p.331-64.
- BRINK, R.A. & COOPER, D.C. Incomplete seed failure as a result of somatoplastic sterility. *Genetics*, 26:487-505, 1941.
- BRINK, R.A.; COOPER, D.C. & AUSERMAN, L.E. A hybrid between *Hordeum jubatum* and *Secale cereale*. *J. Hered.*, 35: 67-75, 1944.
- CHOUDHURY, B. Embryo culture technique. III. Growth of hybrid embryos (*Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum*) in culture medium. *Indian J. Hort.*, 12:155-6, 1955.
- COOPER, D.C. & BRINK, R.A. Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Genetics*, 30:376-401, 1945.
- COOPER, K.V.; DALE, J.E.; DYER, A.F.; ZYNE, R.L. & WALDER, J.T. Hybrid plants from the barley x rye cross. *Plant Sci. Lett.*, 12:293-8, 1978.
- CROUCH, M.L. & SUSSEX, I.M. Development and storage; protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. *Planta*, 153:64-74, 1981.
- DIETERICH, K. Über kultur von embryonen ausserhalb des samens. *Flora*, 117:379-417, 1924.
- HANNING, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. I. über die cultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. *Bot. Gaz.*, 62:45-80, 1904.
- HENDRIX, D.L. & RADIN, J.W. Seed development in cotton: feasibility of a hormonal role for abscisic acid in controlling vivipary. *J. Plant Physiol.*, 117:211-21, 1984.
- IHLE, J.N. & DURE, L.S.III. The development biochemistry of cotton-seed embryogenesis and germination. III. Regulation of the biosynthesis of enzymes utilized in germination. *J. Biol. Chem.*, 247:5048-55, 1972.
- KASHA, K.J. & KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225:874-6, 1970.
- KING, R.W. Abscisic acid in seed development. In: KHAN, A.A. **The seed physiology and biochemistry of seed development dormancy, and germination.** Amsterdam, Elsevier, 1982. p.157-79.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.*, 73:1-25, 1922.
- KRUSE, A. An in vivo/vitro embryo culture technique. *Hereditas*, 77:219-24, 1974.
- LAIBACH, F. Das taubwerden von bastardsamen und die kunstliche aufzucht frusch absterbender Bastardembryonen. *Z. Bot.*, 17:417-59, 1925.
- LAIBACH, F. Ectogenesis in plants; methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *J. Hered.*, 20:201-8, 1929.
- LAMMERTS, W.E. Use of embryo culture in rose breeding. *Plants Gard.*, 2:111, 1946.
- MONNIER, M. Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* (Moench). *Rev. Cytol. Biol. Veg.*, 39:1-120, 1976.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T.A. **Frontiers of plant tissue culture.** Calgary, University of Calgary Press, 1978. p.277-86.
- NORSTOG, K. Development of cultured barley embryos. I. Growth of 0.1-0.4 mm embryos. *Am. J. Pot.*, 52:538-46, 1965.
- NORSTOG, K. New synthetic medium for the culture of premature barley embryos. *In vitro*, 8:307-8, 1973.
- QUEBEDEAUX, B.; SWEETSER, P.B. & POWELL, J.C. Abscisic acid levels in soybeans reproductive structures during development. *Plant Physiol.*, 58:363-6, 1976.
- RAGHAVAN, V. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol. Rev.*, 41:1-58, 1966.
- RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants.** London, Academic, 1976. p.603.
- RAGHAVAN, V. Embryo culture. In: VASIL, I.K. **Perspectives in plant cell and tissue culture.** Int. Rev. Cytol. (Suppl. 11B), 1980. p.209-40.
- RAGHAVAN, V. & TORREY, J.G. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. *Am. J. Bot.*, 50:540-51, 1963.
- RAGHAVAN, V. & TORREY, J.G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. *Plant Physiol.*, 39:691-9, 1964.
- RANDOLPH, L.F. & COX, L.G. Factors influencing the germination of *Iris* seed; the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 43:284-300, 1943.
- TAIRA, T. & LARTER, E.N. Factors influencing development of wheat-rye hybrid embryos in vitro. *Crop. Sci.*, 18:348-50, 1978.
- VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M.E. & BLAKESLEE, A.F. Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. *Amer. J. Bot.*, 29:472-7, 1942.
- VAN OVERBEEK, J.; SIN, R. & HAAGEN-SMITH, A.J. Factors affecting the growth of *Datura* embryos in vitro. *Amer. J. Bot.*, 31:219-24, 1944.

A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SUAS APLICAÇÕES

Frédéric J. Bakry¹

ABSTRACT - The embryo develops within the embryo sac, usually originating from a zygote. **In vitro** culture techniques have shown that it is possible to obtain structures comparable to zygotic embryos, denominated "somatic embryos", from any plant tissue. Somatic embryogenesis is characterized by the formation of bipolar structures consisting of a stem and a root meristem and limited by epidermal cells. Initially demonstrated in carrots, somatic embryogenesis has been shown to be possible in more than 100 species. In general the starting material consists of meristematic or juvenile tissue. Origin of tissue and composition of the culture medium are extremely important factors and special care has to be taken with respect to the concentration of nitrogenous-compounds, sugars and growth-regulating substances. The use of somatic embryos from single cells or from tissues represents an important tool in studies aimed at the genetic improvement of plants and in the near future it will be possible to furnish manipulated somatic embryos to the farmers instead of seeds.

INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos têm demonstrado que nos vegetais superiores as células somáticas mantêm a sua totipotencialidade, e que em condições adequadas podem originar plantas independentemente do tipo de tecido usado. Em certos casos, as plantas se desenvolvem por via inteiramente comparável àquela do desenvolvimento de um embrião zigótico, ou seja, mediante embriogênese somática.

Ao contrário do que ocorre com um meristema, onde os tecidos e vasos condutores encontram-se em continuidade com a planta, o embrião somático, também denominado "embrióide", se caracteriza por sua estrutura bipolar, com um meristema apical e outro de raiz, delimitado por uma epiderme, apresentando contigüidade com o tecido-mãe, sem conexões vasculares. Vários casos de embriogênese somática **in vivo** já foram descritos (Tisserat et al. 1979). Em geral, estes se desenvolvem ao nível de tecidos florais, a partir de tecidos maternos (nucelo, tegumentos internos), de tecidos do saco embrionário (sinérgides, antípodas, endosperma) e também a partir do próprio embrião zigótico e suspensor. Também existem alguns casos de desenvolvimento de embriões somáticos, na natureza, a partir de folhas (Taylor 1967).

Nas condições de cultura **in vitro**, mais de 100 espécies de plantas manifestaram este tipo de morfogênese, e os embriões desenvolveram-se a partir de todos os tipos de tecidos: vegetativos ou florais (Ammirato 1984).

Os embriões somáticos podem desenvolver-se diretamente ou indiretamente a partir do explante inicial. No último caso, que representa a maioria, os embriões desenvolvem-se a partir de calos originados do explante, após um período mais ou menos longo de proliferação celular. As células embriogênicas se diferenciam das outras células dentro do calo por seu aspecto semelhante a uma célula de

meristema ou de zigoto: elas são pequenas, relativamente isodiamétricas, pouco vacuolizadas e ricas em citoplasma, com núcleos predominantes e paredes delgadas (Sharp et al. 1980). As células iniciais se dividem internamente produzindo pequenos grupos de células com citoplasma denso, denominadas pró-embriões, que evoluem em seguida para embriões, passando, de uma maneira similar, pelos estádios intermediários de desenvolvimento encontrados nos embriões zigóticos.

No caso de iniciação direta, sem formação de calo, os embriões desenvolvem-se, em geral, a partir de tecidos epidérmicos do explante. É o que se observa na embriogênese adventícia de hipocótilode cenoura (Haccius & Lakshmanan 1969) e *Ranunculus sceleratus* (Konar & Nataraja 1965), onde ocorre a transformação de células epidérmicas em embrióides. Em outros casos, por exemplo, em citrus, os embriões somáticos desenvolvem-se diretamente a partir do nucelo (Esan 1973). Finalmente, os embriões somáticos também podem ser obtidos diretamente de cultura de protoplastos (Kameya & Uchiyama 1972) e de grão de pólen em cultura (Raquin & Pelet 1972, Nitsch & Nitsch 1969).

HISTÓRICO

Os trabalhos nesta área iniciaram-se com cenoura quando Steward et al. (1958) e Reinert (1958) observaram, em condições de cultura **in vitro**, os embriões somáticos pela primeira vez.

Posteriormente, pesquisas mostraram que a cultura de tecidos de plantas das famílias das Umbelíferas, Solanáceas, Ranunculáceas e Rutáceas permite a embriogênese somática com facilidade. Por outro lado, em outras famílias de grande importância econômica, a obtenção de embriões somáticos é mais difícil. Entretanto, esta afirmação é muito relativa, pois representa, de fato, uma avaliação da resposta das plantas a um determinado tratamento, que foi desenvolvido para algumas espécies (cenoura, fumo) e não envolve a capacidade intrínseca real dos tecidos que apresentam organogênese.

¹ Doutor, Consultor IREA/CIRAD, EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 10.2372, 70770 Brasília, DF.

Alguns casos de embriogênese somática foram descritos recentemente na família das Leguminosas: *Medicago sativa* (Walker et al. 1979, Kao & Michauluck 1981), *Trifolium pratense* (Collins & Phillips 1980) e *Phaseolus vulgaris* (Allavena 1984). Com espécies arbóreas também foram obtidos alguns resultados: *Citrus* (Kochba & Spiegelroy 1973), *Corylus* (Radojevic et al. 1975), *Coffea* (Sondahl & Sharp 1977). Finalmente, nas monocotiledôneas tanto a obtenção de calo quanto a de embriões somáticos têm sido difíceis. Recentemente resultados promissores foram obtidos com 25 espécies diferentes de gramíneas (Ammirato 1984), e nas famílias: Palmáceas (Reynolds & Murashige 1979, Tisserat & DeMason 1980), Liliáceas (Abo El-Nil 1977) e Musáceas (Bakry et al. 1985).

Devido à dificuldade em induzir a embriogênese somática em várias espécies de plantas, a escolha do explante é fundamental para iniciar as culturas; assim, de uma maneira geral, os melhores resultados têm sido obtidos com os explantes de tecidos meristemáticos e juvenis, ou ainda, os retirados das peças florais (Nozeran & Bancillon-Rossignol 1977, Nozeran et al. 1982).

Deve-se notar que uma queda na capacidade embriogênica foi constatada após repicagens sucessivas da cultura. Este declínio foi atribuído, em parte, ao aumento de células que apresentaram modificações genéticas, tais como, poliploidia ou aneuploidia (Smith & Street 1974).

A origem exata dos embriões somáticos está parcialmente definida; entretanto, em certos casos, a origem unicelular já foi comprovada. É provável que estes embriões se formem a partir de um número muito reduzido de células, o que permite ser a embriogênese somática *in vitro* uma técnica de ampla aplicação no melhoramento genético de plantas.

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

A composição do meio de cultura e as condições de incubação são fatores muito importantes a serem considerados.

Geralmente, a maioria dos explantes são cultivados em meios muito concentrados e completos, como MS (Murashige & Skoog 1962), B5 (Gamborg et al. 1968) ou SH (Schenk & Hildebrandt 1972). Mouras & Lutz (1980) relataram a necessidade de utilizar soluções minerais concentradas, para o desenvolvimento de embriões, e soluções salinas diluídas, para preservar o potencial das suspensões de células. Por outro lado, meio relativamente pobre, como o de White (1963), tem sido usado na obtenção de embriões somáticos.

A utilização de altas concentrações de nitrogênio (40-60 mM) é uma prática comum. Entretanto, Caldas (1971) demonstrou que a quantidade ótima de íons de

amônio depende da concentração de auxina no meio da cultura. Ammirato (1984) ressaltou os benefícios ocorridos com a adição de uma fonte de nitrogênio reduzida (na forma de amônio) ao meio contendo nitrato, para a iniciação e manutenção dos embriões. Em experimentos realizados com cenoura, Reinert et al. (1967) observaram que explantes cultivados em meio contendo amônio apresentaram embriogênese em alta frequência; entretanto, naqueles cultivados em meio contendo apenas nitrato, a frequência foi menor, para uma mesma concentração de nitrogênio.

Enfim, deve-se observar que o nitrogênio na forma de sais (NH_4^+ e NO_3^-) pode ser substituído, na composição do meio de cultura, por L-glutamina ou seus aminoácidos derivados (Tisserat et al. 1979).

Quanto ao fornecimento de carboidratos, a sacarose é uma fonte de carbono eficaz para a embriogênese somática, sendo que outros mono e dissacarídeos têm sido utilizados com sucesso (Verma & Dougall 1977). Concentrações elevadas de sacarose (cerca de 12%) podem ser utilizadas em culturas nas quais se deseja promover o desenvolvimento de calos embriogênicos (Lu & Ozias-Akins 1982); contudo, após a iniciação dos embriões, a quantidade de sacarose deve ser diminuída para 2 ou 3%, pois altas concentrações de açúcar impedem a "germinação" precoce dos embriões. De fato, em casos específicos, altas concentrações de sacarose intervem mais como agente de pressão osmótica do que como fonte de carbono.

Finalmente, a utilização de reguladores de crescimento deve ser rigorosamente controlada, pois o sucesso da cultura depende muito deles. De uma maneira geral, torna-se necessário distinguir a ação dos reguladores de crescimento sobre a indução de calo. A influência positiva de auxinas, isoladas ou combinadas com citocininas, é sobretudo atribuída à sua ação benéfica sobre o desenvolvimento de calo a partir de tecidos diferenciados. Ao contrário, a presença destes reguladores de crescimento é dispensável durante a segunda etapa da cultura. De acordo com Tisserat et al. (1979), a suplementação do meio com reguladores de crescimento foi desnecessária para promover diretamente a embriogênese somática. Os embriões freqüentemente formam-se sobre os calos em meio de cultura contendo auxinas, mas permanecem bloqueados em estádios precoces de desenvolvimento, na presença das mesmas.

Na prática, meio contendo alta concentração de 2,4-D é utilizado para obtenção de grande quantidade de calos e, eventualmente, estruturas embrionárias. Em seguida, estes são transferidos para meio desprovido de auxinas (podendo conter ou não citocininas), o qual permite o desenvolvimento subsequente dos embriões.

O ácido abscísico possui uma ação inibitória sobre a embriogênese somática. Entretanto, sua incorporação ao meio de cultura, após início da formação dos embriões, diminui a frequência de embriões morfológicamente anormais (Ammirato 1974). Finalmente, a adição de etileno ou de

ácido giberélico (GA_3) inibe a formação de embriões, embora o GA_3 possa favorecer, em certos casos, o seu enraizamento (Lu & Vasil 1981).

Outros parâmetros importantes que podem interferir na iniciação ou desenvolvimento de embriões somáticos são: o tipo de recipiente (intervém ao nível de trocas gasosas); as condições de incubação da cultura (foto e termoperíodo) e enfim a concentração do inóculo em cultura (Ammirato 1984).

APLICAÇÕES TEÓRICAS E PRÁTICAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

O interesse pela utilização da embriogênese somática é praticamente o mesmo que existe com relação à cultura *in vitro*, porém, esta forma de morfogênese apresenta características particulares que conduzem às seguintes aplicações específicas: 1) propagação vegetativa de genótipos superiores, principalmente no caso de plantas alógamas, tais como: dendê e coco, que estão sujeitas a alto grau de heterose; 2) recuperação de plantas livres de vírus e micoplasma. Bitters et al. (1972) obtiveram embriões somáticos a partir de nucelo de *Citrus*, totalmente livres de vírus.

A embriogênese somática, por outro lado, apresenta aspectos específicos que são importantes: a diferenciação da raiz e a sua conexão com o sistema caulinar diferem quanto a origem, nos casos de uma neoformação caulinar direta em embrião somático. No primeiro, as raízes têm origem endógena, diferenciando-se ao nível do câmbio (Favre 1977). Isto pode causar problemas à planta, na exploração profunda do solo, e também a sua manutenção no campo (problemas de resistência ao vento em árvores de grande porte). Por outro lado, conexões mal feitas ou insuficientes, entre os tecidos condutores de raízes e do caule, também podem provocar problemas para provisão de água e sais minerais às plantas. Inversamente, na embriogênese somática, a formação de raízes e de suas conexões com os vasos condutores do caule (ao nível do coleto) é idêntica àquela de um embrião zigótico. Por isso, os problemas expostos acima são, em teoria, minimizados.

Finalmente, sob um aspecto prático, é provável que, com o crescimento atual na demanda de produção de sementes, seria muito vantajoso, principalmente para plantas alógamas, substituir as sementes por embriões somáticos. Estes embriões seriam encapsulados individualmente, em um meio padronizado (contendo substâncias nutritivas e reguladores de crescimento), e distribuídos ao produtor.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece Dr. Dalmo Catauli Giacometti e Christina Gonçalves do Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN/EMBRAPA, pela ajuda na preparação e tradução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABO EL-NIL, N.M. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci. Lett.*, 9: 259-64, 1977.
- ALLAVENA, A. Beans (*Phaseolus*). In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*; crop species. New York, MacMillan, 1984. v.2, p.137-68.
- AMMIRATO, P.V. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot. Gaz.*, 135:328-37, 1974.
- AMMIRATO, P.V. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan, 1984. v.1, p.82-123.
- BAKRY, F. & ROSSINGNOL, L. Analyse des capacités de callogenese et d'organogenese obtenues à partir de differentes tissus de bananiers (*Musa* sp., Musacées). *Fruits*, 40:697-708, 1985.
- BAKRY, F. & ROSSINGNOL, L. Obtention de cals, de néoformations et d'embryons somatiques à partir de la culture de tissus de bananiers (*Musa* sp.). *Fruits*, 1985. Prelo.
- BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T.S. & NAVAR, E. Investigations on establishing virus-free citrus plants through tissue culture. In: PRICE, W.C., ed. *Proceedings of the Fifth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Gainesville, Univ. of Florida Press, 1972. p.267-71.
- CALDAS, L.S. Effects of various growth hormones on the production of embryoids from tissues cultures of the wild carrot *Daucus carota* L. Columbus, The Ohio State University, 1971. Ph.D. Dissertation.
- CARANTINO, S. Palmier à huile; multiplication végétative *in vitro*. *Biofutur*, mai, 1983. p.47-9.
- COLLINS, G.B. & PHILLIPS, G.C. *In vitro* tissue culture and plant regeneration in *Trifolium pratense* L. In: USA-NSF AND FRANCE-CNRS SEMINAR ON PLANT REGENERATION, 1980. *Proceedings*. s.n.t.
- ESAN, E.B. A detailed study of adventine embryogenesis in the Rutaceae. Riverside, Univ. of California, 1973. Ph.D. Dissertation.
- FAVRE, J.M. La rhizogenèse. *Annales de l'Université d'Abidjan, Série C, Sciences*, 1977. 100p.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50:151-8, 1968.
- HACCIUS, B. & LAKHMANAN, K.K. Adventiv - Embryonen - Embryoide-Adventiv-Knospen. Ein Beitrag zur Klärung der Begriffe. *Österr. Bot. Zeitschr.*, 116:145-58, 1969.
- KAMEYA, T. & UCHIYAMA, H. Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta*, 103:356-60, 1972.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Embryoid formation in alfalfa cell suspensions from different plants. *In vitro*, 17:645-8, 1981.

- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.*, 69:156-62, 1973.
- KONAR, R.N. & NATARAJA, K. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphology*, 15:132-7, 1965.
- LU, C. & OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.*, 62:109-12, 1982.
- LU, C. & VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.*, 59:275-80, 1981.
- MOURAS, A. & LUTZ, A. Induction, répression et conservation des propriétés embryogénétiques des cultures de tissus de carotte sauvage. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 127:93-8, 1980.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-97, 1962.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85-7, 1969.
- NOZERAN, R. & BANCILHON-ROSSIGNOL, L. La multiplication végétative des végétaux vasculaires. *Soc. Bot. Fr. Coll. Mult. Végé.*, 124:59, 1977.
- NOZERAN, R.; DUCREUX, G. & ROSSIGNOL-BANCILHON, L. Reflexions sur les problèmes de rejeunissement des végétaux. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 2:107-30, 1982.
- RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R. & NESOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of *Corylus avellana* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91:57-62, 1975.
- RAQUIN, C. & PILET, V. Production de plantules à partir d'antheres de pétunias cultivées in vitro. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 274:1019-22, 1972.
- REINERT, J. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 71:15, 1958.
- REINERT, J.; TAZAWA, M. & SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. *Nature*, 216:1215-6, 1967.
- REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro*, 15:383-7, 1979.
- SCHENK, R.U. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:166-204, 1972.
- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S. & MARAFFA, S. B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hortic. Rev.*, 2:268-310, 1980.
- SMITH, S.M. & STREET, H.E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot.*, 38:223-41, 1974.
- SONDAHL, M.R. & SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81:395-408, 1977.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O. & MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45:705-8, 1958.
- TAYLOR, R.L. The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Canad. Jour. Bot.*, 45:1553-6, 1967.
- TISSERAT, B. & DeMASON, D.A. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.*, 46:465-72, 1980.
- TISSERAT, B.; ESAN, B.B. & MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.*, 1:1-78, 1979.
- VERMA, D.C. & DOUGALL, D.K. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol.*, 59:81-5, 1977.
- WALKER, K.A.; WENDELN, M.L. & JAWORSKI, E.G. Organogenesis in callus cultures of *Medicago sativa*; the temporal separation of induction process from differentiation processes. *Plant Sci. Lett.*, 16:22-30, 1979.
- WHITE, P.R. *A handbook of plant and animal tissue culture*. Lancaster, Jaques Cattell Press, 1963.

CLONAÇÃO IN VITRO DE ORQUÍDEAS ATRAVÉS DE ÁPICES RADICULARES

Gilberto B. Kerbauy¹

ABSTRACT - The vegetative propagation of plants and interspecific hybrids of *Catasetum* and *Oncidium* has been achieved through *in vitro* culture of root apex. The regeneration of protocorms-like structure (PLS) was more easily obtained in *Catasetum* than in *Oncidium*. In the latter, PLS developed only from callus tissue.

INTRODUÇÃO

Por causa da natureza geralmente subterrânea, o estudo do desenvolvimento *in situ* das raízes exige, via de regra, esforços intensos e não-convencionais. De acordo com Feldman (1984), desde 1926, ano em que foi publicado por Weaver o primeiro estudo clássico sobre o desenvolvimento de raiz de plantas economicamente importantes, até os últimos dez anos, a pesquisa de raízes e sistemas radiculares não têm atraído senão uma modesta atenção por parte dos pesquisadores da área vegetal. Uma das grandes dificuldades encontrada neste campo de estudo advém justamente do controle dos parâmetros do próprio solo. Em decorrência, esforços têm sido empreendidos a fim de desenvolver sistemas mais adequados para o cultivo de raízes, os quais possibilitem não apenas um rápido acesso ao tecido radicular, mas também um rigoroso controle das condições ambientais sob as quais estes órgãos se desenvolvem. Particularmente na área de desenvolvimento vegetal, o emprego da técnica de culturas assépticas tem sido progressivamente incrementado, possibilitando avanços consideráveis na compreensão dos diferentes aspectos relacionados ao metabolismo, à fisiologia e à anatomia radicular (Butcher & Street 1964).

Com relação aos estudos sobre o desenvolvimento de raízes de orquídeas, muito pouco se fez, tanto *in situ* quanto *in vitro* (Churchill et al. 1972, Kerbauy 1984a, b). Apesar de insuficientes, estes estudos evidenciam claramente que essas raízes possuem características próprias, cujo entendimento demandará ainda muito estudo de caráter básico. Conforme verificado em laboratório, os conhecimentos adquiridos, através de estudos relativos à cultura de sistemas caulinares de uma determinada planta orquídea, geralmente não são aplicados ao respectivo sistema radicular. Estratégias, métodos e técnicas próprias devem, por conseguinte, serem desenvolvidos. É provável que as dificuldades encontradas, até o momento, decorram em grande parte da carência dos subsídios mínimos e imprescindíveis, em relação a aspectos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos básicos. A julgar pela bibliografia pertinente e disponível, o mes-

mo parece ser válido também para a grande maioria das demais angiospermas (Torrey 1976, Feldman 1984).

As necessidades de estudos básicos com raízes, de um modo geral, são evidentes. O emprego de orquídeas para estes estudos oferece diferentes vantagens. Sob o ponto de vista econômico, elas representam uma importante fonte de divisas para o País, que possui uma das mais valiosas floras orquídeas do mundo (Decher 1946). Após a crise do petróleo, devido as nossas condições climáticas favoráveis, passamos a competir também, com razoável sucesso, com países europeus tradicionalmente monopolizadores do mercado de flores de orquídeas cortadas. Nem todas as nossas plantas orquídeas de valor comercial, todavia, foram clonadas *in vitro*, até o presente, através do sistema convencional de cultura de ápices caulinares. Sob o ponto de vista científico, a possibilidade de obtenção de uma quantidade praticamente ilimitada de material estéril, durante o ano inteiro, através da cultura assimbiótica de plantas oriundas de sementes, seja talvez uma das vantagens mais conspícua. Em relação à prática de micropropagação *per se*, o emprego de ápices radiculares oferece vantagens consideráveis, quando comparado com os ápices caulinares. A não-ocorrência de oxidação, fenômeno este altamente limitante para o estabelecimento de culturas a partir deste último material, é sem dúvida altamente compensatória. Além disto, as raízes são desprovidas de escamas protetoras, o que facilita sensivelmente o laborioso processo de explantação, principalmente em monocotiledôneas. Em decorrência, a obtenção de explantes efetivamente reduzidos, imprescindíveis, por exemplo, para fins de limpeza clonal, torna-se facilitada. Ao contrário dos meristemas apicais caulinares, os meristemas das raízes, independentemente do tamanho alcançado por estas, apresentam uma atividade mitótica praticamente ininterrupta, tomando-se assim disponíveis durante longos períodos de tempo. As orquídeas, apesar de serem plantas herbáceas, apresentam um crescimento lento, produzindo um ou dois brotos por ano, enquanto neste mesmo período podem formar até mais de uma dezena de raízes. Estas, se seccionadas, formam novas raízes e assim sucessivamente.

Conforme já explicitado, a utilização de ápices caulinares de orquídea, para fins de micropropagação, apresenta certas limitações até então não suficientemente contornadas. Em decorrência, vários gêneros, espécies e híbridos de alto valor econômico não foram até então clonados. Esta si-

¹ Professor, Dr., Dept^o de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05568 São Paulo, SP.

tuação, aliada à necessidade de estudos básicos das raízes *per se*, levou-nos a desenvolver estudos *in vitro* sobre aspectos fisiológicos, bioquímicos, histoquímicos e estruturais deste órgão.

MATERIAL E MÉTODOS

Dentre os diversos gêneros de orquídeas brasileiras estudados neste laboratório, dois deles, *Catasetum* e *Oncidium*, foram os que se mostraram mais convenientes para estudos em raízes. O meio de Vacin & Went (1949) tem sido rotineiramente empregado para o cultivo dos ápices radiculares isolados. Os explantes utilizados ($\pm 1,0$ cm) têm sido obtidos de plantas germinadas e crescidas assimbioticamente. Após inoculado, o material é incubado sob um fotoperíodo de 16 horas de luz, a uma temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira tentativa de propagação de orquídeas através de ápices radiculares foi feita por Churchill et al. (1972), utilizando *Epidendrum obrienianum*. Apesar dos esforços envidados por estes autores, não se conseguiu a indução de qualquer calo ou gema. A despeito destes resultados algo negativos, ficou evidenciado a necessidade de meios relativamente complexos para a cultura destes órgãos. Stewart & Button (1978), trabalhando igualmente com raízes de *E. obrienianum*, conseguiram através do emprego de 2,4-D a indução de alguns calos, dos quais apenas uma planta foi regenerada. Não obstante as limitações práticas destes resultados, eles evidenciaram, de qualquer forma, a viabilização do emprego de explantes radiculares de orquídea para fins de multiplicação clonal *in vitro*. Os resultados de Tanaka et al. (1976), com o emprego de raízes de *Phalaenopsis amabilis*, corroboram este ponto de vista.

Os estudos empreendidos em laboratório, com o emprego de ápices radiculares de *Catasetum* e *Oncidium*, têm possibilitado alguns novos enfoques do problema. Em *Catasetum*, por exemplo, a formação de estruturas semelhantes a protocormos diretamente do ápice radicular do explante, bem como também ao longo de suas regiões maduras, foi obtida com relativa facilidade (Kerbaux 1983, 1984a). Via de regra, a transformação do meristema radicular em meristema caulinar ocorre após algum crescimento do explante *in vitro*, sendo o tamanho final variável entre as diferentes espécies e híbridos. Apesar da natureza dramática das transformações envolvidas neste processo, este é obtido *in vitro* na ausência de qualquer suplementação exógena de fitorreguladores ao meio básico de cultura. A adição de auxina e citocinina, em diferentes concentrações, induziu a formação de massas celulares, das quais formaram-

-se ESP's (Estruturas Semelhantes a Protocormos) sem a necessidade de qualquer transferência de meio. Portanto, ao contrário do que tem sido verificado com a cultura de pontas de raízes de orquídea (Churchill et al. 1972, Tanaka et al. 1976, Stewart & Button 1978) em *Catasetum*, tanto a manutenção do explante *in vitro* quanto a indução de calos e regeneração de gemas necessitam de condições de cultura relativamente simples. Sem dúvida, este comportamento *in vitro* realça a excelência deste material como modelo experimental para estudos de diferentes naturezas. É o que estamos fazendo ao nível fisiológico, bioquímico, estrutural e histoquímico.

Comparativamente ao comportamento dos ápices de raízes de *Catasetum*, os resultados obtidos *in vitro* com *Oncidium* foram conspicuamente diferentes. Neste material, a indução de EPS's só foi possível através de calos. Estes, por seu lado, só foram efetivamente estabelecidos após um período relativamente longo de cultura, durante o qual muitos explantes e calos em início de formação acabaram morrendo. Nesta fase, tem-se mostrado imprescindível a adição de ANA (0,5-1,0 mg/l) ao meio. A exemplo do que fora constatado por Stewart & Button (1978), em *E. obrienianum*, a formação de gemas (ESP's) a partir de calos, em *Oncidium*, foi consideravelmente difícil. Kerbaux (1984b) conseguiu a regeneração de centenas de plantas a partir de calos de origem radicular. Entretanto, uma das maiores dificuldades verificadas com as culturas de *Oncidium* foi a forte tendência apresentada pelos calos em regenerar apenas raízes. Kerbaux (1984b) interpretou este comportamento *in vitro* como consequência da manutenção nos calos de um "estado fisiologicamente radicular", estado este decorrente talvez de alguma desdiferenciação incompleta das células do meristema radicular. Neste particular, é interessante lembrar que as raízes, ao contrário dos ramos, apresentam uma capacidade regenerativa relativamente moderada, originando, quando sob condições naturais, apenas raízes (Esau 1959).

Isto posto, os resultados obtidos até o momento indicam a ocorrência de pelo menos dois padrões de desenvolvimento radicular *in vitro*, representados pelos gêneros *Catasetum* e *Oncidium*. Estudos preliminares, realizados com espécies e híbridos de *Cattleya*, *Laelia* e *Epidendrum*, evidenciaram nestes materiais um padrão de desenvolvimento *in vitro* comparável ao observado em *Oncidium*.

Apesar de nossos estudos com ápices radiculares se encontrarem ainda num estágio algo inicial, os conhecimentos obtidos com *Catasetum* e *Oncidium* têm permitido a clonagem destas plantas em escala comercial. A despeito do sucesso alcançado com a regeneração *per se* com representantes destes dois gêneros, a compreensão dos fenômenos básicos envolvidos neste processo carecem ainda, e muito, de estudos mais profundos, destacando-se, dentre estes, certos aspectos bioquímicos, fisiológicos e estruturais do desenvolvimento destes órgãos.

REFERÊNCIAS

- BUTCHER, D.N. & STREET, H.E. Excised root culture. *Bot. Rev.*, **30**:513-86, 1964.
- CHURCHILL, M.E.; BALL, E.A. & ARDITTI, J. Tissue culture of orchids. II. Methods for root tips. *Am. Orchid Soc. Bull.*, **40**:109-13, 1972.
- DECHER, J.S. *Cultura das orquídeas no Brasil*. São Paulo, Secr. Agric. Ind. Com. Est. São Paulo, 1946.
- ESAU, K. *Anatomia vegetal*. Barcelona, Omega, 1959. 729p.
- FELDMAN, L.J. Regulation of root development. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**:223-42, 1984.
- KERBAUY, G.B. Clonagem *in vitro* de *Catasetum* (Orchidaceae) a partir de ápices radiculares. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34., 1983. *Anais* . . . s.n.t., p.465-71.
- KERBAUY, G.B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Report*, **3**:27-9, 1984b.
- KERBAUY, G.B. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Z. Pflanzenphysiol.*, **113**:287-91, 1984a.
- STEWART, J. & BUTTON, J. Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips culture *in vitro*. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, **47**:607-12, 1978.
- TANAKA, M.; SENDA, Y. & HASEGAWA, A. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, **45**:1022-4, 1976.
- TORREY, J.G. Plant hormones and plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**:435-59, 1976.
- VACIN, E.F. & WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, **110**:605-31, 1949.

CULTURA DE TECIDOS E BIOTECNOLOGIA

Linda Styer Caldas¹

ABSTRACT - This paper summarizes some practical aspects concerning the applications of plant tissue culture methods in agriculture. Currently, the major economic trust involves the use of *in vitro* techniques to enhance clonal propagation. A number of plant species including ornamentals, vegetables and some trees, have already been produced in large scale in several tissue culture facilities since last decade. Another application concerns the recovery of pathogen-free stocks from infected plants.

As aplicações comerciais e industriais da cultura de tecidos vegetais *in vitro* representam um ramo importante da biotecnologia. As técnicas de cultura de meristemas foram as primeiras a serem utilizadas comercialmente. Atualmente, dezenas, se não centenas, de espécies de plantas são multiplicadas vegetativamente em floricultura e agricultura, com a vantagem concomitante de produzir mudas livres de determinados patógenos, principalmente vírus, viróides e micoplasmas. As aplicações no melhoramento vegetal apresentam alguns sucessos, através do uso adequado da propagação vegetativa e cultura de embriões. Outros bons resultados devem surgir em breve, através da busca de variantes somaclonais, fusão de protoplastos e, eventualmente, da engenharia genética. As perspectivas incluem a produção de compostos secundários pela cultura de células em suspensão. Várias aplicações específicas das técnicas de cultura de tecidos já foram patenteadas.

O termo "biotecnologia" abrange, atualmente, uma multiplicidade de técnicas e processos, entre os quais aqueles que dependem da ação de microorganismos e aqueles que utilizam culturas de tecidos vegetais *in vitro*. No presente texto, pretendemos restringir a discussão às aplicações comerciais e industriais da cultura de tecidos já constatada e a algumas aplicações potenciais. Durante os últimos 20 anos, verificou-se um aumento tanto no número de firmas que utilizam estas técnicas como na diversidade de espécies e tipos de aplicações.

Após o trabalho pioneiro de Morel (1960), com a eliminação de vírus de espécies de *Cymbidium* através da cultura de meristemas, esta técnica foi desenvolvida em escala industrial para a propagação rápida de orquídeas na França. Segundo Vacherot & Morel (1977), a cultura de tecidos foi responsável pela transformação da cultura de orquídeas de um trabalho artesanal para industrial, ao permitir a multiplicação rápida de material uniforme, de qualidade superior e com período de floração mais amplo, o que facilita a comercialização.

No Brasil, a propagação de orquídeas por cultura de meristemas está sendo feita em escala comercial por firmas como Equipesca (Campinas, SP) e Floralia (Niterói, RJ).

As duas vantagens principais da cultura de meristemas ou ápices caulinares são a elevada taxa de propagação vegetativa e a oportunidade de eliminar determinados patógenos. Estes foram os fatores que incrementaram a aplicação das técnicas a outras espécies agrícolas e ornamentais. A batata e o morango são duas espécies nas quais a cultura de tecidos é consagrada como método de produzir matrizes sadias, em escala comercial.

Minitubérculos de batata, formados por plantas provenientes de cultura de tecidos, integram esquemas de produção de batatas-semente no mundo inteiro, inclusive no Brasil, onde a produção da EMBRAPA (CNPFT e CNPH) é peça importante. Em Taiwan (Wang & Hu 1982), microtubérculos formados *in vitro* iniciam a seqüência de produção de batatas-semente.

Mudas de morango também são produzidas *in vitro* no Brasil e em outras partes do mundo (Boxus et al. 1977), numa taxa de milhões por ano. Verificamos nestes esquemas que as matrizes provenientes da cultura de tecidos são normalmente multiplicadas em vaso ou no campo, antes de serem comercializadas.

Um grande número de espécies de plantas ornamentais pode ser multiplicado *in vitro* para manter, e obter, matrizes livres de vírus e outros patógenos, e para multiplicar rapidamente novas cultivares. Quando o objetivo é simplesmente a propagação vegetativa, outros explantes, além do ápice caulinar, têm sido usados com êxito. Oglesby (1979), um dos numerosos floricultores americanos com seu próprio laboratório de cultura de tecidos, afirmou que obteve regeneração de 40 gêneros de plantas ornamentais entre os 90 testados.

A propagação vegetativa conserva o genótipo e fenótipo desejáveis de plantas já selecionadas. A aplicação comercial da cultura de tecidos, para melhoramento vegetal, na busca de novos genótipos, tem sido limitada. Até o presente momento, são poucas as firmas que fazem uso da cultura *in vitro* para outro aspecto do melhoramento, além da multiplicação rápida de plantas obtidas por métodos clássicos. Algumas instituições de pesquisa, no entanto, têm demonstrado que a cultura de embriões permite a obtenção de híbridos interespecíficos, que abortam quando deixados na planta. Esta e outras técnicas da cultura de tecidos proporcionaram a criação de novas cultivares comerciais.

¹ Ph.D., Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda., C.P. 1141, 13100 Campinas, SP.

A seleção massal, acoplada à propagação vegetativa, por exemplo, permitiu o melhoramento da população de couve-flor de verão cultivada no Nordeste, no trabalho desenvolvido pelo CNPH-EMBRAPA (Brasília, DF). A integração da cultura de tecidos em programas de melhoramento clássico é um campo que oferece opções de avanços rápidos, e deveria ser mais explorada comercialmente.

A maioria das firmas de biotecnologia visa ao melhoramento genético por métodos mais sofisticados: variação somaclonal, fusão de protoplastos e engenharia genética. Por estes métodos, podem ser obtidas combinações genéticas que não são possíveis por cruzamentos. Com a evolução destas técnicas, esperamos alcançar o ideal de poder escolher uma determinada característica e induzi-la numa cultivar já comercialmente aceita. Por serem técnicas novas, em fase de desenvolvimento e teste, os primeiros resultados comerciais estão começando a surgir nos relatórios de várias firmas. As perspectivas nesta área são animadoras.

Outra aplicação industrial distinta das anteriores é a produção *in vitro* de compostos secundários de interesse econômico. O melhoramento de linhagens, com maiores teores de substâncias farmacêuticas, por exemplo, para plantio no campo, pode ser auxiliado pelas técnicas já citadas. As vantagens freqüentemente citadas para a produção *in vitro* residem na seleção de linhagens de células com maiores teores da substância de interesse; no controle das condições ambientais, evitando variações sazonais; na preservação de espécie em extinção, colhidas indiscriminadamente por suas propriedades químicas; na maior facilidade de colheita, quando comparada com plantas que crescem em lugares de difícil acesso; e, possivelmente, na maior taxa de crescimento *in vitro*. A principal desvantagem é o custo de produção, acoplado a algumas dificuldades técnicas. Embora existam grupos fortes trabalhando com estes sistemas, não conhecemos ainda nenhum composto que seja produzido em escala industrial *in vitro*, por células vegetais. Não obstante, várias patentes protegem processos, como a produção de alcalóides (por exemplo, berberina), pigmentos (betanina, antocianina), enzimas (fosfodiesterase 5' guanilato) e outros, segundo Misawa (1977).

A amplitude das aplicações previstas pode ser vista nas patentes que visam à produção de fumo, para fabricação de cigarros; de calo de *Morus*, para ração de bicho-da-seda (Misawa 1977); de embriões de cacau produzidos por embriogênese somática, como fonte de chocolate *in vitro* (Janick et al. 1982); e de alérgenos produzidos por células em cultura (Staba 1980).

As células vegetais podem ser utilizadas como catalisadores na transformação de substratos, nos chamados "biorreatores", com uma eficiência de conversão maior que a síntese química. Neste caso, um substrato mais complexo é fornecido às células, que podem ser imobilizadas, e o produto, colhido num fluxo contínuo de meio nutritivo.

A cultura de tecidos vegetais tem sido um dos ramos mais ativos e mais lucrativos da biotecnologia, mesmo com as aplicações correntes relativamente simples. As perspectivas para avanços no melhoramento vegetal são das mais animadoras, principalmente em países como o Brasil, onde o campo está aberto para grandes contribuições da biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- BOXUS, P.; QUOIRIN, M. & LAINE, J.M. Large-scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell, tissue, and organ culture*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.130-43.
- JANICK, J.; WRIGHT, F.C. & HASEGAWA, P.M. *In vitro* production of cacao seed lipids. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 107(5):919-22, 1982.
- MISAWA, M. Production of natural substances by plant cell cultures described in Japanese patents. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. *Plant tissue culture and its biotechnological applications*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.17-26.
- MOREL, G.M. Producing virus-free cymbidiums. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, 29:495-7, July, 1960.
- OGLESBY, R.P. Tissue culture of ornamentals and flowers; problems and perspectives. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R. & CONSANTIN, M., ed. *Propagation of higher plants through tissue culture*. Washington, U.S. Dep. of Energy. Tec. Inf. Center, 1979. p.59-61.
- STABA, E.J. Secondary metabolism and biotransformation. In: STABA, E.J., ed. *Plant tissue cultures as a source of biochemicals*. Boca Raton, CRC Press, 1980. p.59-79.
- VACHEROT, M. & MOREL, G. Multiplication des orchidées. In: GAUTHERET, R.J., ed. *La culture des tissus et des cellules des végétaux*. Paris, Masson, 1977. p.254-8.
- WANG, P.J. & HU, G.Y. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *Am. Potato J.*, 59:33-7, 1982.

CLONAGEM E MELHORAMENTO DE PLANTAS IN VITRO

Otto J. Crocomo¹
A. Natal Gonçalves²
J.B. Cabral³

ABSTRACT - The parameters involved in the regeneration of intact plants from *in vitro* culture are discussed. Micropropagation technology *per se* can enhance propagation of economically important plant species. Data on the micropropagation of *Eucalyptus* with reversion to juvenility is presented. Other techniques, auxiliaries to plant improvement, such as somaclonal variation and immature embryo culture are also discussed. Data are presented on the regeneration of sugarcane variants tolerant to herbicides, and on the successful *in vitro* culture of immature embryos of interespecific crosses in *Phaseolus* with regeneration of hybrid plants.

INTRODUÇÃO

A regeneração de plantas intactas a partir de células e tecidos vegetais, retirados de seus doadores e mantidos *in vitro*, constitui o passo mais importante na micropropagação, e também no melhoramento de plantas, quando esta é feita por abordagens biotecnológicas.

A tecnologia da micropropagação é útil por si mesma, e pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos permitam alta frequência de regeneração de plantas. Por outro lado, no melhoramento de plantas, a tecnologia *in vitro* é um poderoso auxiliar, com vantagens qualitativas (obtenção de variantes somaclonais) e quantitativas (espaço e tempo), precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa convencional de melhoramento.

Um aspecto nesse contexto é que em muitas espécies a produção rápida e em larga escala de plantas geneticamente uniformes, ou seja, a sua propagação clonal, é particularmente importante. Entretanto, Ammirato et al. (1984) apontam o fato de que muitas espécies de plantas, apesar de facilmente produzirem sementes, podem produzi-las com baixo poder de germinação, e também que sementes de híbridos devem ser produzidas em cada vez e, se a espécie não apresentar macho-esterilidade, essa produção pode tornar-se cara. Além disso, alguns híbridos possuem características especiais, as quais, para não serem perdidas, devem ser clonadas: é o caso de árvores superiores. Aqueles autores ainda citam o fato de que, mesmo em culturas propagadas sexualmente, as plantas podem ser estéreis ou de baixíssima produção de sementes, como no caso de algumas culturas

de tubérculos. Neste caso, a micropropagação oferece a grande vantagem do alto índice de multiplicação, manutenção das características dos pais, ou daquelas melhoradas em um programa em que se somam abordagens biotecnológicas e melhoramento convencional, e de linhagens híbridas, além da possibilidade de obtenção de linhagens livres de doenças (cultura de meristemas).

A manipulação quantitativa e qualitativa de reguladores de crescimento nos meios de cultura tem permitido rápido crescimento de células (calos), seguido do desenvolvimento organizado de parte aérea e de raízes. Esta "organogênese" tem sido observada em muitas espécies de plantas, oferecendo rápida proliferação *in vitro*. Contudo, a formação de parte aérea e de raízes frequentemente excluem-se mutuamente, exigindo uma seqüência de transferências das culturas para meios de composição diferente, para que plantas intactas sejam regeneradas (Flick et al. 1983). Alternativamente a esse crescimento organizado *in vitro*, desponta a embriogênese de células somáticas: a transferência das culturas para meio com concentração mais baixa de auxina leva à formação de embriões. Estes passam por todos os estádios observados no desenvolvimento de embriões zigóticos, com a diferença de que derivam de células somáticas e não da fusão de gametas. Uma grande vantagem da embriogênese somática, em relação à organogênese, é que os embriões são bipolares, com meristemas apical e radicular, os quais, obviamente, são necessários para o desenvolvimento de plantas inteiras. Grande número de embriões somáticos podem ser produzidos em um único frasco de cultura e, quando em meio líquido, separam-se uns dos outros, facilitando a transferência para os estádios subseqüentes, que levam à regeneração de plantas (Ammirato 1983). Desse modo, clones podem ser estabelecidos, como no caso de dendê, atualmente em estágio experimental de campo. Os resultados iniciais demonstram uniformidade dentro de cada população das plantas clonadas; assim, a variação nas características dos frutos entre plantas, em um clone, não foi significativamente diferente daquela encontrada entre os frutos de cachos de uma única planta. Por outro lado, diferenças significativas foram observadas entre clones, como acontece

¹ Prof. Titular, Dept^o Química, ESALQ/USP, Coordenador Geral do Centro de Biotecnologia Agrícola, CEBTEC/FEALQ/CENA/USP, 13400 Piracicaba, SP.

² Prof. Assistente, Dept^o Silvicultura, ESALQ/USP, Pesquisador do Centro de Biotecnologia Agrícola, CEBTEC/FEALQ, 13400 Piracicaba, SP.

³ Pesquisador, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, 50000 Recife, PE.

A seleção massal, acoplada à propagação vegetativa, por exemplo, permitiu o melhoramento da população de couve-flor de verão cultivada no Nordeste, no trabalho desenvolvido pelo CNPH-EMBRAPA (Brasília, DF). A integração da cultura de tecidos em programas de melhoramento clássico é um campo que oferece opções de avanços rápidos, e deveria ser mais explorada comercialmente.

A maioria das firmas de biotecnologia visa ao melhoramento genético por métodos mais sofisticados: variação somaclonal, fusão de protoplastos e engenharia genética. Por estes métodos, podem ser obtidas combinações genéticas que não são possíveis por cruzamentos. Com a evolução destas técnicas, esperamos alcançar o ideal de poder escolher uma determinada característica e induzi-la numa cultivar já comercialmente aceita. Por serem técnicas novas, em fase de desenvolvimento e teste, os primeiros resultados comerciais estão começando a surgir nos relatórios de várias firmas. As perspectivas nesta área são animadoras.

Outra aplicação industrial distinta das anteriores é a produção *in vitro* de compostos secundários de interesse econômico. O melhoramento de linhagens, com maiores teores de substâncias farmacêuticas, por exemplo, para plantio no campo, pode ser auxiliado pelas técnicas já citadas. As vantagens freqüentemente citadas para a produção *in vitro* residem na seleção de linhagens de células com maiores teores da substância de interesse; no controle das condições ambientais, evitando variações sazonais; na preservação de espécie em extinção, colhidas indiscriminadamente por suas propriedades químicas; na maior facilidade de colheita, quando comparada com plantas que crescem em lugares de difícil acesso; e, possivelmente, na maior taxa de crescimento *in vitro*. A principal desvantagem é o custo de produção, acoplado a algumas dificuldades técnicas. Embora existam grupos fortes trabalhando com estes sistemas, não conhecemos ainda nenhum composto que seja produzido em escala industrial *in vitro*, por células vegetais. Não obstante, várias patentes protegem processos, como a produção de alcalóides (por exemplo, berberina), pigmentos (betanina, antocianina), enzimas (fosfodiesterase 5' guanilato) e outros, segundo Misawa (1977).

A amplitude das aplicações previstas pode ser vista nas patentes que visam à produção de fumo, para fabricação de cigarros; de calo de *Morus*, para ração de bicho-da-seda (Misawa 1977); de embriões de cacau produzidos por embriogênese somática, como fonte de chocolate *in vitro* (Janick et al. 1982); e de alérgenos produzidos por células em cultura (Staba 1980).

As células vegetais podem ser utilizadas como catalisadores na transformação de substratos, nos chamados "biorreatores", com uma eficiência de conversão maior que a síntese química. Neste caso, um substrato mais complexo é fornecido às células, que podem ser imobilizadas, e o produto, colhido num fluxo contínuo de meio nutritivo.

A cultura de tecidos vegetais tem sido um dos ramos mais ativos e mais lucrativos da biotecnologia, mesmo com as aplicações correntes relativamente simples. As perspectivas para avanços no melhoramento vegetal são das mais animadoras, principalmente em países como o Brasil, onde o campo está aberto para grandes contribuições da biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- BOXUS, P.; QUOIRIN, M. & LAINE, J.M. Large-scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell, tissue, and organ culture*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.130-43.
- JANICK, J.; WRIGHT, F.C. & HASEGAWA, P.M. *In vitro* production of cacao seed lipids. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 107(5):919-22, 1982.
- MISAWA, M. Production of natural substances by plant cell cultures described in Japanese patents. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. *Plant tissue culture and its biotechnological applications*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.17-26.
- MOREL, G.M. Producing virus-free cymbidiums. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, 29:495-7, July, 1960.
- OGLESBY, R.P. Tissue culture of ornamentals and flowers: problems and perspectives. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R. & CONSTANTIN, M., ed. *Propagation of higher plants through tissue culture*. Washington, U.S. Dep. of Energy. Tec. Inf. Center, 1979. p.59-61.
- STABA, E.J. Secondary metabolism and biotransformation. In: STABA, E.J., ed. *Plant tissue cultures as a source of biochemicals*. Boca Raton, CRC Press, 1980. p.59-79.
- VACHEROT, M. & MOREL, G. Multiplication des orchidées. In: GAUTHERET, R.J., ed. *La culture des tissus et des cellules des végétaux*. Paris, Masson, 1977. p.254-8.
- WANG, P.J. & HU, G.Y. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *Am. Potato J.*, 59:33-7, 1982.

CLONAGEM E MELHORAMENTO DE PLANTAS IN VITRO

Otto J. Crocomo¹
A. Natal Gonçalves²
J.B. Cabral³

ABSTRACT - The parameters involved in the regeneration of intact plants from *in vitro* culture are discussed. Micropropagation technology *per se* can enhance propagation of economically important plant species. Data on the micropropagation of *Eucalyptus* with reversion to juvenility is presented. Other techniques, auxiliaries to plant improvement, such as somaclonal variation and immature embryo culture are also discussed. Data are presented on the regeneration of sugarcane variants tolerant to herbicides, and on the successful *in vitro* culture of immature embryos of interespecific crosses in *Phaseolus* with regeneration of hybrid plants.

INTRODUÇÃO

A regeneração de plantas intactas a partir de células e tecidos vegetais, retirados de seus doadores e mantidos *in vitro*, constitui o passo mais importante na micropropagação, e também no melhoramento de plantas, quando esta é feita por abordagens biotecnológicas.

A tecnologia da micropropagação é útil por si mesma, e pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos permitam alta frequência de regeneração de plantas. Por outro lado, no melhoramento de plantas, a tecnologia *in vitro* é um poderoso auxiliar, com vantagens qualitativas (obtenção de variantes somaclonais) e quantitativas (espaço e tempo), precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa convencional de melhoramento.

Um aspecto nesse contexto é que em muitas espécies a produção rápida e em larga escala de plantas geneticamente uniformes, ou seja, a sua propagação clonal, é particularmente importante. Entretanto, Ammirato et al. (1984) apontam o fato de que muitas espécies de plantas, apesar de facilmente produzirem sementes, podem produzi-las com baixo poder de germinação, e também que sementes de híbridos devem ser produzidas em cada vez e, se a espécie não apresentar macho-esterilidade, essa produção pode tornar-se cara. Além disso, alguns híbridos possuem características especiais, as quais, para não serem perdidas, devem ser clonadas: é o caso de árvores superiores. Aqueles autores ainda citam o fato de que, mesmo em culturas propagadas sexualmente, as plantas podem ser estéreis ou de baixíssima produção de sementes, como no caso de algumas culturas

de tubérculos. Neste caso, a micropropagação oferece a grande vantagem do alto índice de multiplicação, manutenção das características dos pais, ou daquelas melhoradas em um programa em que se somam abordagens biotecnológicas e melhoramento convencional, e de linhagens híbridas, além da possibilidade de obtenção de linhagens livres de doenças (cultura de meristemas).

A manipulação quantitativa e qualitativa de reguladores de crescimento nos meios de cultura tem permitido rápido crescimento de células (calos), seguido do desenvolvimento organizado de parte aérea e de raízes. Esta "organogênese" tem sido observada em muitas espécies de plantas, oferecendo rápida proliferação *in vitro*. Contudo, a formação de parte aérea e de raízes frequentemente excluem-se mutuamente, exigindo uma seqüência de transferências das culturas para meios de composição diferente, para que plantas intactas sejam regeneradas (Flick et al. 1983). Alternativamente a esse crescimento organizado *in vitro*, desponta a embriogênese de células somáticas: a transferência das culturas para meio com concentração mais baixa de auxina leva à formação de embriões. Estes passam por todos os estádios observados no desenvolvimento de embriões zigóticos, com a diferença de que derivam de células somáticas e não da fusão de gametas. Uma grande vantagem da embriogênese somática, em relação à organogênese, é que os embriões são bipolares, com meristemas apical e radicular, os quais, obviamente, são necessários para o desenvolvimento de plantas inteiras. Grande número de embriões somáticos podem ser produzidos em um único frasco de cultura e, quando em meio líquido, separam-se uns dos outros, facilitando a transferência para os estádios subseqüentes, que levam à regeneração de plantas (Ammirato 1983). Desse modo, clones podem ser estabelecidos, como no caso de dendê, atualmente em estágio experimental de campo. Os resultados iniciais demonstram uniformidade dentro de cada população das plantas clonadas; assim, a variação nas características dos frutos entre plantas, em um clone, não foi significativamente diferente daquela encontrada entre os frutos de cachos de uma única planta. Por outro lado, diferenças significativas foram observadas entre clones, como acontece

¹ Prof. Titular, Dept^o Química, ESALQ/USP, Coordenador Geral do Centro de Biotecnologia Agrícola, CEBTEC/FEALQ/CENA/USP, 13400 Piracicaba, SP.

² Prof. Assistente, Dept^o Silvicultura, ESALQ/USP, Pesquisador do Centro de Biotecnologia Agrícola, CEBTEC/FEALQ, 13400 Piracicaba, SP.

³ Pesquisador, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, 50000 Recife, PE.

entre plântulas, em um processo normal de propagação, nessa espécie altamente heterozigótica (Ammirato et al. 1984).

Em contraste, com plantas regeneradas de regiões meristemáticas, que geralmente são uniformes, as plantas obtidas através de organogênese ou de embriogênese (que incluem o estágio de calos), podem apresentar variabilidade genética, com instabilidade cromossômica, e produção de aneuplóides (D'Amato 1977). Para efetivamente diminuir esses fenômenos indesejáveis na propagação clonal, um dos artifícios seria a freqüente transferência para meios de cultura recém-preparados (Evans & Gamborg 1982), como no caso de plantas de *Daucus carota*, cujo fenótipo era normal desde que as suspensões, em que embriões somáticos foram induzidos, fossem mantidas por curtos períodos de tempo (Krikorian 1982).

Só recentemente é que a variabilidade genética apresentada pelas plantas em cultura foi reconhecida como grande potencial para auxiliar programas de melhoramento de plantas, e atualmente essa abordagem é conhecida como tecnologia da variação somaclonal.

O valor agrônomico da instabilidade genética, obtida *in vitro*, está sendo atualmente reconhecido por vários grupos de pesquisadores. Em muitos sistemas, a instabilidade cromossômica mais freqüentemente observada é a poliploidia, que tem sido atribuída ao crescimento seletivo *in vitro* de células poliplóides, que normalmente não se dividem e que pré-existiam no explante (D'Amato 1977). Plantas poliplóides têm sido regeneradas de cultura *in vitro* e utilizadas comercialmente, como as ornamentais.

Um exemplo da pré-existência de instabilidade genética é o caso de *Pelargonium*: plantas obtidas de estacas de caules, mantidas *in vivo*, regeneraram plantas uniformes, enquanto estacas de raízes e pecíolos, mantidas *in vivo*, e calos (*in vitro*) regeneraram plantas com características diferentes (Skirvin & Janick 1976). Essa observação inicial, também obtida por outros autores em outras espécies de plantas, ao longo dos últimos anos, sugere que alguma variação está correlacionada com o material doador e pré-existe no tecido utilizado para introduzir a cultura.

Uma outra característica da instabilidade genética é a aneuploidia, que envolve a perda ou o ganho de alguns cromossomos, e que também é freqüentemente observada em cultura *in vitro*. O acúmulo de plantas aneuplóides tem sido associado à idade das culturas (D'Amato 1977). Outros tipos de variações têm sido detectados *in vitro*, como aberrações na anáfase e rearranjos cromossômicos, estes observados em clones de batata, regenerados de protoplastos do mesófilo foliar (Shepard et al. 1980).

Por outro lado, vários pesquisadores têm relatado detecção de variação somaclonal induzida pela concentração de reguladores de crescimento, no meio de cultura.

Desse modo, provavelmente a variabilidade observada seria o resultado tanto da instabilidade genética pré-existente como de alterações genéticas induzidas durante o processo da cultura *in vitro* (Ammirato et al. 1984). De qualquer modo, considera-se que a variação somaclonal é o resultado das variações numéricas e estruturais nos cromossomos, das modificações genéticas nucleares e da variabilidade genética citoplasmática. Assim, utilizando-se de métodos apropriados de seleção, todas as classes de variação poderão ser utilizadas como auxiliares em um programa de melhoramento.

CLONAGEM IN VITRO

As plantas propagadas através do ciclo sexual resultam da fusão dos gametas dos pais e desenvolvem-se a partir de sementes. Muitas vezes, as plântulas podem apresentar variabilidade genética, cada uma sendo o resultado de uma dada combinação de genes, determinada pela meiose.

Por outro lado, na propagação assexuada (vegetativa), as características de qualquer planta, individualmente, são perpetuadas pelo crescimento e multiplicação de células, nas quais os genes são copiados exatamente, em cada divisão mitótica. Cada nova planta, assim produzida, pode ser considerada como uma extensão da linha celular somática do indivíduo. Um grupo dessas plantas, assim reproduzido (assexualmente), é chamado clone (George & Sherrington 1984). Muitas plantas agronomicamente cultivadas são propagadas vegetativamente e mantidas como clones; é o caso de batata, cana-de-açúcar, frutíferas, árvores florestais, plantas ornamentais, hortaliças etc.

Deve-se enfatizar que a decisão de se propagar uma planta por sementes, por técnicas vegetativas tradicionais (macropropagação), ou por cultura de tecido (micropropagação), depende não somente da espécie da planta considerada, mas também do objetivo agrônomico ou silvicultural. O caso da batata pode ser utilizado como exemplo da combinação de abordagens biotecnológicas com métodos convencionais. Assim, plantas de batata podem ser produzidas por sementes durante um programa de melhoramento, para seleção de novas variedades: os métodos *in vitro* são então utilizados para multiplicar certas linhagens durante esse programa, e também para propagar clones livres de doenças. Por sua vez, a macropropagação, que usa tubérculos de batata crescendo no campo, é empregada para produzir material para plantio.

Um outro exemplo dessa combinação pode ser a propagação de híbridos interespecíficos. Estes são advindos de embriões imaturos, coletados antes que a semente aborte, como resultado da incompatibilidade entre os pais em cruzamento interespecífico, realizado pelo processo convencional. Os embriões imaturos são cultivados em meios de cultura e regeneram plantas híbridas, como no caso de cruzamentos entre diferentes espécies de feijão *Phaseolus*, que discutiremos mais adiante.

A micropropagação pode ser feita (George & Sherrington 1984) pela cultura de pontas de ramos; cultura de meristemas (para eliminação de doenças); cultura de nós; cultura de gemas laterais; cultura de gemas axilares; regeneração direta de parte aérea, a partir dos explantes (explantes foliares ou segmentos de caule, sem passar pela fase de calo); regeneração indireta de parte aérea, a partir de calos; embriogênese indireta, a partir de calos embriogênicos ou culturas em suspensão (isolamento de calos com capacidade para formar embriões somáticos); formação de órgãos de armazenamento, a partir de cultura de tecidos ou de órgãos.

A premissa biológica dessas abordagens biotecnológicas é a de que todas as células das plantas são totipotentes, ou seja, quando colocadas em ambiente apropriado (condições químicas e físicas), podem regenerar plantas inteiras (iguais ou variantes). Entretanto, essa expressão de totipotência está confinada a um número relativamente pequeno de células, chamadas meristemóides. Meristemóides são células morfogeneticamente competentes, que respondem às variações do meio, levando à produção de partes aéreas, raízes e embriões.

Os meristemóides podem ser distinguidos nos calos quando, por repetidas divisões, produzem aglomerados compactos de pequenas células, isodiamétricas, com parede celular fina, apresentando núcleos proeminentes, citoplasma denso e poucos vacúolos (Murashige 1984). Os embriões imaturos e os meristemas apicais contêm células desse tipo, e respondem a estímulos organogênicos, como aqueles usados pelas várias técnicas *in vitro*.

Pode-se dizer que a regeneração de plantas *in vitro* será universalmente possível (aplicável a todas as espécies vegetais) quando se puder controlar a transformação de células não-meristemóides em células meristemóides (Murashige 1984). Essa idéia é inerente a todas as estratégias biotecnológicas em plantas, uma vez que a escolha da parte da planta que vai dar o explante, a idade dessa planta e a sua fase de desenvolvimento fisiológico, além de outros parâmetros, estão sempre presentes na introdução material em cultura *in vitro*.

Não vamos discutir estes ou outros parâmetros. Vamos nos ater, no caso da micropropagação, à fase de desenvolvimento fisiológico da planta doadora do explante.

Um dos grandes desafios na propagação é que o desenvolvimento de plantas normalmente progride através de uma fase juvenil, que não floresce, até a fase madura, adulta, que floresce. O desenvolvimento está associado ao declínio simultâneo da competência para reproduzir plantas e órgãos adventícios.

Na literatura pertinente, é comum encontrar referências de que material adulto, quando introduzido em culturas *in vitro*, usualmente não regeneram plantas; portanto, árvores perenes devem ser obtidas a partir de plantas na fase juvenil de desenvolvimento (Murashige 1984).

A experiência do nosso grupo, entretanto, aponta a possibilidade real de se conseguir *in vitro* reversão à juvenilidade, a partir de material adulto de *Eucalyptus*. O protocolo desenvolvido em nossos laboratórios permite a reversão à juvenilidade, na presença de 6-BAP, com taxa média de clonagem calculada em $7,5 \times 10^1$ /ano (Gonçalves 1982).

Para explicar esse fenômeno, lançamos uma hipótese baseada em algumas premissas. Auxinas e citocininas agem de maneira inversa nos sistemas alostéricos da biossíntese de ácidos nucléicos e nos níveis de transcrição e de tradução, pondo em evidência a biossíntese de RNA's modificados (rRNA, tRNA). Agindo como efetadores alostéricos, as auxinas promoveriam a incorporação de UMP em RNA e aumentariam a taxa GMP/AMP. Simultaneamente, as citocininas induziriam a especificidade de tRNA's para aminoácidos, com letra inicial U do códon.

Observações relatadas na literatura, sobre sistemas de células isoladas, mostram que o "pool" de ATP, as taxas de síntese de RNA e de DNA e valores para o "turnover" de RNA são maiores em células embriogênicas do que em células não-embriogênicas (Sharp et al. 1980).

A regulação da biossíntese do ribonucleotídeo e dos desoxirribonucleotídeos é feita por uma série de enzimas alostéricas. Por outro lado, o fluxo da informação genética das seqüências de genes do DNA do núcleo para o sistema sintetizador de proteínas do citoplasma, em células eucarióticas, é formado por RNA-polimerase I ou A (núcleolo), por RNA-polimerase II ou B e RNA-polimerase III ou C (núcleo) e pelo sistema de síntese de proteína (citoplasma).

A nossa hipótese (Crocomo et al. 1985) é de que a hereditariedade das células somáticas é uma manifestação dos mecanismos alostéricos na regulação da biossíntese e no deslocamento das relações entre e dentro dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, e na transcrição, processamento e tradução de informações genéticas, na diferenciação de desenvolvimento celular. As citocininas e auxinas agem inversamente nessa manifestação. Assim, a ação isolada ou conjunta dos reguladores de crescimento provocaria alterações na biossíntese e no deslocamento das relações entre e dentro dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos e no fluxo de informações genéticas, conduzindo as células à diferenciação e ao desenvolvimento. Dependendo da origem e do estado fisiológico das células e da quantidade e qualidade do estímulo dos reguladores de crescimento, as células readquirem diferentes capacidades morfogenéticas, tanto para a diferenciação como para o desenvolvimento.

MELHORAMENTO DE PLANTAS

As abordagens biotecnológicas para melhoramento de plantas assentam-se intrinsecamente em: a) manipulação do material genético *in vitro*, através das técnicas de RNA recombinante (Engenharia Genética, senso estrito); e b) manipulação do material genético *in vitro*. Esta última aborda-

gem é realizada utilizando-se técnicas de cultura de tecidos de plantas *in vitro* (Engenharia Genética, sentido amplo).

Nesse sentido, a cultura *in vitro* de embriões imaturos, de anteras, de protoplastos e o produto da fusão de protoplastos (híbridos e cíbridos somáticos), e calos levando à variação somaclonal ou gametoclinal são estratégias auxiliares para a produção de variantes genéticas com características agronômicas desejáveis.

Nesse contexto, apresentaremos dois exemplos com os quais estamos familiarizados: variação somaclonal em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e obtenção de plantas híbridas de feijão (*Phaseolus* spp.), advinda de cruzamentos interespecíficos.

Cana-de-açúcar — O cultivo de tecidos de cana-de-açúcar *in vitro*, visando ao melhoramento, tem sido estudado desde a década de 50, quanto a: influência do genoma do material doador, alterações genéticas das células não diferenciadas (aneuploidias, poliploidia e mosaicos cromossômicos), variações somaclonais das plantas regeneradas e efeitos da composição hormonal e nutricional do meio de cultura. O nosso laboratório iniciou seus trabalhos sobre variação somaclonal em cana-de-açúcar, em 1977.

Para obter variantes somaclonais tolerantes a herbicidas, um protocolo foi desenvolvido no nosso laboratório, o qual permite a regeneração de plantas de cana-de-açúcar tolerantes aos herbicidas Ametrin e Dalapon. Explantes foliares internodais das vars. CB41-76, IA48-65 e NA56-79 foram cultivados *in vitro* em presença de doses crescentes de cada um desses herbicidas. As doses utilizadas foram 0, 20, 40, 80 e 160 ppm, correspondentes àquelas usualmente empregadas no campo. A seleção foi feita ao nível celular, seja em meio sólido, seja em meio líquido. Neste último caso, as células em suspensão foram plaqueadas, obtendo-se colônias celulares que se prestam para seleção de linhagens celulares. Posteriormente, foram regeneradas plantas dos calos tolerantes aos níveis de 20 e 40 ppm de Ametrin. O comportamento bioquímico foi acompanhado nos calos submetidos aos herbicidas (condições *in vitro*), bem como nas plantas de cana-de-açúcar regeneradas de calos não expostos a esses agentes, as quais foram submetidas ao Dalapon (condições *in vivo*) (Crocomo et al. 1984).

Em células de cana-de-açúcar, em suspensão, observou-se que o Ametrin inibe a transcrição de DNA em mRNA, medida através de incorporação de ATP-¹⁴C ou de UTP-³H nas moléculas de RNA mensageiro. A inibição por esse herbicida também é observada a nível de tradução de mRNA em proteína, medida pela incorporação de leucina-¹⁴C em moléculas protéicas.

Feijão — A cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) tem importância alimentar e econômica no Brasil, embora no Nordeste o seu cultivo seja limitado, principalmente pela adversidade do clima. Sendo a região semi-árida do Nordeste atingida pelo problema de precipitação pluvial e da irregularidade na sua distribuição, tomam-se neces-

sários esforços para obter genótipos tolerantes a estresse hídrico, sais e altas temperaturas. Outras espécies cultivadas na região e em outras regiões semi-áridas (dos Estados Unidos da América e do México), como a fava (*Phaseolus lunatus*) e o feijão-teperi (*Phaseolus acutifolius*), podem ser utilizadas como fontes de resistência a tais condições climáticas, através da hibridização interespecífica. A fertilização entre *Phaseolus vulgaris* (♀) x *Phaseolus acutifolius* (♂) e *Phaseolus vulgaris* (♀) x *Phaseolus lunatus* (♂) ocorre, porém, devido à incompatibilidade existente entre as necessidades nutritivas do embrião híbrido e o endosperma: o embrião aborta e a vagem formada cai. Esses cruzamentos podem ser viabilizados com auxílio da cultura *in vitro* (Crocomo & Cabral 1985).

Nos nossos laboratórios, desenvolvemos metodologia para cultivar embriões imaturos de feijão *in vitro* (Cabral 1985). A espécie *Phaseolus vulgaris* (cvs. Gordo, Goiano Precoce, Carioca Precoce, Canário 101, Oax-62 e Califórnia Small White) foi utilizada como fêmea, enquanto *Phaseolus lunatus* (cvs. IPA-1, G-25143 e Linha F2) e *Phaseolus acutifolius* (cvs. G-40018, G-40064, G-40002, G-40035, T. Branco e T. Roxo) foram usadas como macho.

Os embriões híbridos, provenientes de cruzamentos entre as espécies *Phaseolus vulgaris* (♀) x *Phaseolus acutifolius* (♂), muitas vezes atingiram estágio de desenvolvimento cotiledonar (cotilédones assimétricos) sem que a semente chegasse à maturidade. Por outro lado, os embriões advindos de cruzamentos entre *Phaseolus vulgaris* (♀) x *Phaseolus lunatus* (♂) apresentaram menor desenvolvimento; tinham um maior índice de anormalidade e não atingiram o estágio de desenvolvimento cotiledonar. Em meio de cultura, foram inoculados 44 embriões híbridos, dos quais 8 se diferenciaram, levando à formação de plantas. Esses embriões provieram de cruzamentos entre as cultivares Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), Califórnia (♀) x G-40002 (♂), Califórnia (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F2 (♂) e Gordo (♀) x G-40002 (♂). Destes, apenas 3 formaram plântulas intactas, e resultaram dos cruzamentos entre Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F2 (♂) e Gordo (♀) x G-40002 (♂).

REFERÊNCIAS

- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan, 1983. vol. 1, p.82-113.
- AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; FLICK, C.E.; WHITAKER, R.J. & SHARP, W.R. Biotechnology and agricultural development. *Trends in Biochemistry*, 2(3):1-6, 1984.

- CABRAL, J.B. Obtenção de híbridos interespecíficos de feijão (*Phaseolus*) *in vitro*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1985. 65p. Tese Mestrado.
- CROCOMO, O.J.; OCHOA-ALEJO, N.; MACHADO, I.S. & MURAYAMA, M.Y. *In vitro* selection of sugarcane (*Saccharum* spp.) variants tolerant to herbicide. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE APPLICATION TO CROP IMPROVEMENT. *Proceedings* . . . Prague, Czechoslovak Academy of Sciences, 1984. p.23-31.
- CROCOMO, O.J. & CABRAL, J.B. Interspecific hybridization in *Phaseolus*; embryo axis culture. In: CROCOMO, O.J.; TAVARES, F.C.A.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BRAVO, J.E. & PADDOCK, E.F. *Biotechnology of plants and microorganisms*. s.l. The Ohio State Univ. Press, 1985. Prelo.
- CROCOMO, O.J.; BRASIL, O.G. & GONÇALVES, A.N. Plant cell lines selection *in vitro*. In: CROCOMO, O.J.; TAVARES, F.C.A.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BRAVO, J.E. & PADDOCK, E.F. *Biotechnology of plants and microorganisms*. s.l. The Ohio State Univ. Press, 1985. Prelo.
- D'AMATO, F. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. *Plant cell, tissue and organ culture*. New York, Springer-Verlag, 1977. p.343-57.
- EVANS, D.A. & GAMBORG, O.L. Chromosome stability of plant cell suspension cultures. *Plant Cell Report*, 1:104-7, 1982.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A. & SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan, 1983. vol. 1, p.13-81.
- GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenildade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*. S.T. Blake *in vitro*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1982. 97p. Tese Mestrado.
- KRIKORIAN, A.D. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev.*, 57:151-218, 1982.
- MURASHIGE, T. Parameters in regeneration of plants *in vitro*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE APPLICATION TO CROP IMPROVEMENT. *Proceedings* . . . Prague, Czechoslovak Academy of Sciences, 1984.
- SHARP, W.R.; SONDHAL, M.R.; CALDAS, L.S. & MARAFFA, S. B. The physiology of *in vitro* embryogenesis. *Horticulture reviews*, 2:268-310, 1980.
- SHEPARD, J.F.; BINDNEY, D. & SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208:17-24, 1980.
- SKIRVIN, R.M. & JANICK, J. Tissue culture induced variation in scented *Pelargonium* spp. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101:281-90, 1976.

METODOLOGIA DE SELEÇÃO IN VITRO PARA RESISTÊNCIA A FATORES CAUSADORES DE ESTRESSE

Rolf Dieter Illg¹

ABSTRACT - With the objective of developing *in vitro* alternatives for producing tomato plants resistant to *Phytophthora infestans* toxins, callus culture were established from hypocotyl segments and then incubated in the presence of the toxin extract of that fungus. After 3 weeks of treatment 50% of the callus showed necrotic areas. Selection of callus resistance to the toxin was possible through successive subculturing of the sensitive ones.

INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos vegetais estão sendo bastante difundidas no melhoramento de plantas, e atualmente já existem plantas, produzidas pela cultura de tecidos, sendo vendidas comercialmente. Os esforços para desenvolver pesquisas no campo da cultura de células e tecidos de plantas vêm aumentando a cada ano, tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos. O fato de que as plantas podem ser propagadas por células simples, torna possível a aplicação dos conceitos e técnicas da genética microbiana às plantas.

A utilização da cultura de tecidos para propagação clonal é baseada na suposição de que os tecidos mantêm-se geneticamente estáveis, quando retirados da planta parental e colocados em cultura. Esta afirmação é válida quando a multiplicação ocorre a partir do desenvolvimento direto de gemas axilares ou apicais. Neste caso, todas as plantas desenvolvidas, via de regra, serão cópias exatas da planta parental. Contudo, quando a formação de brotos dá-se a partir de calos, ocorrem freqüentemente variantes fenotípicos entre as plantas regeneradas (Chaleff 1983). A freqüência desses tipos aberrantes aumenta com a duração do tempo em que o calo é mantido *in vitro* (Murashige 1974, Skirvin & Janick 1976).

Existem atualmente vários relatos de novos variantes obtidos pela cultura de tecidos. Estes novos variantes referem-se a modificações, tanto em características morfológicas como fisiológicas, qualitativas e quantitativas, correspondendo freqüentemente a diferenças ao nível cromossômico, nuclear e citoplasmático, em relação às plantas originais. O interesse na utilização dessa variação (variação somaclonal) no melhoramento de plantas tem sido grandemente despertado nos últimos 5 anos, principalmente a partir do momento em que houve uma associação íntima entre cultivadores de células e melhoristas vegetais. A literatura contém excelentes revisões sobre o assunto (Larkin & Scowcroft 1981, Scowcroft & Larkin 1982, Earle & Demarly 1982 e Larkin & Scowcroft 1983).

Seleção de linhagens celulares variantes

À medida que as células se propagam em cultura, vai surgindo uma grande quantidade de mutações espontâneas, e, além disso, a exposição à radiação e a certas substâncias químicas pode aumentar a freqüência de formação de variantes.

A aplicação de pressões de seleção em populações grandes de células, cultivadas sob condições ambientais praticamente homogêneas, permite isolar mutantes de aplicação imediata, tais como linhagens resistentes a herbicidas, a altas concentrações de íons de metais tóxicos e a toxinas produzidas por patógenos, por exemplo (Widholm 1983).

Apesar de existirem limitações quanto ao uso difundido de sistemas de seleção em culturas de células, limitações essas relacionadas principalmente com a capacidade de regeneração dos clones celulares selecionados e de expressão do fenótipo celular na planta inteira, esta técnica oferece um potencial expressivo e deve apresentar contribuições importantes nos próximos 5 a 10 anos.

Com o objetivo de obter plantas de tomate cv. Angela Gigante resistentes à doença da requeima, utilizando-se de técnicas de seleção *in vitro*, foi desenvolvida a metodologia descrita a seguir.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de calos: Sementes de tomate cv. Angela Gigante, do grupo Santa Cruz, foram esterilizadas superficialmente em solução aquosa a 30% de hipoclorito de sódio comercial, durante 20 minutos, com agitação. Segmentos de 2 mm de hipocótilos foram inoculados em meio de cultura contendo a metade da concentração de sais MS (Murashige & Skoog 1962), acrescido de BAP 10 μ M antes e IAA 1 μ M após autoclavagem. Os inóculos foram mantidos a 25°C, com fotoperíodo de 16 h de luz.

2. Obtenção de toxina de *Phytophthora infestans*: Isolados do fungo, correspondendo às raças 1.4; 1-4 e 1-11, foram mantidos alternadamente em meio de cultura: a) batata, dextrose e ágar (BDA)+ cenoura; e b) rodela de batata crua esterilizada. A toxina difusível no meio de cultura

¹ Dept^o de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, 13100 Campinas, SP.

líquido foi obtida de culturas de 10.000 esporângios do fungo, inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 20 ml de meio líquido (sais MS + 400 mg/l, asparagina, + 400 mg/l, glutamina, + 1 mg/l, tiamina, + 20 g/l, sacarose; pH 5,1; 20°C, no escuro). Após 12 a 14 dias de crescimento, que correspondem ao máximo de produção de toxina biologicamente ativa (Stolle & Schüber 1984), as culturas do fungo foram filtradas para separação dos micélios, e o filtrado, mantido a -20°C.

3. Seleção de calos: Calos de 12 dias, provenientes de segmentos de hipocótilos, foram colocados em meio de cultura contendo o filtrado da toxina adicionado de BAP (10 µM) e ágar (7 g/l), antes, e IAA (1 µM), após autoclavagem. Transferências para novos meios de cultura contendo toxina foram realizadas a cada 3 semanas.

4. Regeneração de plantas: O meio utilizado para regeneração de plantas foi o mesmo descrito para indução de calos, suprimindo-se apenas o IAA. O enraizamento das plantas regeneradas foi efetuado em meio sem fitorreguladores, e as plantas enraizadas foram transferidas para vermiculita. Uma vez consolidado o sistema radicular, as plantas foram transferidas para o campo a fim de que o ciclo fosse completado até a frutificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três semanas após o início do tratamento com toxina, observaram-se dois fenótipos de calos: a) insensíveis à toxina, os quais permaneceram semelhantes aos do controle; e b) sensíveis à toxina, os quais adquiriram coloração escura, indicando necrose do tecido (Fig. 1). O mesmo efeito foi observado para toxinas de qualquer uma das 3 raças de fungo utilizadas. Os calos sensíveis à toxina foram subcultivados para novo meio, com a respectiva toxina, e após 9 semanas os calos apresentaram crescimentos de setores celulares supostamente resistentes à ação da toxina (Fig. 2 e 3). Estes setores desenvolveram calos resistentes, que eram facilmente destacados do restante do calo, já completamente necrosado (Fig. 4).

Dos calos resistentes, foram regeneradas plantas que atualmente estão no campo para completarem o ciclo vegetativo e reprodutivo. Os testes de resistência serão feitos nas progênes das plantas provenientes de calos resistentes, para analisar a natureza das características de resistência, sejam elas genéticas ou epigenéticas, monogênicas ou poligênicas.

Behnke (1979, 1980) desenvolveu metodologia semelhante e selecionou calos di-haplóides de batata (*Solanum tuberosum*), os quais eram resistentes ao filtrado de *Phytophthora infestans*. No mesmo trabalho, o autor cita que as folhas de plantas, regeneradas de linhagens de calos resistentes, formavam calos, em meio contendo toxina, mais rapidamente do que as folhas das plantas-controle.

Paralelamente ao trabalho com toxina, metodologia semelhante está sendo utilizada em sistemas de seleção in

vitro, para concentrações elevadas de NaCl (1; 1,5 e 2%); concentrações elevadas de KAl (SO₄)₂ (100, 200, 400 e 800 µM); e herbicida as-triazinônico (Metribuzin a 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1%). Dos calos sobreviventes dos diferentes tratamentos foram regeneradas plantas que serão testadas quanto a resistência ou tolerância aos fatores seletivos utilizados.



FIG. 1. Seleção *in vitro* de calo de tomate para resistência à toxina de *Phytophthora infestans*: a) esquerda — tratamento controle, sem toxina; b) calos cultivados durante 3 semanas em filtrado contendo toxina da raça 1-4 de *P. infestans*.



FIG. 2. Calos cultivados durante 9 semanas em filtrado contendo toxina da raça 1-4 de *P. infestans*. Aparecimento de setores celulares resistentes nos calos já necrosados pela ação da toxina.

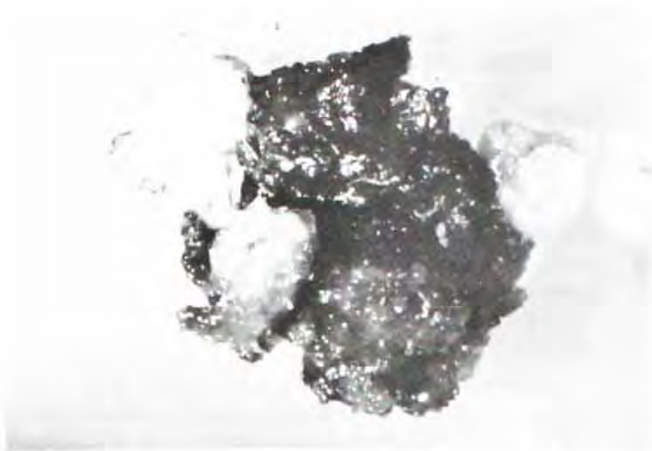


FIG. 3. Setores celulares resistentes à toxina da raça 1-4 de *P. infestans*, após 11 semanas de tratamento.



FIG. 4. Setores celulares resistentes à toxina da raça 1-11 de *P. infestans*, após 11 semanas de tratamento.

REFERÊNCIAS

- BEHNKE, M. Selection of potato callus for resistance of cultures filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.*, 55:69, 1979.
- BEHNKE, M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.*, 56:151, 1980.
- CHALEFF, R.S. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science*, 219(4585):676, 1983.
- EARLE, E.D. & DEMARLY, Y., ed. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. s.l., Prayer, 1982.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation; a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60:197, 1981.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation and crop improvement. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C. & HOLLAENDER, A. ed. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. s.l., Plenum Press, 1983. p.289.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473, 1962.
- SCOWCROFT, W.R. & LARKIN, P.J. Somaclonal variation; a new option for plant improvement. In: VASIL, I.K.; SCOWCROFT, W.R. & FREY, K.J., ed. *Plant improvement and somatic cell genetics*. s.l., Academic Press, 1982. p.159.
- SKIRVIN, R.M. & JANICK, J. *J. Amer. Soc. Hort. Science*, 101:281, 1976.
- STOLLE, K. & SHUBER, B. Wirkung eines toxins von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf Kartoffelknollengewebe. *Potato Res.*, 27:173, 1984.
- WIDHOLM, J.M. Isolation and characterization of mutant plant cell cultures. In: SEN, S.K. & GILES, K.L., ed. *Plant cell culture in crop improvement*. s.l., Plenum Press, 1983. p.71.

**CULTURA DE TECIDOS DE ALHO:
ALTA FREQUÊNCIA DE REGENERAÇÃO
DE PLANTAS A PARTIR DE CALOS**

Rolf Dieter Illg¹

ABSTRACT - Propagation of garlic *in vitro* was obtained through culture of explants excised from shoots, roots and stems. Culture media consisted of Murashige & Skoog salts, supplemented with 2,4-D (5 μ M), Kin (10 μ M) and IAA (10 μ M) or with 2,4-D (5 μ M), Picloran (5 μ M) and Kin (5 μ M). Cultures were kept at 25°C in continuous darkness during 60 days. Then, callus were transferred to a nutrient medium composed of MS salts and BAP (25 μ M). These new cultures were exposed 10 hr per day with 8,000 lux light. Thousands of plants were produced from the different source of explants.

A propagação de plantas através da cultura de meristemas apicais e axilares é a área mais avançada da cultura de tecidos. É uma técnica rotineiramente utilizada, em vários países, na propagação de genótipos de elite de várias espécies, com um efeito direto no melhoramento de plantas, seja através da propagação mais rápida e eficiente de certas espécies, seja pela eliminação de doenças, em outras espécies. A aplicação dessa técnica dá-se principalmente com plantas de propagação assexuada (alho, batatinha, mandioca e ornamentais, p. ex.), ou com plantas com tempo de geração muito longo (essências florestais e frutíferas, p. ex.), e é uma maneira de produzir grande quantidade de plantas selecionadas ou de genótipos de elite.

Existem numerosas evidências de ocorrência de mudanças genéticas em cultura de tecidos vegetais, as quais são de interesse especial em plantas de propagação vegetativa, pois, além de poderem proporcionar o aparecimento de características agronômicas vantajosas, estas não se perdem nestas espécies, através de segregações sexuais. Condição essencial para obtenção de plantas variantes é a

alta frequência de regeneração a partir de calos. Calos de alho cvs. Branco Mineiro, Chonan, Lavínia e Peruano, provenientes de explantes de folhas, caules e raízes, foram obtidos em meio de cultura Murashige & Skoog (MS), acrescido de 2,4-D (5 μ M) + Kin (10 μ M) + IAA (10 μ M) ou 2,4-D (5 μ M) + Picloran (5 μ M) + Kin (5 μ M), a 25°C, no escuro. Após 60 dias, os calos foram transferidos para meio MS + BAP (25 μ M), na presença de luz (8.000 lux, 10 h/dia). Este procedimento induziu alta frequência de regeneração de plantas (morfogênese), em calos provenientes de explantes foliares, e frequências menores em calos de caule e raízes. Milhares de plantas de alho, das diferentes fontes de explante, inclusive de linhagens de calo de 4 anos de idade, estão sendo regeneradas e, após a indução de bulbilhos *in vitro*, serão levadas para uma avaliação das características agronômicas, sendo que espera-se, entre outros: bulbos e bulbilhos graúdos, número menor de bulbilhos, melhor capacidade de conservação, menor exigência em fotoperíodo, e resistência a ferrugem e *Alternaria*, por exemplo. (CNPq - Fundação Alexander von Humboldt, FINEP)

¹ Dept^o de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, 13100 Campinas, SP.

CULTURA DE TECIDOS E METABOLISMO SECUNDÁRIO

Ruy de Araújo Caldas¹

ABSTRACT - This paper summarizes and discusses some techniques of the use of tissue and cell cultures in the production of secondary metabolites of plants.

A cultura de tecidos vegetais constitui um bom sistema para estudos na área do metabolismo secundário das plantas (Overton 1977): 1) as células não diferenciadas da cultura de tecidos reduzem os problemas relacionados com a incorporação de precursores, tais como: permeabilidade, translocação e segregação de "pools"; 2) as células crescem em condições padronizadas e, na maioria das vezes, em meio definido; 3) os ciclos de crescimento são pequenos e inexistem as variações sazonais; 4) os experimentos podem ser conduzidos em condições estéreis, garantindo ser a transformação observada mediada pela célula da planta e não por eventuais contaminantes; 5) as preparações obtidas de células (por ruptura) possuem uma menor concentração de fenóis e quinonas, o que facilita os trabalhos de bioquímica e biologia molecular.

Os tecidos vegetais em cultura possuem a habilidade de produzir modificações em metabólitos secundários. Células de *Daucus carota* glucosida vanilina a vanilosídeo (Goris 1965) e as de *Convolvulus arvensis* possuem elevada atividade de glucosilação, sendo identificados nesta espécie nove diferentes tipos de glucosidases (Pierrot & van Wielink 1977).

A degradação de determinados produtos, mesmo não fazendo parte do metabolismo secundário, é uma das características dos tecidos vegetais em cultura. A cultura de *Arachis hypogaea* possui várias isoenzimas de polifenol-oxidase e de IAA-oxidase, que são responsáveis pela manutenção dos níveis intracelulares de compostos fenólicos e de IAA (Srivastava & van Huystee 1977). Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (benzo (α) - pireno) são degradados por tecidos de *Chenopodium rubrum* (Harms et al. 1977). Pesticidas, tais como, o Aldrin, podem também ser degradados por tecidos vegetais (Brain & Lines 1977).

Vários dos grupos de compostos pertencentes ao metabolismo secundário das plantas são produzidos por células vegetais em cultura. O calo de *Juniperus communis* produz até 13% do peso seco em taninos (Constabel 1965). A cultura de *Dioscorea deltoidea* pode produzir diosgenina até 1,0 - 2,5% do peso seco, se o meio contiver colesterol e 2,4-D (Kaul et al 1969). *Digitalis lanata* produz até 8,0 mg de β -metildigoxina/kg de peso seco, durante 24 horas de cultura (Reinhard et al. 1978). Algumas estirpes de *Catharanthus roseus*

produzem até 264 mg de ajmalicina/litro (Zenk et al. 1977). As células de soja e de salsa produzem flavanóides em cultura, sendo que no segundo caso a conversão de L-fenilalanina a 4-cumaril SCoA é feita por um complexo enzimático (Hahlbrock 1977).

Uma das características observadas em muitos sistemas de cultura de células e tecidos vegetais tem sido a incapacidade biossintética dos mesmos de efetuar transformações que são observadas na planta de origem. Como exemplos, podem ser citadas a ausência de alcalóides diméricos em células de *Catharanthus roseus* e a incapacidade de formação de antocianina acetilada por cultura de células de *Mathiola incana* (Böhm 1982). A explicação mais plausível para esta observação experimental seria a falta de enzimas específicas para determinada conversão, principalmente enzimas ligadas às membranas, pois modificações químicas secundárias são, de um modo geral, ligadas às membranas (Böhm 1980).

A falta de enzimas específicas, para as conversões metabólicas de natureza secundária, talvez seja um mecanismo que permita a utilização dos precursores das vias metabólicas primárias, durante o período em que a taxa de crescimento da célula é elevada (Drew & Demain 1977). A produção de substâncias do metabolismo secundário pode ser aumentada quando as células são transferidas para meio de cultura em fosfato inorgânico e fitormônios (Sasse et al. 1982).

A utilização de cultura de células vegetais na biotecnologia, visando à produção de compostos de interesse comercial, deverá tornar-se viável graças à possibilidade de seleção de linhagens de células com determinada capacidade biossintética (Berlin et al. 1982). A produção de putrescinas de cinamoila por linhagens de *Nicotiana tabacum* (TX4) foi possível graças à metodologia de seleção que utiliza PFP (p-fluor fenilalanina) como inibidor da PAL (fenilalanina-amonoliase) (Palmer & Widholm 1975, Berlin et al. 1982). O mesmo princípio foi utilizado para seleção de linhagens de *N. tabacum* altamente produtores de alcalóides indólicos, através da elevada atividade de descarboxilase do L-triptofano; inclusive, estas células possuem alta concentração endógena de triptamina (Knobloch & Berlin 1981).

REFERÊNCIAS

- BERLIN, J.; KNOBLOCH, K.H.; HÖFLE, G. & WITTE, L. J. *Nat. Prod.*, 45:78-83, 1982.

¹ Ph.D., Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento, Bioplanta - Tecnologia de Plantas Ltda., C.P. 1.141, 13100 Campinas, SP.

- BERLIN, J.; SASSE, F. & KNOBLOCH, K.H. Biochemical characterization of low and high yielding tobacco cell cultures. In: **PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**. Tokyo, The Japanese Association of Plant Tissue Culture, 1982. p.329.
- BÖHM, H. *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11B:183-208, 1980.
- BÖHM, H. The inability of plant cells to produce secondary substances. In: **PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**. Tokyo, The Japanese Association of Plant Tissue Culture, 1982. p.325.
- BRAIN, K.R. & LINES, D.S. Uptake and metabolism of aldnn in plant tissue cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. **Plant tissue culture and its bio-technological applications**. New York, Springer-Verlag, 1977. p.197.
- CONSTABEL, F. Phenolics in tissue cultures derived from *Juniperus communis* L.; studies on tannin synthesis. In: **PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT TISSUE CULTURE**. Berkeley, McCuthan, 1965. p.183.
- DREW, S.W. & DEMAINE, A.L. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:343-56, 1977.
- GORIS, A. Toxicité comparée de la vanilline et du vanilloside sur les cultures *in vitro* de tissu de carotte. *Ann. Pharm.*, 23(4): 275, 1965.
- HAHLBROCK, K. Regulatory aspects of phenylpropanoid biosynthesis in cell cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. **Plant tissue culture and its bio-technological applications**. New York, Springer-Verlag, 1977. p.95.
- HARMS, H.; DEHNEN, W. & MONCH, W. Benzo(a)pyrene metabolites formed by plant cells. *Z. Naturforsch.*, 32:321, 1977.
- KAUL, B.; STOHS, S.J. & STABA, E.J. *Dioscorea* tissue cultures. III. Influence of various factors on diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cultures. *Lloydia*, 32(2):347, 1969.
- KNOBLOCH, H.H. & BERLIN, J. *Planta med.*, 42:167-72, 1981.
- OVERTON, K.H. Biosynthesis of mevalonoid derived compounds in cell cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. **Plant culture and its bio-technological applications**. New York, Springer-Verlag, 1977. p.66.
- PALMER, J.E. & WIDHOLM, J.M. *Plant Physiol.*, 56:233-8, 1975.
- PIERROT, H. & VAN WIELINK, J.E. Localization of glycosidases in the wall of living cells from cultures *Convolvulus arvensis* tissue. *Planta*, 137:235, 1977.
- REINHARD, E.; HEINS, M.; HEIMBOLD, U. & WAHL, J. Production of β -methyl-digoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. In: **ABSTRACTS OF THE FOURTH INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**. Calgary, University State of Calgary, 1978. p.79.
- SASSE, F.; KNOBLOCH, K.H. & BERLIN, J. Introduction to secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmada*. In: **PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**. Tokyo, The Japanese Association of Plant Tissue Culture, 1982. p.343.
- SRIVASTAVA, O.M.P. & VAN HUYSTEE, R.B. IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes. *Phytochemistry*, 16:1527, 1977.
- ZENK, M.A.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STÖCKIGT, J.; WELLER, E.W. & DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. **Plant tissue culture and its bio-technological applications**. New York, Springer-Verlag, 1977. p.27.

PRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA POR PROCESSO CRIOBIOLOGICO

Silvio Lopes Teixeira¹

ABSTRACT - Controlled freezing and storage at ultra-low temperature (-196°C) has been regarded as the best way for long time preservation of plant cell, tissue and organs, from which plants can be regenerated at any time without risk of genetic variation occurrence or any other disadvantage common to other methods of germoplasm preservation. In this review it is summarized the present state of freeze-preservation expertise and its relations to plant cell, tissue and organ cultures.

IMPORTÂNCIA DO PROBLEMA

A preservação de número limitado de espécies de propagação sexuada em "bancos de sementes" e "bancos de pólen", ou a preservação de espécies propagadas assexuadamente, em "coleções de campo", está longe de satisfazer as necessidades do momento e, muito menos, as necessidades futuras, devido ao custo de manutenção elevado de tais bancos ou coleções, além do elevado risco de destruição a que está sujeito o material, pela ação de pragas, doenças e outras condições adversas do ambiente.

Desta forma, o congelamento controlado e armazenamento à temperatura ultrabaixa, de -196°C , capaz de interromper todo o metabolismo celular (criopreservação), tem sido considerado como a maneira mais promissora de preservação, a longo prazo, de células, tecidos e órgãos vegetais, a partir dos quais poderão ser regeneradas plantas em qualquer época, sem o perigo da ocorrência de variações genéticas no material ou outras desvantagens. Todavia, embora muito progresso já tenha sido obtido nesta área, muito mais precisa ser feito, antes de nos tornarmos aptos a estabelecer o primeiro "banco de tecidos", especialmente para o caso de plantas tropicais, para as quais quase nada foi pesquisado até agora.

NATUREZA DO FENÔMENO

Durante estes quase dois séculos e meio de pesquisa em criobiologia, os efeitos de baixas temperaturas sobre material biológico tomaram-se mais conhecidos, e muito progresso nesta área tem sido obtido ultimamente, embora a solução definitiva da criopreservação de seres vivos, ou partes deles, sem a ocorrência de danos aos tecidos, ainda esteja para ser atingida. Sabe-se, por exemplo, que, quando a temperatura decresce, um ponto crítico é atingido, a partir do qual ocorre formação de gelo no tecido, em duas etapas: primeiramente, o gelo se forma nos espaços intercelulares; em seguida, nos espaços intracelulares (Burke et al.

1976). Após a formação de gelo nos espaços intercelulares, a pressão de vapor aí diminui, em relação à pressão de vapor do interior da célula, resultando movimento da água desta para os espaços intercelulares. Havendo estabilização da temperatura, as pressões de vapor dos dois lados da membrana celular voltam a se equilibrar e o movimento de água se interrompe. Continuando, porém, o abaixamento da temperatura, o gradiente de pressão de vapor entre os dois lados da membrana permanece, e a água continua a se perder da célula para os espaços intercelulares, onde se transforma em gelo. Prosseguindo a queda de temperatura, e dependendo de diversos fatores, será atingido um ponto crítico a partir do qual a célula morrerá, ou por desidratação, ou por formação de gelo internamente.

O tecido, já congelado, pode ainda ser danificado durante o reaquecimento, pela ruptura da estrutura celular, causada pelo crescimento dos cristais de gelo formados durante o congelamento (Barnhart & Terry 1971, Mazur 1970, Nag & Street 1975, Nath & Anderson 1975, Olien 1971, Sakai 1960), especialmente quando o reaquecimento ocorre lentamente.

FATORES QUE AFETAM A PRESERVAÇÃO

1. Características da espécie

O congelamento do citoplasma das células vegetais ocorre, em condições normais, próximo a -1°C (Mazur 1970), dependendo do grau de permeabilidade da membrana celular, que varia com a espécie. Maior grau de permeabilidade à água, associado a esfriamento lento do tecido, permite maior abaixamento do ponto crítico, a partir do qual cristais de gelo começam a se formar no interior da célula e, conseqüentemente, causando menor dano ao tecido. Nestas condições, pode-se rebaixar o ponto de congelamento para até -15°C , estado este denominado de "superesfriamento."

Certas espécies, originadas em regiões de clima frio, apresentam um mecanismo de "endurecimento" dos tecidos, no período que antecede o inverno, de modo a suportarem, ou desidratação completa do protoplasma, sem perda da água estrutural (Burke et al. 1976), ou superesfriamento profundo, através do acúmulo, nas células, de substâncias crioprotetoras, do aumento da permeabilidade à água e da

¹ Eng.^o-agr.^o, Ph.D., Prof.-Adjunto, Departamento de Fitotecnia, UFV, 36570 Viçosa, MG.

resistência da célula à deformação mecânica (Tumanov 1967). Células, tecidos e órgãos extraídos de tais plantas, previamente "endurecidos" em condições naturais, e convenientemente tratados, podem ser congelados sem sofrer danos apreciáveis. Dentre estas plantas, estão muitas espécies florestais e frutíferas de folhas caducas. Todavia, material proveniente destas mesmas plantas, sem passar pelo prévio estágio de "endurecimento", está sujeito aos mesmos danos que o congelamento pode causar às demais plantas de folhas persistentes, principalmente as de clima tropical (Chen 1976, Towill et al. 1973), que não apresentam nenhum mecanismo de tolerância a estas condições.

2. Características do espécimen

O grau de diferenciação e estado fisiológico das células, de organização dos tecidos, bem como o tamanho e outras características do espécimen a ser congelado, são fatores que afetam a sobrevivência ao congelamento.

Em geral, o grau de sobrevivência decresce à medida que aumenta a diferenciação das células, a organização e o volume do espécimen.

3. Teor de umidade do espécimen

Quanto maior o teor de umidade da célula ou do tecido, tanto maior será o dano causado pelo congelamento. Esta correlação tem sido comprovada experimentalmente com diversas espécies (Sun 1958, Sakai 1960, Li & Weiser 1971, Brown 1972, Williams 1972, Burke et al. 1976).

4. Pré-condicionamento do espécimen

O cultivo do material, previamente ao congelamento e por tempo variável, sob condições especiais, tem permitido aumentar a taxa de sobrevivência em certas espécies.

Este pré-condicionamento tem sido conseguido pelo cultivo de material a temperaturas inferiores à temperatura ambiente (Bannier & Steponkus 1976), às vezes combinado com variação no fotoperíodo (Sakai & Sugawara 1973), manitol (Withers & Street 1977), dimetil-sulfóxido (Kartha et al. 1980) e outras, com a finalidade de promover desidratação parcial do espécimen, previamente ao congelamento.

5. Uso de agentes protetores

A embebição do espécimen por uma ou mais substâncias, chamadas crioprotetoras, é um dos artifícios mais eficientes para proteger o material contra os danos causados pelo congelamento. Algumas destas substâncias penetram no interior das células e, segundo se admite, reduzem a quantidade de gelo que poderá vir a se formar. Entre estas está um dos mais eficientes crioprotetores - DMSO, ou

dimetil-sulfóxido, além do glicerol, etileno-glicol e outros. Outros crioprotetores não penetram prontamente nas células e, segundo se admite, previnem a injúria por permitirem influxo e efluxo reversível de solutos durante o congelamento e o reaquecimento, evitando, assim, efeitos irreversíveis de gradientes osmóticos excessivos (Meryman 1971). Dentre esses, estão o PVP ou polivinil-pirrolidone, sacarose, manitol, sorbitol e outros.

6. Taxa de resfriamento

É outro fator de mais alta importância e muito variável de espécie para espécie. No caso de células em suspensão e protoplastos, o resfriamento, em geral, deve ser lento, entre 0,1 e 10°C/min, para permitir a desidratação parcial da célula, sem formação de gelo intercelular, até atingir certa temperatura, a partir da qual o resfriamento é rápido (Withers 1978). Isto tem dado ótimos resultados para muitas espécies.

Para meristemas apicais e ápices caulinares de algumas espécies, o melhor tem sido o resfriamento rápido, a taxas que chegam a ultrapassar 1.000°C/min, por imersão direta em nitrogênio líquido (Withers 1980).

Combinações de diferentes taxas de resfriamento e de reaquecimento, com diferentes maneiras de efetuar os mesmos, têm sido utilizadas para diferentes materiais vegetais (Seibert 1976, Grout & Henshaw 1978, Sakai et al. 1978, Kartha et al. 1979, Kartha et al. 1980, Kartha et al. 1982, Kartha 1985), com bons resultados.

7. Temperatura de armazenamento

Temperaturas de até -78°C mostraram-se inadequadas, para a preservação de germoplasma a longo prazo (Nag & Street 1975, Bajaj 1976), ao permitir deterioração progressiva do material. Todavia, a preservação a longo prazo (décadas) pode ser conseguida por imersão do espécimen diretamente em nitrogênio líquido, ou por suspensão nos seus vapores (-196°C), já que, a esta temperatura, todas as atividades metabólicas ficam paralisadas, não ocorrendo deterioração.

8. Taxa de reaquecimento

Em geral, o reaquecimento rápido, em água a 30-40°C, dá os melhores resultados. Se o reaquecimento é lento, há tempo suficiente para a água dos espaços intercelulares refluir para o interior da célula e causar o crescimento dos cristais intracelulares ainda presentes, com a conseqüente ruptura da estrutura celular.

Todavia, em alguns casos, o reaquecimento lento dá melhores resultados (Withers 1978, Kartha et al. 1979, Kartha et al. 1980), especialmente para estruturas de dimensões

reduzidas e baixo teor de umidade, como observado no caso de meristemas apicais de ervilha (Karthá et al. 1979) e de morango (Karthá et al. 1980).

9. Remoção do agente crioprotetor

Normalmente, é necessário remover o agente crioprotetor, imediatamente após o reaquecimento, por ser o mesmo normalmente tóxico aos tecidos vegetais (Nag & Street 1975, Withers & Street 1977). Todavia, em alguns casos, a remoção do crioprotetor é prejudicial à recuperação das células, talvez devido à remoção, também, de fatores perdidos pela célula nos espaços intercelulares, durante alguma fase de todo o processo.

10. Equipamento

O congelamento de material biológico, de maneira controlada e com precisão, exige equipamento especial, dotado de meios para controle preciso da taxa de resfriamento. Dependendo do grau de precisão desejado, existem diferentes unidades com esta finalidade. As mais sofisticadas fazem o controle da taxa de resfriamento automaticamente; outras operam com controles mais simples, mas com boa precisão. É possível, ainda, improvisar apetrechos bastante simples e precisos, para uso em condições de laboratório (Finkle et al. 1974).

O armazenamento do material é feito em botijões de nitrogênio líquido, muito simples e já amplamente utilizados, até mesmo comercialmente.

Quanto à operação de reaquecimento, praticamente não exige nenhum equipamento especial, exceto um depósito de água com temperatura controlada, para imersão do material.

REFERÊNCIAS

- BAJAJ, Y.P.S. Regeneration of plants from cell suspensions frozen at -20, -70 and -196°C. *Physiol. Plant.*, 37:263-8, 1976.
- BANNIER, L.J. & STEPONKUS, P.L. Cold acclimation of *Chrysanthemum* callus cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101:409-12, 1976.
- BARNHART, F.E. & TERRY, C.E. Cryobiology of *Neurospora crassa*. I. Freeze response of *Neurospora crassa* conidia. *Cryobiology*, 8:323-7, 1971.
- BROWN, G.N. Xylem sap pressure relationship to seedling survival after freezing. *Cryobiology*, 9:314, 1972.
- BURKE, M.J.; GUSTA, L.V.; QUAMME, H.A.; WEISER, C.J. & LI, P.H. Freezing and injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27:507-28, 1976.
- CHEN, P.M.S. The study of freezing process, biochemical changes and cold acclimation in *Cornus* and *Solanum* species in relation to the frost hardness and water stress in controlled environments. *Dissert. Abstr.*, 37:2602-8, 1976.
- FINKLE, B.J.; SÁ, E.; PEREIRA, B. & BROWN, M.S. Freezing of nonwoody plant tissues. I. Effect of rate of cooling of frozen beet root sections. *Plant Physiol.*, 53:705-8, 1974.
- FINKLE, B. & ULRICH, J. Protocols of cryopreservation. In: EVANS, L.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant tissue culture*. New York, MacMillan, 1983. v.1, p.806-15.
- GROUT, B.W.W. & HENSHAW, G.G. Freeze-preservation of potato shoot-tip cultures. *Ann. Bot.*, 42:1227-9, 1978.
- KARTHA, K.K. Cryopreservation of plant cells and organs. *IAPTC Newsletter*, 45:2-7, 1985.
- KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L. & GAMBORG, D.L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Sci. Letters*, 15:7-15, 1979.
- KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L. & MROGINSKI, L.A. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Z. Pflanzenphysiol.*, 107:133-40, 1982.
- KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L. & PAHL, K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105:481-4, 1980.
- LI, P.H. & WEISER, C.J. Increasing cold resistance of stem sections of *Cornus stolonifera* by artificial dehydration. *Cryobiology*, 8:108-11, 1971.
- MAZUR, P. Cryobiology; the freezing of biological systems. *Science*, 168:939-48, 1970.
- MERYMAN, H.T. Cryopreservative agents. *Cryobiology*, 8:173-83, 1971.
- NAG, K.K. & STREET, H.E. Freeze preservation of cultured plant cells. II. The freezing and thawing phases. *Physiol. Plant.*, 34:261-5, 1975.
- NATH, J. & ANDERSON, J.O. Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage of *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. pollen. *Cryobiology*, 12:81-6, 1975.
- OLIEN, C.R. A comparison of desiccation and freezing as stress vectors. *Cryobiology*, 8:244-8, 1971.
- SAKAI, A. Survival of the twig of woody plants at -196°C. *Nature*, 185:393-4, 1960.
- SAKAI, A. Some factors contributing to the survival of rapidly cooled plant cells. *Cryobiology*, 3:225-34, 1967.
- SAKAI, A.; YAMAKAWA, M.; SAKATA, L.; HARODA, T. & YAKURA, T. Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C. *Low Temp. Sci. Serv. Bull.*, 36:31-8, 1978.

- SAKAI, A. & SUGAWARA, Y. Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant and Cell Physiol.*, 14:1201-4, 1973.
- SALA, F.; CELLA, R. & ROLLO, F. Freeze preservation of rice cells. *Physiol. Plant.*, 45:1178-9, 1979.
- SEIBERT, M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science*, 191:1178-9, 1976.
- SHVEDKAYA, Z.M.; KRUSHILIN, A.S. & ASTAKHOVA, K.V. Frost resistance of winter wheat seedlings under sterile cultivation conditions. *Soviet Plant Physiol.*, 20:898-902, 1973.
- SUN, C.N. The survival of excised pea seedlings after drying and freezing in liquid nitrogen. *Bot. Gaz.*, 119:234-6, 1958.
- TOWILL, L.E.; MAZUR, L.E. & HOWLAND, G.P. Plasmolysis injury as a factor in freezing injury in plant tissue culture. *Cryobiology*, 10(5):532, 1973.
- TUMANOV, I.I. The frost-hardening process of plants. In: TROSHIN, A.S., ed. *The cell and environmental temperature*. London, Pergamon, 1967. 462p. (International series of monographs in pure and applied biology. Div. Zoology, 34).
- WILLIAMS, R.J. The contribution of glycoprotein to winter hardness in dogwood. *Cryobiology*, 9:313, 1972.
- WITHERS, L.A. Freeze preservation of cultured cells and tissues. In: THORPE, T., ed. *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, IAPTC, 1978. p.297-306.
- WITHERS, L.A. Preservation of germplasm. In: VASIL, I.K., ed. *Perspectives in plant cell and tissue culture*. Intern. Rev. Cytology, Supp. 11 B. New York, Academic Press, 1980. p.101-36.
- WITHERS, L.A. & STREET, H.E. Freeze preservation of plant cell cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H., ed. *Plant tissue culture and its bio-technological applications*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.226-44.

PRODUÇÃO E USO DE HAPLÓIDES

Walter Handro¹

ABSTRACT - This article summarizes some aspects concerning production and uses of haploid plants and their role in basic and applied research.

INTRODUÇÃO

De um modo geral, haplóides são plantas que apresentam o número de cromossomos iguais ao do gametófito ou da haplófase (n). De maneira mais específica, haplóides são plantas que têm o número básico de uma série poliplóide ($x = n$), sendo, então, denominados monoplóides. Indivíduos haplóides podem ocorrer espontaneamente na natureza, como resultado de certas anormalidades no processo de reprodução sexual (apomixia, partenogênese), em taxas muito baixas (no caso de fumo, por exemplo, a taxa é de 1:10.000). Diversos métodos foram utilizados até a década de 60 para obtenção de haplóides (Kimber & Riley 1963, Magoon & Khana 1963), destacando-se, em geral, a indução de divisão da oosfera, sinérgides ou células de gametófito masculino após a fertilização. Tais métodos, entretanto, são trabalhosos e pouco eficientes.

Em 1964, Guha & Maheshwari, cultivando anteras de *Datura innoxia*, *in vitro*, verificaram no interior delas estruturas semelhantes a embriões, que posteriormente originavam plantinhas haplóides (Guha & Maheshwari 1966). Bourgin & Nitsch (1967), cultivando anteras de *Nicotiana tabacum*, conseguiram obter plantas haplóides que chegaram à floração. Um maior avanço foi conseguido quando Nitsch (1974) obteve plantas haplóides a partir da cultura *in vitro* de micrósporos isolados.

O interesse nas plantas haplóides baseia-se principalmente no fato de que caracteres recessivos ou mutações podem ser facilmente detectados pela presença de um único lote cromossômico. Por outro lado, diversas técnicas de cultura *in vitro* têm mostrado novas possibilidades de utilização de haplóides, não só na genética, mas também nos estudos de fisiologia e bioquímica. Extensas e detalhadas revisões sobre obtenção e uso de haplóides foram publicadas nos últimos anos por diversos autores (Kasha 1974, Reinert & Bajaj 1977, Sunderland & Dunwell 1977, Vasil 1980, Collins & Genovesi 1982, Bajaj 1983, Vasil 1984).

ORIGEM E OBTENÇÃO DE HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS IN VITRO

Embriões haplóides são produzidos facilmente em muitas espécies, a partir da cultura de anteras, e originam-se em geral da divisão dos micrósporos ou grãos de pólen imaturos, através de várias alternativas (Fig. 1). Para obtenção das plantas haplóides, as anteras são, em geral, colocadas em cultura quando seus micrósporos estão na fase imediatamente anterior à primeira mitose. Em muitos casos, os micrósporos originam haplóides em meio desprovido de reguladores de crescimento, como é o caso do fumo. Certas condições estimulam a divisão dos micrósporos, como, por exemplo, tratar as anteras, por um determinado período, em baixa temperatura, antes da inoculação. Em geral, 30 a 60 dias após o início da cultura das anteras, plantinhas emergem das mesmas, e após certo tempo podem ser repicadas para novo meio, até que, finalmente, possam ser transferidas para vasos e canteiros. Em muitos casos, a cultura de anteras propicia a divisão celular em diversos tecidos, e, mesmo no caso de divisões a partir dos micrósporos, podem ocorrer fusões nucleares ou irregularidades nas divisões celulares, o que leva, muitas vezes, à formação de plantas com diferentes números cromossômicos (haplóides, diplóides, poliplóides e aneuplóides). A partir da cultura de tecidos de indivíduos haplóides, pode-se facilmente obter indivíduos diplóides ou poliplóides homozigotos. É o que se observa em casos de androgênese indireta via calo, onde ocorrem endomitoses espontâneas ou fusões nucleares, que originam células diplóides e poliplóides. O tratamento de tecidos haplóides com colchicina pode também aumentar a frequência dos regenerantes, com maior ploidia. De um modo geral, tecidos e células haplóides em cultura podem apresentar variações no nível de ploidia, sendo comum um aumento do número de células de nível de ploidia mais elevado. Através da técnica de cultura de anteras, já foram obtidos haplóides de inúmeras espécies de diversas famílias, muitas delas de grande interesse econômico (Tabela 1).

UTILIZAÇÃO DE HAPLÓIDES

De uma maneira geral, haplóides têm sido utilizados em pesquisas básica e aplicada. Grande parte dos trabalhos com haplóides concentraram-se nas famílias das gramíneas, solanáceas e crucíferas. Algumas das vantagens de utilização de haplóides são:

¹ Biólogo, Ph.D., Professor Titular, Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Dept.^o de Botânica, Instituto de Biociências, USP, C.P. 11461, 05421 São Paulo, SP.

TABELA 1. Relação de espécies de plantas haplóides obtidas a partir da cultura de anteras (Bajaj 1983).

<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Arachis</i> spp.	<i>Nicotiana</i> spp.
<i>Asparagus officinalis</i>	<i>Oryza perennis</i>
<i>Atropa belladonna</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>Brassica campestris</i>	<i>Pelargonium roseum</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>Petunia hybrida</i>
<i>Brassica oleracea</i>	<i>Populus</i> sp.
<i>Capsicum annum</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>Datura innoxia</i>	<i>Saintpaulia ionantha</i>
<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Solanum melongena</i>
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Hyoscyamus niger</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Lolium</i> spp.	<i>Vitis vinifera</i>
	<i>Zea mays</i>

a) a expressão de gens num genoma simples elimina muitas das complexidades do estado diplóide, não havendo oposição entre alelos recessivos e dominantes nem os recessivos sendo mascarados pelos dominantes. Como grande parte das espécies cultivadas são poliplóides naturais, seus haplóides, normalmente, contêm duas ou mais cópias de gens metabolicamente essenciais, o que dificulta a seleção de eventuais mutantes através das técnicas de cultura de tecidos e células. Assim, tais mutantes só podem ser isolados e tomarem-se úteis através de haplóides ou de sua progênie diploidizada;

b) estabilidade genética, homozigose e desenvolvimento de linhagens puras podem ser obtidos em apenas alguns meses, através da cultura de anteras, em vez das técnicas convencionais de endocruzamento, as quais requerem 5-7 gerações. Isto torna-se mais importante ainda quando aplicado às espécies de ciclo de vida longo. Com os haplóides diploidizados poderão ser obtidas linhagens altamente homozigotas, que quando utilizadas em cruzamentos, poderão resultar combinações com alto grau de heterose;

c) haplóides podem ser de grande utilidade para trabalhos de hibridação somática (fusão de protoplastos), tendo em vista as diferentes possibilidades de combinação de genomas;

d) haplóides são importantes em trabalhos de citogenética, como, por exemplo, no estudo de relações de parentesco;

e) de maneira geral, padrões de comportamento fisiológico e bioquímico têm sido estudados em sistemas, ou organismos, predominantemente diplóides. A facilidade na obtenção de haplóides e de seus homozigotos dobrados (diplóides e poliplóides) permite que diversos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e mesmo morfogenéticos sejam comparados nesses indivíduos.

Haplóides diploidizados (ou dobrados) já foram

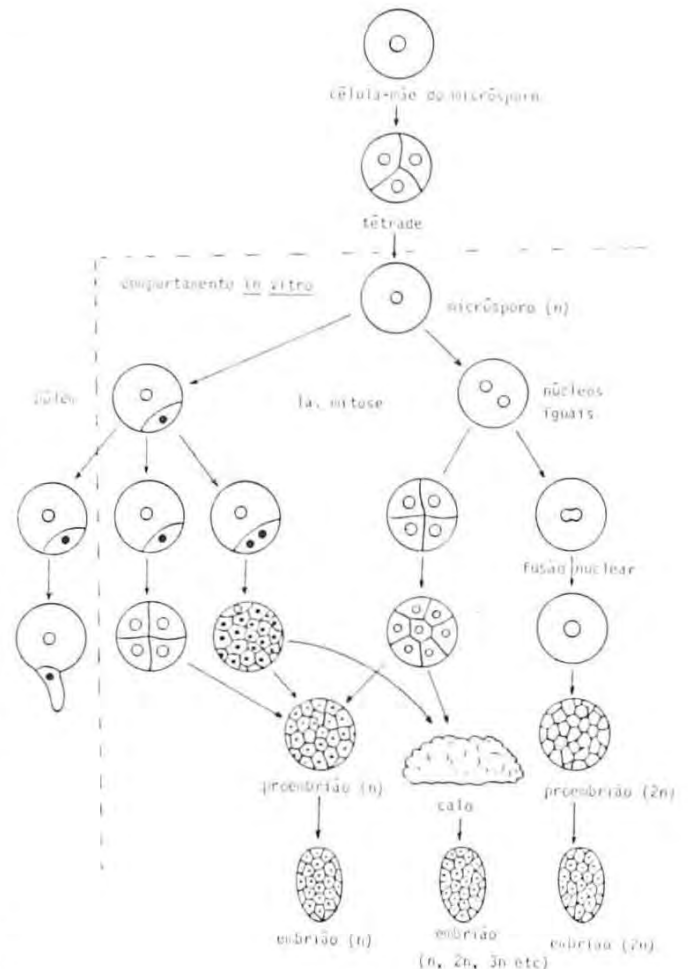


FIG. 1. Origem e alternativas de desenvolvimento de micrósporos cultivados *in vitro* (modificado de Bajaj 1977).

usados em programas de melhoramento para produção de novas variedades ou indivíduos de características específicas, principalmente em aspargo, diversas espécies de Brássicas, arroz, milho, cevada, trigo, centeio, batata e fumo. Um bom exemplo de utilização de haplóides é no caso de aspargo (Reuther 1984), onde a cultura de anteras de plantas-macho (δ) (XY) podem ser usadas para, através de duplicação, produzir supermachos (δ) (YY). Estes, quando cruzados com plantas femininas (?) (XX) produzem linhagens masculinas (δ) (XY) de alto rendimento e uniformidade. Assim, a utilização de haplóides pode ser de grande utilidade em espécies onde certas características estão ligadas ao sexo.

No caso de pesquisa básica, com haplóides e seus di ou poliplóides homozigotos, destacam-se vários trabalhos

comparando o crescimento de tecidos de *Nicotiana tabacum* de diferentes ploidias, bem como variações de atividade enzimática e padrões isoenzimáticos (Kerbaux et al. 1976, Kraus et al. 1981, Floh & Handro 1985). Também foi verificado que, sob certas condições, tecidos haplóides crescem mais que os diplóides, e estes mais que os poliplóides, fato que é acompanhado por um comportamento inverso na atividade da peroxidase, sendo esta maior quanto maior o nível de ploidia (Fig. 2).

Um resumo das possibilidades da utilização de haplóides e de pesquisa básica e aplicada é mostrado na Fig. 3.

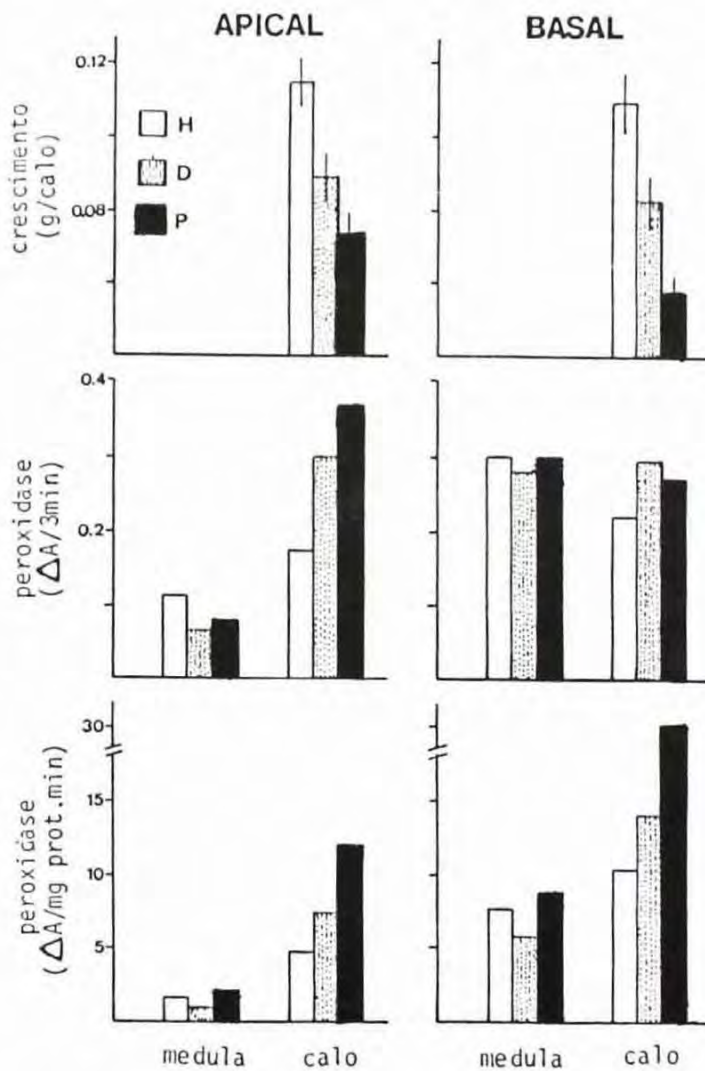


FIG. 2. Crescimento e atividade da peroxidase em tecidos de medula caular das regiões apical e basal de plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin-38, haplóides (H), diplóides (D) e poliplóides (P), e de seus tecidos de calos originados após 15 dias de cultura, em meio RM-64 com 2,0 mg/l, de AIA, e 0,2 mg/l, de cinetina, no escuro (segundo Floh & Handro 1985, modificado).

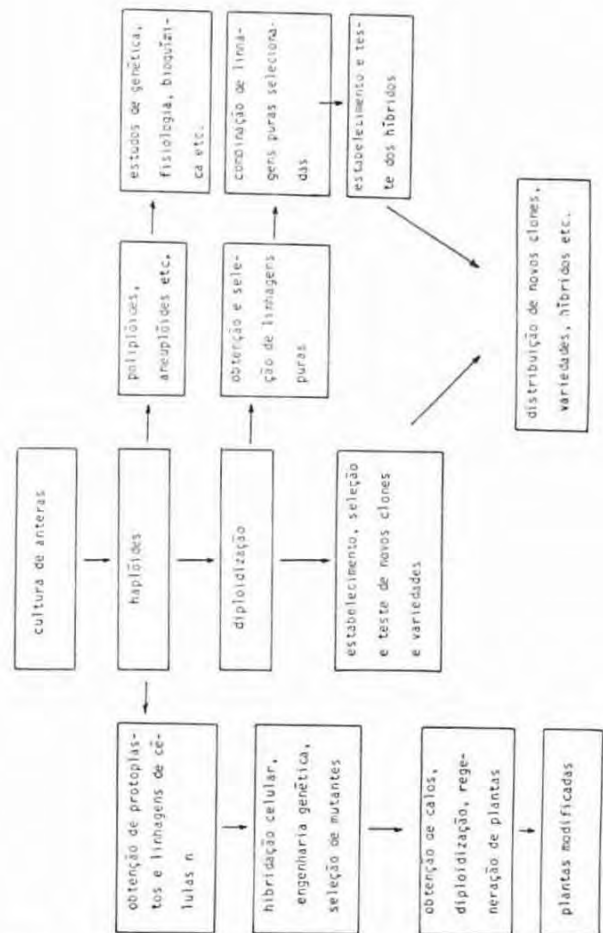


FIG. 3. Possibilidades de utilização de haplóides androgenéticos.

REFERÊNCIAS

- BAJAJ, Y.P.S. *In vitro* production of haploids. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan 1983. v.1, p.228-87.
- BOURGIN, P. & NITSCH, J.P. Obtention de *Nicotiana* haploides à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. Veg.*, 9: 377-82, 1967.
- COLLINS, G.B. & GENOVESI, A.D. Anther culture and its application to crop improvement. In: TOMES, D.T.; ELLIS, B.E.; HARNEY, P.M.; KASHA, K.J. & PETERSON, R.L., ed. *Application of plant cell tissue culture to agriculture and industry*. Guelph, Univ. of Guelph Press, 1982. p.1-24.
- FLOH, E.I.S. & HANDRO, W. Growth and biochemical patterns in tobacco tissues of different ploidy cultured *in vitro*. *R. bras. Bot.*, 8. 1985. Prelo.
- GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204:497, 1964.

- GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97-8, 1966.
- KASHA, K.J. **Haploids in higher plants; advances and potential.** Guelph, Univ. of Guelph Press, 1974.
- KERBAUY, G.B.; HELL, K.G. & HANDRO, W. Comparative growth of pith tissues from haploid and diploid of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 79:455-8, 1976.
- KIMBER, G. & RILEY, R. Haploid angiosperms. *Bot Rev.*, 29: 480-631, 1963.
- KRAUS, J.E.; HANDRO, W. & DIETRICH, J.M.C. Growth, peroxidase activity and protein content in stem and callus tissues from haploid and diploid *Nicotiana tabacum* plants. *Physiol. Plant.*, 51:157-62, 1981.
- MAGOON, M.L. & KHANA, K.R. Haploids. *Caryologia*, 16:191-235, 1963.
- NITSCH, C. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. *C.R. Acad. Sci. Paris, D* 278:1031-4, 1974.
- REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture.** Berlin, Springer-Verlag, 1977. 803p.
- REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Anther culture; haploid production and its significance. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.** Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.251-67.
- REUTHER, G. Asparagus. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture.** New York, MacMillan, 1984. v.2, p.211-42.
- SUNDERLAND, N. & DUNWELL, J.M. Anther and pollen culture. In: STREET, H.E. **Plant tissue and cell culture.** Oxford, Blackwell, 1977. p.223-65.
- VASIL, I.K. Androgenetic haploids. *Int. Rev. Cytol., Suppl.* 11A: 195-223, 1980.
- VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** Orlando, Academic Press, 1984. v.1, 825p.

ENGENHARIA GENÉTICA

MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS, CELULOLÍTICOS E AMIOLÍTICOS: ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO

Carlos Roberto Félix¹
Sérgio Barbosa Silva²
Cirano José Ulhoa²
Cláudio de Cunha³
Ruy de Araújo Caldas⁴

ABSTRACT - This paper presents preliminary results concerning isolation and evaluation of the ability of some microorganisms on the conversion of cellulosic and starchy materials. It is suggested that more adequate conditions for the production/secretion of cellulases and amylases, would result into more efficient conversion processes.

INTRODUÇÃO

O crescimento constante da população mundial torna a necessidade de aumento da produção de alimentos e combustíveis em um dos problemas mais urgentes a ser solucionado. Uma das opções mais viáveis para a resolução deste problema é o aproveitamento da energia solar acumulada pelos vegetais, que sintetizam, anualmente, 164 bilhões de toneladas de matéria orgânica em peso seco. Celulose (polímero de glicose), hemicelulose (polímero de xilose e manose), e lignina (polímero de fenilpropano), constituem aproximadamente 45, 20 e 20%, respectivamente, do peso seco dos vegetais (Tanaka & Matsuno 1985). A possibilidade de produzir energia a partir da biomassa demanda, atualmente, a busca de tecnologias economicamente adequadas para a conversão de substratos celulósicos e amiláceos em açúcares. Uma produção econômica de álcool combustível, a partir de biomassa, requer: 1. pré-tratamento, para romper estruturas que dificultam a hidrólise (Gungay 1980); 2. produção eficiente de açúcares; 3. não-diluição excessiva, para evitar etapas de concentração; 4. reciclagem, para minimizar perdas; 5. reaproveitamento de todos os componentes da biomassa (Gungay 1980); e 6. fermentação eficiente. A celulose pode ser facilmente hidrolisada a mono e oligossacarídeos, tanto por ácidos como por enzimas. Entretanto, a estrutura cristalina altamente ordenada da celulose e a capa de lignina que envolve as fibras de celulose *in natura* são obstáculos que dificultam o rendimento do processo. Da mesma forma, a hidrólise de amido *in natura* é dificultada por material celulósico.

A hidrólise ácida de madeira é um processo já antigo; apesar de não ser econômico, várias nações, particularmente a União Soviética, produzem álcool e proteínas utilizando tal tecnologia. A produção de furfurais derivados das pentoses da hemicelulose constitui um inconveniente. A hemicelulose é hidrolisada por ácidos mil vezes mais rapidamente que a celulose, e os açúcares produzidos a partir de ambos os substratos são também degradados a resinas, polímeros e furfurais, exigindo, assim, condições de reações que garantem um compromisso entre hidrólise e degradação, de forma que a mistura final contenha biomassa não convertida, produtos não desejados e açúcares fermentáveis.

A remoção de hemicelulose, sem prejuízo da celulose, pode ser feita por tratamento da amostra com ácido diluído, a 170°C e tempos de reação menores que 1 hora. No entanto, a melhor produção de açúcares por hidrólise ácida de celulose é sempre menor que 55% do rendimento teórico (Knappert et al. 1980). Obviamente, o processo de hidrólise ácida de biomassa demanda melhorias ou substituição por uma tecnologia diferente e mais adequada.

Hidrólise enzimática ou biológica de substratos amiláceos e celulósicos constitui um processo mais específico e, possivelmente, uma alternativa adequada à hidrólise ácida. Entretanto, substratos lignocelulósicos e amiláceos *in natura* são consideravelmente resistentes à hidrólise enzimática. O grau de cristalinização, a estrutura capilar e o grau de polimerização da celulose e lignina associadas à hemicelulose são propriedades básicas destes substratos, que contribuem para resistência à hidrólise enzimática (Cowling 1975, Fan et al. 1980, Tsao et al. 1978). Conseqüentemente, uma conversão mais eficiente de polímeros celulósicos e amiláceos a açúcares fermentáveis, por processos enzimáticos, requer pré-tratamentos físicos ou químicos, ou combinações destes (para revisão detalhada de pré-tratamento, ver Tanaka & Matsuno 1985).

Poucos organismos secretam níveis adequados de todos os componentes do complexo celulolítico, os quais são descritos como sendo enzima C₁ (exoglucanase), que hidrolisa celulose com unidades de celobiose; enzima C_x (endoglucanase) e celobiasas (beta-glucosidase). Em preparações

¹ Bioquímico, Ph.D., Professor-adjunto, Dept^o de Biologia Celular, Universidade de Brasília, C.P. 153081, 70910 Brasília, DF.

² Aluno do Curso de Pós-graduação em Biologia Molecular, Dept^o de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

³ Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Dept^o de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

⁴ Bioquímico, Ph.D., Professor-adjunto, Dept^o de Biologia Celular, Universidade de Brasília. Endereço atual: Bioplanta, 13100 Campinas, SP.

enzimáticas *in natura*, estes componentes hidrolisam celulose de forma sinérgica, com alta atividade sacarificante (Ogden & Tubb 1985). Existem fungos cuja produção de celulasas em tanques de fermentação atinge níveis elevados, apesar de nem sempre as proporções dos vários componentes enzimáticos serem adequadas à hidrólise de celulose nativa. Existe, no entanto, a possibilidade de constituir misturas de celulasas de várias fontes. Os actinomicetos, clostridia e sporocytophaga destacam-se pelas maiores atividades celulolíticas (Bellamy 1979). Celulasas de fungos termofílicos são funcionais em temperaturas superiores a 40°C, o que significa maiores velocidades de reação e menor chance de contaminação.

Amido solúvel é facilmente hidrolisado enzimaticamente. Ainda que poucos microorganismos sejam capazes de utilizar amido como única fonte de carbono, cepas com alta capacidade amilolítica total (alfa-amilase, glucoamilase e enzima desramificante) foram registradas (Ogden & Tubb 1985).

Repressão catabólica e inibição por excesso de produtos constituem barreiras significantes para a conversão de biomassa em açúcares fermentáveis. O isolamento de mutantes, juntamente com a otimização das condições de cultura para produção de amilases e celulasas, pode contribuir significativamente para otimização do processo de conversão. Hibridização de cepas promissoras irá certamente ocupar espaço importante no processo de produção de enzimas.

De forma resumida, a conversão de material lignocelulósico e amiláceo a produtos assimiláveis, quer seja por processos químicos ou biológicos, requer ainda empenho na busca de tecnologias economicamente adequadas. A possibilidade de utilizar biomassa como fonte de matéria renovável para a produção de açúcares, proteínas e álcool combustível é uma realidade cristalina, principalmente em países que dispõem de grandes áreas agricultáveis. A adequação de técnicas e processos químicos e enzimáticos são necessidades primárias. Acredita-se que a busca de microorganismos conversores de biomassa e a seleção de cepas que se destacam, bem como o melhoramento genético dos mesmos, por fusão de protoplastos e técnicas de engenharia genética, ocupam lugar de destaque dentro do contexto geral.

Finalmente, tratar o assunto de uma forma complexa e definitiva requer uma revisão detalhada sobre a vasta informação pertinente disponível na literatura (Gaden Júnior et al. 1976, Radovidh 1985, Tanaka & Matsuno 1985), o que não se pretende com a presente comunicação. Entretanto, caso a abordagem venha a contribuir para despertar o interesse pela procura de maiores informações, o objetivo principal terá sido atingido.

EXPERIMENTAL

Microorganismos conversores de celulose foram isolados por plaqueamento sucessivo em meio sólido — ágar e

sais minerais (Araújo et al. 1983), contendo 1% de celulose, a partir de amostras de madeira e folhas em decomposição coletadas em várias regiões do país, principalmente Floresta Amazônica (Manaus), e locais com água quente, na Estância Hidromineral de Caldas Novas. Subseqüentemente, o crescimento dos fungos isolados, FBM (fungo branco de Manaus) e FVM (fungo verde de Manaus), *Humicola* sp. (isolado pela Universidade Federal de Viçosa), *Picnoporus sanguineus* (isolado pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal) e *Trichoderma reesei* (Mandels 1982), em meio sólido contendo amido e glicose, foi estimado medindo-se o diâmetro de colônias individuais após tempos diferentes de crescimento, em temperaturas diferentes (Tabela 1).

As capacidades destes fungos utilizarem amido, ou celulose, como única fonte de carbono foram estimadas pelos diâmetros de colônias individuais, após crescimento por 96 horas a 34°C, em meio sólido contendo 1% de amido (Tabela 2), ou 1% de celulose microcristalina (Tabela 3). Pode-se observar que, exceto o *P. sanguineus*, todos os outros fungos apresentaram capacidades de propagação, tanto em amido como em celulose, próximas ou equivalentes à do *T. reesei*, um fungo termofílico celulolítico amplamente descrito na literatura (Mandels 1982).

TABELA 1. Crescimento (diâmetro da colônia, cm) de vários fungos em meio sólido contendo 1% de glicose e infusão de batata, em várias temperaturas.

Horas de crescimento	Temp.	Diâmetro da colônia (cm)				
		F.B.M.	F.V.M.	<i>Humicola</i>	<i>T. reesei</i>	<i>P. sanguineus</i>
24	34°C	4,0	2,2	2,2	NC	1,2
	42°C	4,5	1,8	1,5	1,3	1,6
48	28°C	8,0	1,8	1,3	5,0	2,0
	34°C	8,0	4,2	3,7	8,0	3,7
	42°C	8,0	4,6	4,8	NC	2,9
96	28°C	8,0	3,5	2,2	8,0	3,5
	34°C	8,0	6,7	5,0	8,0	5,5
	42°C	8,0	8,0	7,0	NC	4,5

NC = Não cresceu.

TABELA 2. Crescimento (diâmetro da colônia, cm) de vários fungos em meio sólido contendo 1% de amido, após 96 h, a 34°C.

Fungo	Diâmetro da colônia (cm)
<i>T. reesei</i>	8,0
<i>Humicola</i> sp.	8,0
F.V.M.	7,0
F.B.M.	6,0
<i>P. sanguineus</i>	2,5

TABELA 3. Crescimento (diâmetro da colônia, cm) de vários fungos em meio sólido contendo 1% de celulose, após 96 h, a 34°C.

Fungo	Diâmetro da colônia (cm)
<i>T. reesei</i>	5,5
<i>Humicola sp.</i>	6,5
F.V.M.	7,0
F.B.M.	4,0
<i>P. sanguineus</i>	1,5

A análise das atividades celulolíticas totais (FPA) e de β -glucosidase dos fungos mencionados crescidos a 34°C, em meio líquido contendo apenas sais minerais (Araújo et al. 1983) e 1% de celulose microcristalina, reforça a indicação das capacidades dos mesmos de converter celulose. Comparativamente ao fungo termofílico e celulolítico *T. reesei*, a maior capacidade de secreção de celulases totais do *P. sanguineus*, ao contrário dos demais, é revelada pela atividade FPA extracelular (atividade FPA no meio de cultura) indiscutivelmente superior.

É oportuno ressaltar a alta estabilidade das celulases no meio de cultura. Contrariamente, uma estimativa do "pool" de enzimas ativas intracelulares (FPA intracelular) indica uma baixa capacidade de armazenagem de celulases para o *P. sanguineus*, porém alta para os demais, inclusive marcante para o fungo FBM (Tabela 4). No que se refere à capacidade de converter celobiose em glicose, todos os quatro fungos considerados são superiores ao *T. reesei*, como indicado pelas atividades de β -glucosidase detectadas no meio de cultura contendo celulose 1% (Tabela 5). Ressalta-se o *P. sanguineus* com uma taxa de secreção 1,84 vezes superior à do *T. reesei*. Uma coleção de duas cepas de bactérias e quatro de actinomicetos ainda não classificados, isolados por plaqueamentos sucessivos, em meio sólido contendo amido e glicose, foram capazes de crescer em meio

TABELA 4. Atividades celulolíticas totais (FPA) (Ghose 1983) extracelulares e intracelulares de vários fungos, expressas em % em relação ao *T. reesei*, após 140 horas de crescimento a 34°C, em meio líquido (Araújo et al. 1983) contendo 1% de celulose.

Fungo	Atividade celulolítica total (FPA) (% em relação ao controle)	
	Extracelular	Intracelular
<i>Trichoderma reesei</i>	100	100
<i>Picnoporus sanguineus</i>	187	9
<i>Humicola sp.</i>	39	151
F.V.M.	47	177
F.B.M.	35	397

TABELA 5. Atividades de beta-glucosidase (Araújo et al. 1983) extracelulares de vários fungos, expressas em % em relação ao *T. reesei*, após 140 horas de crescimento a 34°C, em meio líquido (Araújo et al. 1983) contendo 1% de celulose.

Fungos	Atividade de β -glucosidase (% em relação ao controle)
<i>Trichoderma reesei</i>	100
<i>Picnoporus sanguineus</i>	1.484
<i>Humicola sp.</i>	321
F.V.M.	355
F.B.M.	276

líquido de sais minerais (Araújo et al. 1983), contendo apenas celulose (1%) como fonte de carbono. A capacidade de secreção de enzimas celulolíticas totais é corroborada pelas atividades (FPA) detectadas nos meios de culturas durante o crescimento dos microorganismos (Fig. 1).

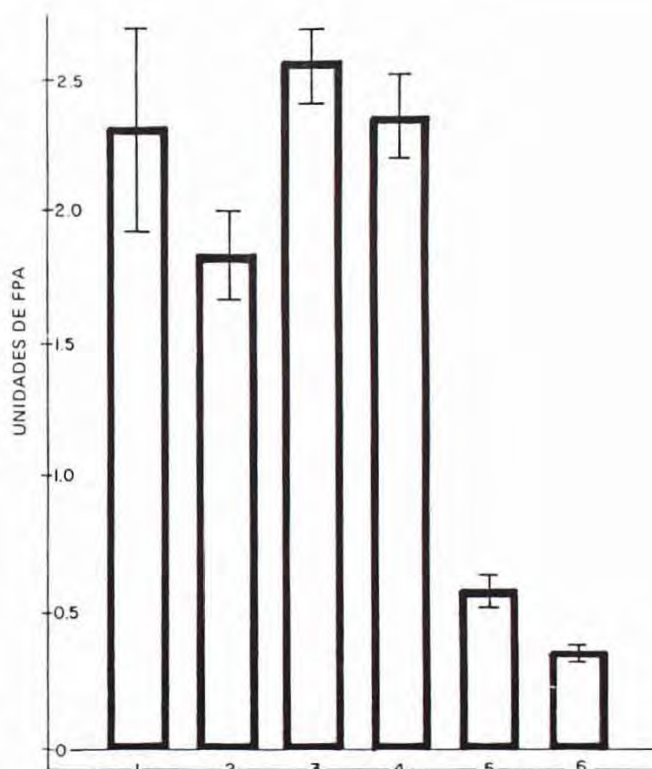


FIG. 1. Atividades celulolíticas totais (unidades de FPA) (Ghose 1983) extracelulares de actinomicetos (1, 2, 3 e 4) e bactérias (5 e 6) isoladas, após tempos diferentes de crescimento (2 a 9 dias) a 34°C, em meio líquido (Araújo et al. 1983) contendo 1% de celulose. Uma unidade de FPA corresponde a 1 mg de açúcar redutor produzido em 1 hora por 1 mL de amostra de enzima.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados iniciais obtidos neste laboratório sobre isolamento e avaliação da capacidade de microorganismos de converter substratos amiláceos e celulósicos revelam a existência, na natureza, de uma vasta gama de microorganismos com alto potencial para um possível aproveitamento em processos biotecnológicos. Estudos mais profundos sobre condições de cultura, condições ótimas de produção/secreção das celulasas e amilases, poderão conduzir a um selecionamento mais adequado. Trabalhos desta natureza estão sendo conduzidos neste laboratório.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A. & SILVA, D.O. Beta-glucosidase activity of the thermophilic and cellulolytic fungus *Hemicella* sp. *Biotechnology Letters*, 11:781-4, 1983.
- BELLAMY, W.E. Role of thermophiles in cellulose recycling. *ASM News*, 45:326-31, 1979.
- COWLING, E.B. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5:163, 1975.
- FAN, L.T.; LEE, Y.H. & BEARDMORE, D.H. *Adv. Biochem. Eng.*, 14:101, 1980.
- GADEN JÚNIOR, E.L.; MANDELS, M.H.; REESE, E.T. & SPANO, L.A., ed. *Enzymatic conversion of cellulosic materials; technology and applications*. New York, J. Willey, 1976.
- GHOSE, T.K. *Measurement of cellulase activity; final recommendations*. International Union of Pure and Applied Chemistry-Comission of Biotechnology, 1983.
- GUNGAY, H.R. *Cellulose conversion to fermentation feedstocks; an overview*. San Juan, s.ed., 1980. (Communication to the Symposium Fuels and Feedstocks from Tropical Biomass.).
- KNAPPERT, D.; GRETHLEIN, H. & CONVERSE, A. Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:1449-64, 1980.
- MANDELS, M. In: TSAO, G.T. *Annu. Reports on Fermentation Processes*, 5:35-78, 1982.
- OGDEN, K. & TUBB, R.S. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* which grows efficiently on starch. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7:220-4, 1985.
- RADOVIDH, J.M. Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7:2-10, 1985.
- TANAKA, M. & MATSUNO, R. Conversion of lignocellulosic materials to single-cell protein (SCP); recent developments and problems. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7:197-206, 1985.
- TSAO, G.T.; LADISCH, M.; LADICH, C.; HSU, T.A.; DALE, B. & CHAU, T. *Annu. Rep. Ferment. Processes*, 2:1, 1978.

SÍNTESE E CLONAGEM DO ds-cDNA CORRESPONDENTE A UM GENE ESPECÍFICO

Edgar Cunha Filho¹

ABSTRACT - The first step for the *in vitro* synthesis of a ds-cDNA corresponding to a specific gene is to extract mRNAs from the cells or tissues where the protein coded by the gene is synthesized. The specific mRNA for the gene isolated from this heterogeneous mRNA population is used as a template for the *in vitro* synthesis of a complementary single-stranded DNA (ss-cDNA). After the mRNA removal the ss-cDNA is by its turn used as a template for the *in vitro* synthesis of a second complementary DNA strand to form a double-stranded DNA (ds-cDNA), containing the coding region of the gene. The ds-cDNA is inserted into a vector (plasmid, bacteriophage or virus) and transferred into a suitable host (*E. coli*, in a general way). Selected transformants are used for the ds-cDNA amplification and characterization. Should the cloned ds-cDNA be used for practical purposes, the strategy to go on with the research will depend on the objectives to be reached.

INTRODUÇÃO

O progresso ocorrido, principalmente nos últimos 20 anos, no campo da biologia molecular, despertou o interesse de muitos pesquisadores para a perspectiva de melhoramento não tradicional de plantas através da utilização de técnicas de engenharia genética. Muito esforço tem sido feito, em todo o mundo, na tentativa de adicionar em plantas de valor econômico informação genética capaz de melhorar suas qualidades nutricionais, torná-las mais produtivas, mais resistentes a doenças e pragas, mais eficientes no processo de utilização do nitrogênio atmosférico, ou mais tolerantes a condições ambientais adversas. Por outro lado, a transformação de bactérias poderá ser utilizada, entre outros objetivos ligados à utilização de plantas, para síntese de substâncias de interesse industrial ou farmacológico, para fermentação de celulose e hemicelulose em etanol, e para decomposição de resíduos tóxicos no solo, provenientes da aplicação de pesticidas. Pode-se concluir, portanto, que a síntese *in vitro* e a clonagem de ds-cDNAs correspondentes a genes que exerçam papel-chave nestes processos são de importância fundamental para que tais objetivos possam ser alcançados.

Geralmente, o primeiro passo para a síntese *in vitro* do ds-cDNA correspondente a um gene específico é a extração de mRNAs de células ou tecidos onde é sintetizada a proteína que o gene codifica. Desta população heterogênea de mRNAs procura-se isolar o mRNA específico para o gene, para ser utilizado como modelo na síntese *in vitro* de uma fita de DNA complementar (ss-cDNA). Após remoção do mRNA, o ss-cDNA é utilizado como modelo para síntese, também *in vitro*, de outra fita de DNA complementar, dando origem a um DNA de dupla fita (ds-cDNA), contendo a região codificante do gene. O ds-cDNA é então ligado a um vetor (plasmídeo, bacteriófago ou vírus) e trans-

ferido para um hospedeiro conveniente (geralmente *E. coli*). Os transformantes relacionados são utilizados para amplificação e caracterização do ds-cDNA.

EXTRAÇÃO DE mRNAs

Os mRNAs podem ser extraídos de células integrais ou de frações celulares (principalmente citoplasma, cloroplastos e mitocôndrios). Os processos de extração são geralmente adaptados a cada organismo ou tecido, e compreendem: a lise das células através de homogeneização, uso de detergentes ou enzimas líticas; a desagregação de nucleoproteínas e desnaturação de proteínas, usando-se detergentes e agentes quelantes, com determinado aquecimento em caso de células integrais (extração de ácidos nucleicos totais); a desproteínização, usando-se fenol, enzimas proteolíticas ou soluções salinas concentradas; a remoção de outros materiais contaminantes; e a precipitação dos ácidos nucleicos, com etanol (Parish 1972). O principal problema, nos processos de extração, é evitar a degradação dos RNAs por ribonucleases que normalmente existem nas células ou nos tecidos. Consegue-se isto usando-se reagentes com elevado índice de pureza, pela esterilização de vidraria e soluções, pela adição de desnaturantes proteicos e/ou proteinase K na solução extratora, e pela manipulação cuidadosa a fim de se evitarem contaminações (Parish 1972). A extração de células integrais para obtenção de ácidos nucleicos totais (Cox 1968, Kirby 1968, Parish 1972, Benveniste et al. 1973, Ullrich et al. 1977) é uma alternativa utilizada principalmente quando as células ou tecidos são ricos em ribonucleases, que podem destruir os RNAs durante o processo de fracionamento celular. O fracionamento, quando possível, é vantajoso, pois a maior parte do DNA celular, contida no núcleo, bem como grande parte da proteína celular é eliminada logo de início. Além disso, o fracionamento permite o isolamento de polissomos, e conseqüentemente daqueles mRNAs que estavam sendo traduzidos no momento em que a extração foi realizada (Cox 1968, Anderson & Key 1971,

¹ Ph.D., Pesquisador, EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 10.2372, 70770 Brasília, DF.

Davies et al. 1972, Wieggers & Hilz 1972, Brawerman 1974, Nienhuis et al. 1974, Palmiter 1974, Schimke et al. 1974, Hilz et al. 1975, Larkins & Davies 1975, Highfield & Ellis 1978, Sripathi & Warner 1978, Bedbrook et al. 1980). Quando necessária, a eliminação de DNA é feita com o emprego de deoxirribonucleases ou por centrifugação em gradiente de CsCl (Glisim et al. 1974). Esta centrifugação elimina também as proteínas, evitando a necessidade de usar outros métodos de desproteinização. A eliminação de polissacarídeos, caso seja também necessária, é feita com base na solubilidade destes compostos em isopropanol, acetato de sódio ou m-cresol em solução de benzoato de sódio, enquanto os ácidos nucléicos se precipitam. Outra alternativa seria a utilização de soluções concentradas de fosfato de potássio em presença de 2-metoxietanol (Methyl Cellosolve), de modo que os polissacarídeos se precipitem enquanto os ácidos nucléicos permanecem em solução (Parish 1972).

A maioria dos mRNAs de eucariotos possui na extremidade 3' uma extensão de poli (A), contendo de 20 a 250 nucleotídeos. Em virtude disto, estes mRNAs podem ser separados de outros tipos de RNA por cromatografia de afinidade em poli (U)-sefaroze, ou, mais comumente, em oligo (dT)-celulose (Aviv & Leder 1972, Nakazato & Edmonds 1974).

ISOLAMENTO DO mRNA ESPECÍFICO

Vários métodos podem ser utilizados. Os mais usados baseiam-se no fracionamento dos mRNAs através de centrifugação em gradiente de sacarose (McConkey 1967) e eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Grierson 1982). De modo geral, não se consegue, com estes métodos, uma completa purificação do mRNA específico, mas uma fração enriquecida com este mRNA.

O método que pode proporcionar maior purificação do mRNA específico é o de imunoprecipitação de polissomos, utilizando-se de anticorpos específicos contra a proteína codificada pelo gene (Schimke et al. 1974). Entretanto, a precipitação geralmente não ocorre quando se usa imunoprecipitação direta (incubação dos anticorpos específicos com os polissomos). Neste caso, há necessidade de se fazer imunoprecipitação indireta, usando-se um segundo anticorpo contra o primeiro (Shapiro et al. 1974, Vodkim 1981), ou, alternativamente, usando-se proteína A de *Staphylococcus aureus*, que tem a propriedade de se complexar a IgGs (Taylor 1979). Posteriormente, o mRNA é isolado do complexo anticorpo-polissomo por extração, em presença de detergentes e fenol e por cromatografia em oligo (dT)-celulose. Para utilização do método imunológico, é necessário que se obtenha anticorpos purificados, livres de reações cruzadas (Palmiter et al. 1971, Jurd 1981) e isentos de RNase (Palacios et al. 1972, Schimke et al. 1974). O uso de anticorpos monoclonais poderá permitir a obtenção de

mRNA específico com índice maior ainda de purificação (Monoclonal... 1984). Por razões de natureza técnica, o método imunológico não funciona em muitos casos, e por isto o método da fração enriquecida tem sido mais utilizado.

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CODIFICADA PELO GENE

A caracterização do mRNA específico é feita através da proteína que ele traduz. Além disso, testes imunológicos poderão vir a ser utilizados na seleção de recombinantes e caracterização do ds-cDNA. Por isto, a purificação da proteína codificada pelo gene, extraída das células ou dos tecidos onde é sintetizada, é de grande importância no processo de síntese *in vitro* e clonagem do ds-cDNA correspondente a este gene, para servir como termo de comparação para a proteína traduzida pelo mRNA e como antígeno para obtenção de anticorpos.

CARACTERIZAÇÃO DO mRNA ESPECÍFICO

É feita através de tradução *in vitro*, usando-se alguns aminoácidos marcados e análise dos produtos da tradução (Hall et al. 1978). Para mRNAs de procariotos, o principal meio sintetizador é a fração S-30 do extrato de *E. coli* (Modollel 1971, Speirs & Grierson 1978). Para eucariotos, os dois principais meios sintetizadores são a fração S-30 do extrato de germe de trigo (Roberts & Paterson 1973, Marcu & Dudock 1974) e o sistema derivado do lisado de reticulócitos de coelho (Schimke et al. 1974, Pelham & Jackson 1976). A maneira mais comum de analisar os produtos da tradução é através de fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida e detecção das bandas radioativas por meio de auto-radiografia ou fluorografia. A proteína traduzida pelo mRNA é identificada pela sua mobilidade e pelo seu peso molecular, comparados aos de proteínas-padrão (Bonner & Laskey 1974, Laskey & Mill 1975). Podem-se utilizar, também, testes imunológicos. A proteína traduzida pelo mRNA é imunoprecipitada do meio em que se realizou a tradução e aplicada ao gel de poliacrilamida preparado para análise dos produtos obtidos, sendo sua mobilidade e peso molecular comparados aos das proteínas-padrão (Apel & Kloppstech 1978).

Síntese do ss-cDNA

O mRNA específico é utilizado como modelo para a síntese *in vitro* de uma fita de DNA complementar (ss-cDNA). Esta síntese é realizada pela enzima transcriptase reversa, extraída do vírus da mieloblastose aviária (Fig. 1). A enzima exige a presença de um iniciador ("primer"), e o mais comumente usado é um oligo (dT) contendo 10 a 20 nucleotídeos, que se liga à extensão de poli (A)

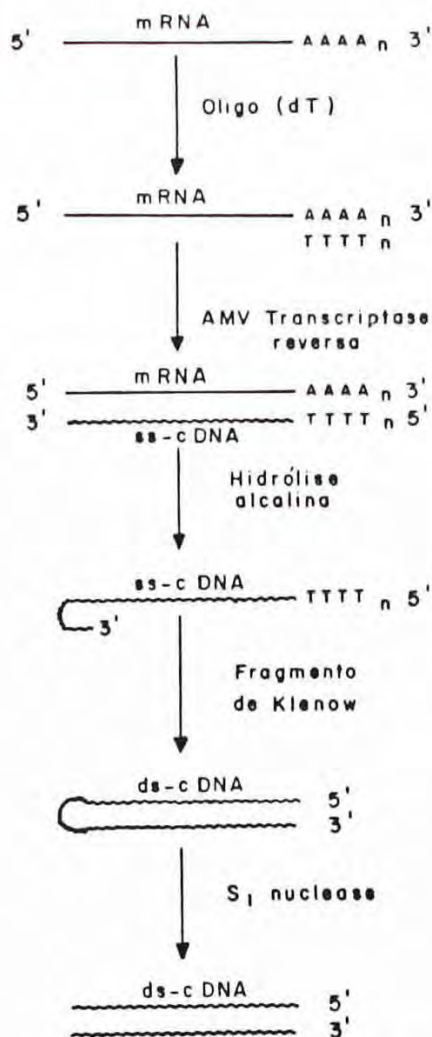


FIG. 1. Síntese do ds-cDNA a partir do mRNA específico.

do mRNA (Baltimore 1970, Temin & Mizutani 1970, Kacian et al. 1972, Ross et al. 1972, Verma et al. 1972, Efstratiadis et al. 1975, Kacian & Myers 1976, Maniatis et al. 1976a, Monahan et al. 1976, Buell et al. 1978, Bedbrook et al. 1980, Evans et al. 1980, Retzel et al. 1980). No caso excepcional do mRNA não possuir a extensão poli (A), ela poderá ser sintetizada na sua extremidade 3' pela enzima poli (A) polimerase de *E. coli* (Hell et al. 1976, Emtage et al. 1980). As condições ótimas para a síntese do ss-cDNA podem variar de um caso para outro, devendo-se procurar aquelas condições que permitam obter maior produção de ss-cDNA de comprimento integral.

Se for conhecida alguma seqüência nucleotídica do mRNA específico, ou alguma seqüência de aminoácidos da proteína por ele traduzida, poder-se-á sintetizar quimi-

camente um iniciador específico. O uso deste iniciador permitirá a síntese de um ss-cDNA bem purificado, utilizando-se de uma população heterogênea de mRNAs (Chan et al. 1979).

Síntese do ds-cDNA

O mRNA usado como modelo para a síntese do ss-cDNA é removido através de hidrólise alcalina, e o ss-cDNA utilizado como modelo para a síntese do ds-cDNA (Fig. 1). Não é necessário adicionar iniciador ao meio da reação, uma vez que o ss-cDNA possui um iniciador próprio, formado por uma região autocomplementar na extremidade 3', que forma uma alça semelhante a um grampo de cabelo. Uma das enzimas que pode ser utilizada para esta síntese é a DNA polimerase 1 de *E. coli* (Efstratiadis et al. 1976, Higuchi et al. 1976, Maniatis et al. 1976a, Maniatis et al. 1976b). Esta enzima, entretanto, possui atividade exonucleolítica tanto no sentido 5' - 3' quanto no 3' - 5', e pode dar origem à formação de ds-cDNAs anormais, se as condições da reação não forem muito bem controladas (Wickens 1978). Por isto, outras enzimas têm sido preferidas, como a T4 DNA polimerase (Williams & Lloyd 1979) e o fragmento de Klenow, derivado de DNA polimerase 1 (Rougeon & Mach 1976, Bedbrook et al. 1980), que têm atividade exonucleolítica apenas no sentido 3' - 5'. Outra enzima que pode ser utilizada nesta síntese é a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, que não possui atividade exonucleolítica e é menos exigente quanto ao controle das condições da reação (Monahan et al. 1976, Rougeon & Mach 1976, 1977, McReynolds et al. 1977, Ullrich et al. 1977). Qualquer que seja a enzima utilizada, o ds-cDNA terá uma extremidade fechada (onde existe a alça) e outra aberta.

Em vez de hidrólise alcalina, pode-se usar hidrólise enzimática, com RNase H, para remoção do mRNA (Perbal 1984). Esta alternativa elimina a necessidade de clivagem da alça e remoção do segmento de ss-cDNA (descrita no item seguinte), aumentando a probabilidade de se obter um ds-cDNA de tamanho integral ou quase integral.

Clivagem da alça e remoção do segmento de ss-cDNA

É necessária quando o mRNA é removido através de hidrólise alcalina. Tanto a clivagem da alça quanto a remoção do segmento de ss-cDNA são feitas em uma só digestão, usando-se a enzima S₁ nuclease de *Aspergillus oryzae*, que possui especificidade para DNA de uma fita (Shenk et al. 1976, Maniatis et al. 1976). Após a digestão, o ds-cDNA se apresentará com as extremidades cegas (Fig. 1).

Isolamento das moléculas de ds-cDNA de comprimento integral

O isolamento pode ser feito por eletroforese em gel de poliacrilamida (Efstratiadis et al. 1976, Maniatis et al. 1976) ou por centrifugação em gradiente de sacarose (Humphries et al. 1977), usando-se, para a clonagem, os ds-cDNAs de maior peso molecular. Quando a conversão de ss-cDNA em ds-cDNA é eficiente, este isolamento se torna desnecessário. O uso da enzima transcriptase reversa, que é muito eficiente, elimina, geralmente, a necessidade deste isolamento (McReynolds et al. 1977, Kay et al. 1980).

Ligação do ds-cDNA a um vetor

Os vetores usados são plasmídeos, bacteriófagos ou vírus. A ligação do ds-cDNA com extremidades cegas a um vetor possuindo também extremidades cegas é possível (Cochet et al. 1979), mas as duas maneiras mais comuns de se fazer esta ligação são através do uso de adaptadores sintéticos ou de extensões homopoliméricas.

Os adaptadores são oligômeros sintéticos de um ou mais sítios de restrição, para uma enzima que não clive o ds-cDNA, mas que seja capaz de clivar o vetor (Rothstein et al. 1979). Os adaptadores, quando de extremidades cegas, são ligados ao ds-cDNA pela enzima T4 DNA ligase (Bolivar & Backman 1979). Em reações separadas, o complexo adaptador-ds-cDNA e o vetor são clivados pela enzima de restrição, formando extremidades coesivas, através das quais eles possam se anelar (Heyneker et al. 1976). Após a clivagem do vetor, é necessário utilizar a enzima fosfatase alcalina na remoção do P da extremidade 5', para evitar a auto-recombinação (Croy et al. 1982, Sippel et al. 1978). A Fig. 2 apresenta um exemplo teórico do uso de adaptadores.

O uso de extensões homopoliméricas é, teoricamente, exemplificado na Fig. 3. A enzima terminal deoxinucleotidil transferase adiciona nucleotídeos à extremidade 3' do ds-cDNA e do vetor linearizado. Os nucleotídeos adicionados ao ds-cDNA sendo complementares aos adicionados ao vetor, a formação de recombinantes ocorrerá sem necessidade de catálise enzimática (Jackson et al. 1972, Lobban & Kaiser 1973). A enzima terminal deoxinucleotidil transferase é muito eficiente quando o DNA possui extensões de uma fita na extremidade 3' (Lobban & Kaiser 1973, Maniatis et al. 1976). Quando a extremidade 3' é cega ou recolhida, a eficiência da enzima poderá ser melhorada pela presença de cobalto (Roychoudhury et al. 1976), usando-se, preferencialmente, dG e dC para formação das extensões homopoliméricas, ou, quando isto não for conveniente, adicionando-se dA ao vetor, que possui maior quantidade de DNA, e dT ao ds-cDNA (Deng & Wu 1981). A hibridização entre poli (dC) e poli (dG) é mais estável que entre poli (dA) e poli (dT). Assim, a extensão homopolimérica deve

ter de 10 a 25 nucleotídeos, quando se usam poli (dC) e poli (dG), e 20 a 40 nucleotídeos, quando se usam poli (dA) e poli (dT) (Deng & Wu 1981).

Transformação de *E. coli* com o ds-cDNA

A clonagem do ds-cDNA em um hospedeiro conveniente, para fins de amplificação e caracterização, é sempre necessária. O hospedeiro mais comumente usado é *E. coli*. A transformação é feita incubando-se, com bactérias competentes, o vetor contendo o ds-cDNA. As células de *E. coli* se tornam competentes para a aquisição de DNA estranho quando tratadas com solução de CaCl₂ (Mandel & Higa 1970, Cohen et al. 1972, Lederberg & Cohen 1974). A eficiência da transformação, entretanto, é muito baixa (10³ a 10⁴ transformantes por micrograma de DNA, sob a forma de plasmídeo linearizado), ou seja, um transformante por 10⁷ a 10⁸ moléculas de DNA. Daggert & Ehrlich (1979) conseguiram melhorar a eficiência do processo, aumentando o tempo de tratamento das células com CaCl₂. As células podem se manter competentes por até 15 meses, se armazenadas a -82°C em solução contendo glicerol (Morrison 1979).

Seleção de transformantes e caracterização do ds-cDNA

Se o ds-cDNA clonado é expresso no hospedeiro e codificado para um caráter fenotípico selecionável, a seleção de transformantes será muito facilitada. Na maioria dos casos, entretanto, pelo menos uma destas condições não é satisfatória, e a seleção pode se tornar bastante trabalhosa. A escolha dos métodos de seleção, entre os muitos existentes, dependerá da estratégia utilizada na transformação.

Hibridização: Método de ampla aplicação, desenvolvido por Grunstein & Hogness (1975), e redescrito por Grunstein & Wallis (1979). Após o processo de transformação, as bactérias são espalhadas sobre filtro de nitrocelulose, em forma de disco, colocado sobre placa-de-Petri contendo meio nutritivo, e incubadas a 37°C para multiplicação. Depois de obter-se uma réplica, as colônias são lisadas em meio alcalino e aquecidas a 80°C, para fixação do DNA ao filtro. A hibridização é feita com uma sonda radioativa. Esta sonda pode ser o mRNA ou o ds-cDNA, marcados pelo processo conhecido como "nick translation" (Rigby et al. 1977), ou um oligonucleotídeo sintético. As colônias contendo material radioativo (provenientes de bactérias transformadas) são identificadas por auto-radiografia ou fluorografia.

Inserção inativadora: Quando o ds-cDNA é inserido em uma região do vetor, constituída por um marcador genético, a seleção é feita com base na perda da característica codificada pelo marcador. Entre os marcadores mais utilizados estão aqueles que codificam para resistência a deter-

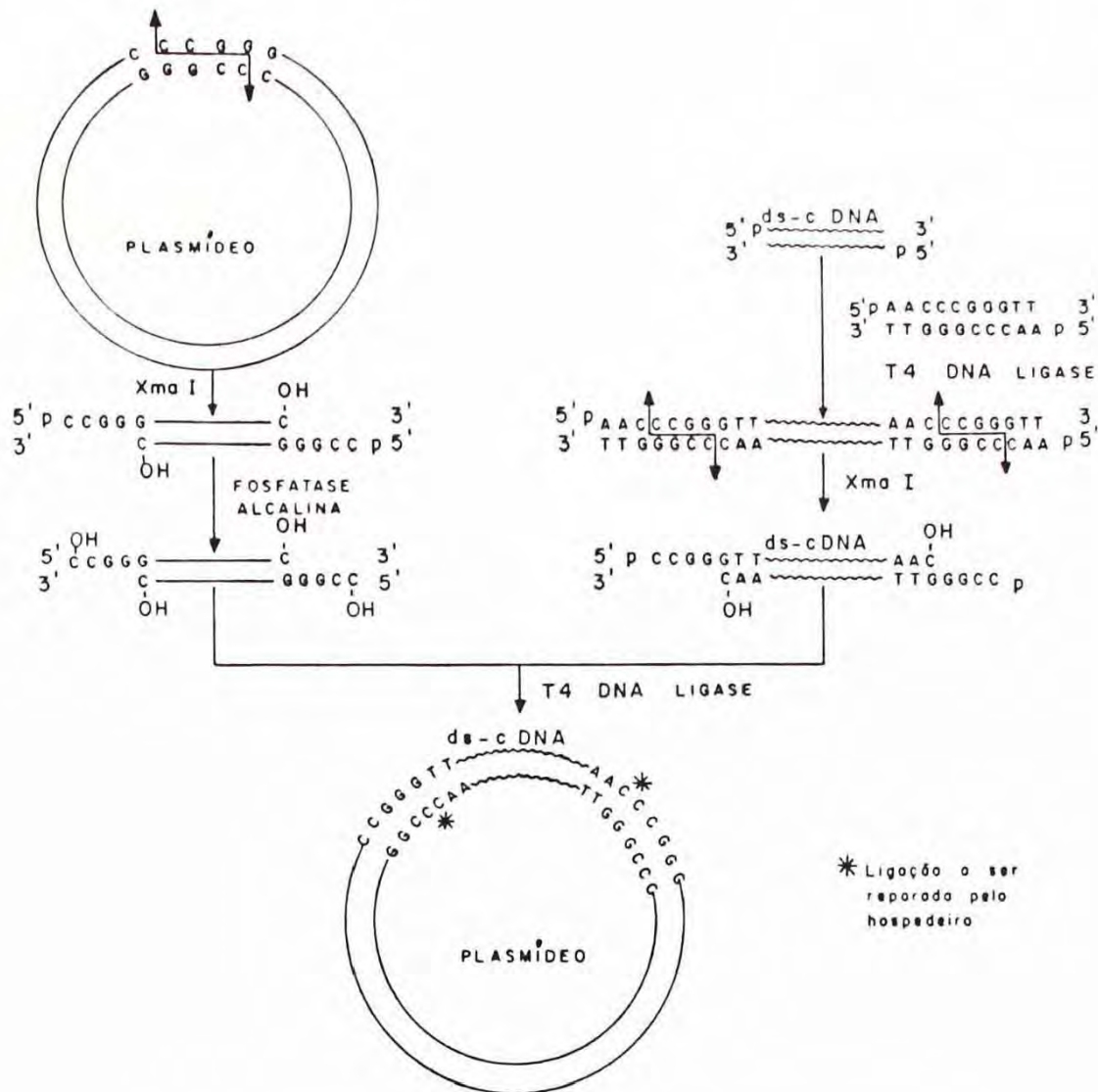


FIG. 2. Inserção de um ds-cDNA em um plasmídeo usando-se adaptadores.

minados antibióticos, como tetraciclina (Bolivar et al. 1977), cloranfenicol (Chang & Cohen 1978), colicina (So et al. 1975), e o que codifica para a enzima β -galactosidase, cuja presença pode ser detectada através de teste colorimétrico (Blattner et al. 1977).

Análises de tamanho e peso molecular: Clones obtidos de células que passaram pelo processo de transformação são lisados e submetidos à eletroforese. O tratamento do gel com brometo de etídio revelará as bandas de DNA, sendo os vetores distinguidos do DNA cromossomal por apresentarem maior mobilidade, devido ao menor tamanho (Barnes 1977, Telford et al. 1977). Por outro lado, o vetor, isolado das bactérias, pode ser clivado com enzimas de restrição. A

análise do número de fragmentos e seus respectivos pesos moleculares, através de eletroforese ou centrifugação em gradiente de CsCl, poderá indicar se o vetor transporta ou não o ds-cDNA (Chang & Cohen 1974).

Métodos imunológicos: Podem ser utilizados quando há expressão do ds-cDNA clonado, isto é, quando a proteína (antígeno) por ele codificada é produzida no hospedeiro. Num destes métodos (Clarke et al. 1979), as cavidades de placas de plástico para microtitulação são revestidas com o anticorpo contra o antígeno (IgGs se ligam fortemente a superfícies plásticas pela região Fc, conservando, portanto, a capacidade de formar complexo com o antígeno). Extratos de clones de células, que passaram pelo processo de

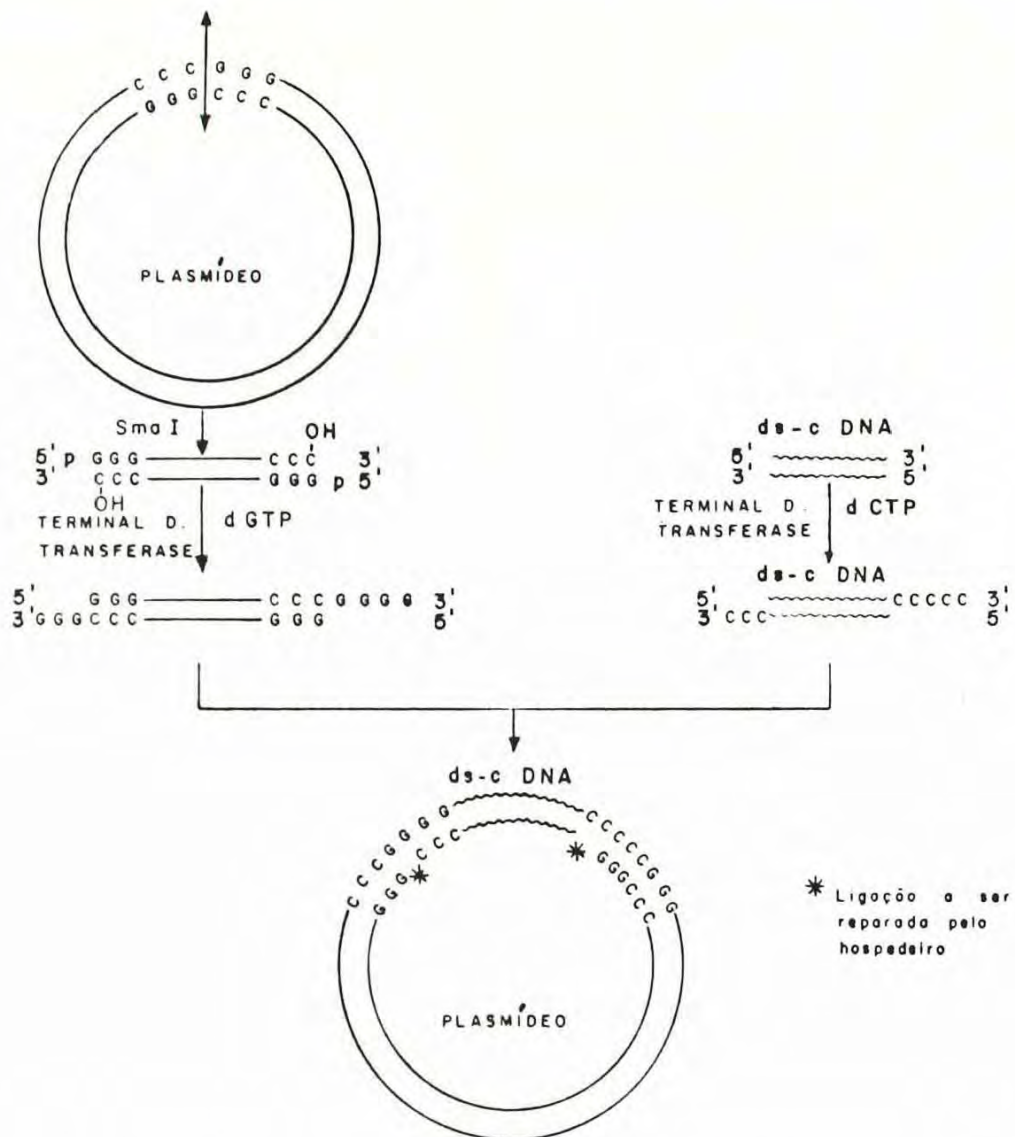


FIG. 3. Inserção de um ds-cDNA em um plasmídeo usando-se extensões homopoliméricas.

transformação, são adicionados às cavidades. Se algum dos extratos contiver o antígeno, ele se ligará ao anticorpo. Após lavagem do material não-ligado, as células são incubadas com o mesmo anticorpo, porém marcado com I^{125} . Onde houver antígeno, haverá formação de um sanduíche (anticorpo não marcado-antígeno-anticorpo marcado), em que o antígeno é o recheio. Recortando-se as cavidades, os sanduíches poderão ser identificados através de contagem de radioatividade em cintilador.

Em outro método, desenvolvido por Erlich et al. (1979), os fragmentos Fc das IgGs são removidos por diges-

tão com pepsina e cromatografia de afinidade, e os fragmentos F (ab) 2' são covalentemente ligados ao papel de diazobenziloximetil-celulose. Este papel é levemente comprimido contra colônias de bactérias lisadas (ver hibridização) e incubadas com o anticorpo intacto (que não teve o fragmento Fc removido), formando-se, onde houver o antígeno, um sanduíche semelhante ao descrito no método anterior. Incubando-se o papel com proteína A de *Staphylococcus aureus*, marcada com I^{125} , os sanduíches poderão ser identificados, posteriormente, por auto-radiografia. As colônias transformadas são recuperadas de réplicas feitas previamente.

Broome & Gilbert (1978) desenvolveram um método no qual discos plásticos são revestidos com os anticorpos e levemente comprimidos contra as colônias lisadas. Os discos são então incubados com o anticorpo marcado com I^{125} e a presença de sanduíches detectada por auto-radiografia. Um método semelhante, em que o disco plástico é substituído por papel ativado com CNBr, foi desenvolvido por Clarke et al. (1979).

Outro método, descrito por Anderson et al. (1979), consiste em lisar as colônias de bactérias, desenvolvidas sobre meio nutritivo em placa-de-Petri, e cobri-las com gel à base de ágar, contendo o anticorpo. As colônias contendo a proteína codificada pelo ds-cDNA são identificadas pela formação de um anel de precipitação. Alternativamente, o anticorpo pode ser adicionado ao meio nutritivo sobre o qual as colônias irão se formar.

Tradução do mRNA liberado da hibridização: O vetor contendo o ds-cDNA é ligado a um filtro de nitrocelulose e hibridizado com o seu mRNA, purificado ou não. Depois da eliminação do material não hibridizado, o mRNA hibridizado é eluído e traduzido *in vitro*. Os produtos da tradução são analisados por processo eletroforético, e entre eles deve estar a proteína traduzida pelo mRNA (Derynck et al. 1980, Forde et al. 1981).

Tradução do mRNA hibridizado: O vetor contendo o ds-cDNA, linearizado e desnaturado, é hibridizado com o mRNA, purificado ou não. Os ácidos nucleicos recuperados são colocados em um sistema para tradução *in vitro*, e entre os produtos da tradução não deve estar o do mRNA correspondente ao ds-cDNA, uma vez que, em forma híbrida, o mRNA não traduz a síntese de proteína (Paterson et al. 1977).

Microscopia eletrônica: A hibridização do mRNA com o respectivo ds-cDNA provocará o deslocamento da fita de DNA idêntica ao mRNA, dando origem à formação de uma alça (R-loop), que pode ser visualizada através do microscópio eletrônico (Rosbash et al. 1979).

Seqüenciamento: A seqüência de nucleotídeos do ds-cDNA (Maxam & Gilbert 1977, Sanger et al. 1977, Davies 1982) ou do mRNA (D'Alessio 1982) pode ser comparada à seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo ds-cDNA (Edman 1967, Niall 1973).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a seleção de transformantes e a caracterização do ds-cDNA neles contido, a estratégia de ação para prosseguimento da pesquisa dependerá do objetivo a ser alcançado. Se o objetivo for a produção em larga escala da proteína codificada, é necessário que haja expressão do ds-cDNA no hospedeiro, com síntese da proteína em níveis satisfatórios. Se isto não ocorrer, a pesquisa deverá ser dirigida no sentido de solucionar estes problemas. Para outros objetivos, poderá ser necessária a transferência do ds-cDNA, ligado ao mesmo

vetor ou a outro vetor conveniente, para outro hospedeiro. A transformação de plantas está incluída neste caso. Um ponto que merece ser mencionado é que o ds-cDNA, isotopicamente marcado, pode ser utilizado para isolamento do gene diretamente do genoma.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Dr. Marco André Schwarzstein pela valiosa discussão de alguns pontos deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D.; SHPIRO, L. & SKALKKA, A.M. *In situ* immunassay for translation products. *Methods in Enzymology*, **68**: 428-36, 1979.
- ANDERSON, J.M. & KEY, J.L. The effects of diethyl pyrocarbonate on stability and activity of plant polyribosomes. *Plant Physiol.*, **48**:801-5, 1971.
- APEL, K. & KLOPPSTECH, K. The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*); light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.*, **85**:581-8, 1978.
- AVIV, H. & LEDER, P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**:1408-12, 1972.
- BALTIMORE, D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, **226**:1209-11, 1970.
- BARNES, W.M. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science*, **195**:393-4, 1977.
- BEDBROOK, J.R.; SMITH, S.M. & ELLIS, R.J. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the precursor to the small subunit of chloroplast ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Nature*, **287**:692-7, 1980.
- BENVENISTE, K.; WILCZEK, J. & STERN, R. Translation of collagen mRNA from chick embryo calvaria in a cell-free system derived from Krebs II ascites cells. *Nature*, **246**:303-5, 1973.
- BLATTNER, F.R.; WILLIAMS, B.G.; BLECHL, A.E.; DENNISTON-THOMPSON, K.; FABER, H.E.; FURLONG, L.A.; GRUNWALD, D.J.; KIEFER, D.O.; MOORE, D.D.; SCHUMM, J.W.; SHELDON, E.L. & SMITHIES, O. Charon phages; safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science*, **196**:161-9, 1977.
- BOLIVAR, F. & BACKMAN, K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods in Enzymology*, **68**:245-67, 1979.
- BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R.L.; GREENE, P.J.; BETLACH, M.C.; HEYNEKER, H.L.; BOYER, H.W.; CROSA, J.H. & FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**:95-113, 1977.

- BONNER, W.M. & LASKEY, R.A. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, **46**:83-8, 1974.
- BRAWERMAN, G. The isolation of messenger RNA from mamalian cells. *Methods in Enzymology*, **30**:605-12, 1974.
- BROOME, S. & GILBERT, W. Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**:2476-9, 1978.
- BUELL, G.N.; WILCKENS, M.P.; PAYVAR, F. & SCHIMKE, R.T. Synthesis of full lenght cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J. Biol. Chem.*, **253**:2471-82, 1978.
- CHAN, S.J.; NOYES, B.E.; AGARWAL, K.L. & STEINER, D.F. Construction and selection of recombinant plasmids containing full lenght complementary DNAs corresponding to rat insulins I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**:5036-40, 1979.
- CHANG, A.C.Y. & COHEN, S.N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**:1141-56, 1978.
- CHANG, A.C.Y. & COHEN, S.N. Genome construction between bacterial species *in vitro*; replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**:1030-4, 1974.
- CLARKE, L.; HITZEMAN, R. & CARBON, J. Selection of specific clones from colony banks by screening with radioactive antibody. *Methods in Enzymology*, **68**:436-42, 1979.
- COCHET, M.; PERRIN, F.; GANNON, F.; KRUST, A. & CHAMBON, P. Cloning of an almost full-length chicken conalbumin double-stranded cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **6**:2435-52, 1979.
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y. & HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria; genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**:2110-4, 1972.
- COX, R.A. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods in Enzymology*, **12B**:120-9, 1968.
- CROY, R.R.D.; LYCETT, G.W.; GATEHOUSE, J.A.; YARWOOD, J.N. & BOULTER, D. Cloning and analysis of cDNAs encoding plant storage protein precursors. *Nature*, **295**:76-9, 1982.
- DAGGERT, M. & EHRLICH, S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6**:23-8, 1979.
- D'ALESSIO, J.M. RNA sequencing. In: RICKWOOD, D. & HAMES, B.D. *Gel electrophoresis of nucleic acids; a practical approach*. Eynsham, IRL Press, 1982. p.173-97.
- DAVIES, E.; LARKINS, B.A. & KNIGHT, R.H. Polyribosomes from peas; an improved method for their isolation in the absence of ribonuclease inhibitors. *Plant Physiol.*, **50**:581-4, 1972.
- DAVIES, R.W. DNA sequencing. In: RICKWOOD, D. & HAMES, B.D. *Gel electrophoresis of nucleic acids; a practical approach*. Eynsham, IRL Press, 1982. p.167-72.
- DENG, G. & WU, R. An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **9**:4173-88, 1981.
- DERYCNCK, R.; CONTENT, J.; DECLERCQ, E.; VOLCKAERT, G.; TAVERNIER, J.; DEVOS, R. & FIERS, W. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. *Nature*, **285**:542-7, 1980.
- EDMAN, P. & BEGG, G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**:80-91, 1967.
- EFSTRATIADIS, A.; KAFATOS, F.C.; MAXAM, A.M. & MANIATIS, T. Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. *Cell*, **7**:279-88, 1976.
- EFSTRATIADIS, A.; MANIATIS, T.; KAFATOS, F.C.; JEFFREY, A. & VOURNAKIS, J.N. Full lenght and discrete partial reverse transcripts of globin and chorion mRNAs. *Cell*, **6**:367-78, 1975.
- EMTAGE, J.S.; TACON, W.C.A.; CATLIN, G.H.; JENKINS, B.; PORTER, A.G. & CAREY, N.H. Influenza antigenic determinants are expressed from haemagglutinin gene cloned in *Escherichia coli*. *Nature*, **283**:171-4, 1980.
- ERLICH, H.A.; COHEN, S.N. & McDEVITT, H.O. Immunological detection and characterization of products translated from cloned DNA fragments. *Methods in Enzymology*, **68**:443-53, 1979.
- EVANS, I.M.; CROY, R.R.D.; BROWN, P. & BOULTER, D. Synthesis of complementary DNAs to partially purified mRNAs coding for the storage proteins of *Pisum sativum* (L.). *Biochem. Biophys. Acta*, **610**:81-95, 1980.
- FORDE, B.G.; KREIS, M.; BAHRAMIAN, M.B.; MATTHEWS, J.A.; MIFLIN, B.J.; THOMPSON, R.D.; BARTELS, D. & FLAVELL, R.B. Molecular cloning and analysis of cDNA sequences derived from poly A⁺ RNA from barley endosperm; identification of B horde in related clones. *Nucleic Acids Res.*, **9**:6689-707, 1981.
- GLISIN, V.; CRKVENJAKOV, R. & BYUS, C. Ribonucleic acid isolated by caesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, **13**:2633-7, 1974.
- GRIERSON, D. Gel electrophoresis of RNA. In: RICKWOOD, D. & HAMES, B.D. *Gel electrophoresis of nucleic acids; a practical approach*. Eynsham, IRL Press, 1982. p.1-38.
- GRUNSTEIN, M. & HOGNESS, D.S. Colony hybridization; a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**:3961-5, 1975.
- GRUNSTEIN, M. & WALLIS, J. Colony hybridization. *Methods in Enzymology*, **68**:379-89, 1979.
- HALL, T.C.; MA, Y.; BUCHBINDER, B.U.; PYNE, J.W.; SUN, S.M. & BLISS, F.A. Messenger RNA for G1 protein of French-bean seeds; cell-free translation and product characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**:3196-200, 1978.
- HELL, A.; YOUNG, B.D. & BIRNIE, G.D. Synthesis of DNAs complementary to human ribosomal RNAs polyadenylated *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta*, **442**:37-49, 1976.

- HEYNEKER, H.L.; SHINE, J.; GOODMAN, H.M.; BOYER, H.W.; ROSEMBERG, J.; DICKERSON, R.E.; NARANG, S.A.; ITAKURA, K.; LIN, S. & RIGGS, A.D. Synthetic lac operator DNA is functional *in vivo*. *Nature*, **263**:748-52, 1976.
- HIGHFIELD, P.E. & ELLIS, R.J. Synthesis and transport of the small subunit of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase. *Nature*, **271**:420-4, 1978.
- HIGUCHI, R.; PADDOCK, G.V.; WALL, R. & SALSER, W. A general method for cloning eukaryotic structural gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**:3146-50, 1976.
- HILZ, H.; WIEGERS, U. & ADAMIETZ, P. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents; application to the isolation of nucleic acids and the degradation of "masked proteins". *Eur. J. Biochem.*, **56**:103-8, 1975.
- HUMPHRIES, P.; COCHET, M.; KRUST, A.; GERLINGER, P.; KOURILSKY, P. & CHAMBON, P. Molecular cloning of extensive sequences of the *in vitro* synthesized chicken ovalbumin structural gene. *Nucleic Acids Res.*, **4**:2389-406, 1977.
- JACKSON, D.A.; SYMONS, R.H. & BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40; Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**:2904-9, 1972.
- JURD, R.D. Immunoelectrophoresis. In: HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. *Gel electrophoresis of proteins; a practical approach*. Eynsham, IRL Press, 1981. p.229-48.
- KACIAN, D.L. & MYERS, J.C. Synthesis of extensive, possibly complete, DNA copies of poliovirus RNA in high yields and at high specific activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**:2191-5, 1976.
- KACIAN, D.L.; SPIEGELMAN, S.; BANK, A.; TERADA, M.; METAFORA, S.; DOW, L. & MARKS, P.A. *In vitro* synthesis of DNA components of human genes for globins. *Nature New Biol.*, **235**:167-9, 1972.
- KAY, R.M.; HARRIS, R.; PATIENT, R.K. & WILLIAMS, J.G. Molecular cloning of cDNA sequences coding for the major α - and β -globin polypeptides of adult *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.*, **8**:2691-707, 1980.
- KIRBY, K.S. Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Methods in Enzymology*, **12B**:87-99, 1968.
- LARKINS, B.A. & DAVIES, E. Polyribosomes from peas. *Plant Physiol.*, **55**:749-56, 1975.
- LASKEY, R.A. & MILLS, A.D. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**:335-41, 1975.
- LEDERBERG, E.M. & COHEN, S.N. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **119**:1072-74, 1974.
- LOBBAN, P.E. & KAISER, A.D. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.*, **78**:453-71, 1973.
- MANDEL, M. & HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**:159-62, 1970.
- MANIATIS, T.; EFSTRATIADIS, A.; KEE, S.G. & KAFATOS, F.C. *In vitro* synthesis and molecular cloning of eukaryotic structural genes. In: NIERLICH, D.P.; RUTTER, W.J. & FOX, C.F. *Molecular mechanism in the control of gene expression*. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cell Biology, 1976a. vol. 5, p.513-33.
- MANIATIS, T.; KEE, S.G.; EFSTRATIADIS, A. & KAFATOS, F.C. Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized *in vitro*. *Cell*, **8**: 163-82, 1976b.
- MARCU, K. & DUDOCK, B. Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. *Nucleic Acids Res.*, **1**:1385-97, 1974.
- MAXAM, A.M. & GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**:560-4, 1977.
- McCONKEY, E.H. The fractionation of RNAs by sucrose gradient centrifugation. *Methods in Enzymology*, **12A**:620-34, 1967.
- McREYNOLDS, L.A.; MONAHAN, J.J.; BENDURE, D.W.; WOO, S.L.C.; PADDOCK, G.V.; SALSER, W.; DORSON, J.; MOSES, R.E. & O'MALLEY, B.W. The ovalbumin gene; insertion of ovalbumin gene sequences in chimeric bacterial plasmids. *J. Biol. Chem.*, **252**:1840-3, 1977.
- MODELELL, J. The S-30 system from *Escherichia coli*. In: LAST, J.A. & LASKIN, A.I. *Methods in molecular biology*. s.l., s.ed., 1971. vol. 1, p.1-65.
- MONAHAN, J.J.; McREYNOLDS, L.A. & O'MALLEY, B.W. The ovalbumin gene; *in vitro* enzymatic synthesis and characterization. *J. Biol. Chem.*, **251**:7355-62, 1976.
- MONOCLONAL antibodies; technical opportunities. Fort Lee, Technical Insights, 1984. 243p.
- MORRISON, D.A. Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. *Methods in Enzymology*, **68**:326-31, 1979.
- NAKAZATO, H. & EDMONDS, M. Purification of messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA containing poly (A) sequences. *Methods in Enzymology*, **29**:431-43, 1974.
- NIALL, H.D. Automated Edman degradation; the protein sequenator. *Methods in Enzymology*, **27**:942-1010, 1973.
- NIENHUIS, A.W.; FALVEY, A.K. & ANDERSON, W.F. Preparation of globin messenger RNA. *Methods in Enzymology*, **30**:621-30, 1974.
- PALACIOS, R.; PALMITER, R.D. & SCHIMKE, R.T. Identification and isolation of ovalbumin-synthesizing polysomes. *J. Biol. Chem.*, **247**:2316-21, 1972.
- PALMITER, R.D. Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes; expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, **13**: 3606-15, 1974.

- PALMITER, R.D.; OKA, T. & SCHIMKE, R.T. Modulation of ovalbumin synthesis by estradiol-17 β and actinomycin D as studied in explants of chick oviduct in culture. *J. Biol. Chem.*, **246**:724-37, 1971.
- PARISH, J.H. *Principles and practice of experiments with nucleic acids*. London, Longman, 1972. 511p.
- PATERSON, B.M.; ROBERTS, B.E. & KUFF, E.L. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**:4370-4, 1977.
- PELHAM, H.R.B. & JACKSON, R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**:247-56, 1976.
- PERBAL, B. *A practical guide to molecular cloning*. New York, J. Wiley, 1984. 554p.
- RETZEL, E.F.; COLLET, M.S. & FARAS, A.J. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase *in vitro*; optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. *Biochemistry*, **19**:513-8, 1980.
- RIGBY, P.W.J.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. & BERG, P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Molec. Biol.*, **113**:237-51, 1977.
- ROBERTS, B.E. & PATERSON, B.M. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**:2330-4, 1973.
- ROSBASH, M.; BLANK, D.; FAHRNER, K.; HEREFORD, L.; RICCIARDI, R.; ROBERTS, B.; RUBY, S. & WOOLFORD, J. R-looping and structural gene identification of recombinant DNA. *Methods in Enzymology*, **68**:454-69, 1979.
- ROSS, J.; AVIV, H.; SCOLNICK, E. & LEDER, P. *In vitro* synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**:264-8, 1972.
- ROTHSTEIN, R.J.; LAU, L.F.; BAHL, C.P.; NARANG, S.A. & WU, R. Synthetic adaptors for cloning DNA. *Methods in Enzymology*, **68**:98-109, 1979.
- ROUGEON, F. & MACH, B. Stepwise biosynthesis *in vitro* of globin genes from globin mRNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**:3418-22, 1976.
- ROUGEON, F. & MACH, B. Cloning and amplification of rabbit α - and β -globin gene sequences into *Escherichia coli* plasmids. *J. Biol. Chem.*, **252**:2209-17, 1977.
- ROYCHOUDHURY, R.; JAY, E. & WU, R. Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res.*, **3**:101-16, 1976.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**:5463-7, 1977.
- SCHIMKE, R.T.; PALACIOS, R.; SULLIVAN, D.; KIELY, M.L.; GONZALEZ, C. & TAYLOR, J.M. Immunoabsorption of ovalbumin synthesizing polysomes and partial purification of ovalbumin messenger RNA. *Methods in Enzymology*, **30**:631-49, 1974.
- SHAPIRO, D.J.; TAYLOR, J.M.; McKNIGHT, G.S.; PALACIOS, R.; GONZALEZ, C.; KIELY, M.L. & SCHIMKE, R.T. Isolation of hen oviduct ovalbumin and rat liver polysomes by indirect immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.*, **249**:3665-71, 1974.
- SHENK, T.E.; RHODES, C.; RIGBY, P.W.J. & BERG, P. Biochemical method for mapping mutational alterations in DNA with S1 nuclease; the location of deletions and temperature-sensitive mutations in simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**:989-93, 1975.
- SIPPEL, A.E.; LAND, H.; LINDENMAIER, W.; NGUYEN-HUU, M.C.; WURTZ, T.; TIMMIS, K.N.; GIESECKE, K. & SCHUTZ, G. Cloning of chicken lysozyme structural gene sequences synthesized *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **5**:3275-92, 1978.
- SO, M.; GILL, R. & FALKOW, S. The generation of ColE1-Ap^r cloning vehicle which allows detection of inserted DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **142**:239-42, 1975.
- SPEIRS, J. & GRIERSON, D. Isolation and characterization of 14S-RNA from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **521**:619-33, 1978.
- SRIPATI, C.E. & WARNER, J.E. Isolation, characterization and translation of mRNA from yeast. *Meth. Cell Biol.*, **20**:61-81, 1978.
- TAYLOR, J.M. The isolation of eukaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**:681-717, 1979.
- TELFORD, J.; BOSELEY, P.; SHAFFNER, W. & BIRNSTIEL, M. Novel screening procedure for recombinant plasmids. *Science*, **195**:391-3, 1977.
- TEMIN, H.M. & MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**:1211-3, 1970.
- ULLRICH, A.; SHINE, J.; CHIRGWIN, J.; PICTET, R.; TISCHER, E.; RUTTER, W.J. & GOODMAN, H.M. Rat insulin genes; construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, **196**:1313-9, 1977.
- VERMA, I.M.; TEMPLE, G.F.; FAN, H. & BALTIMORE, D. *In vitro* synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10S RNA. *Nature New Biol.*, **235**:163-7, 1972.
- VODKIN, L.O. Isolation and characterization of messenger RNAs for seed lectin and Kunitz trypsin inhibitor in soybeans. *Plant Physiol.*, **68**:766-71, 1981.
- WICKENS, M.P.; BUELL, G.N. & SCHIMKE, R.T. Synthesis of double-stranded DNA complementary to lysozyme, ovomucoid, and ovalbumin mRNAs. *J. Biol. Chem.*, **253**:2483-95, 1978.
- WIEGERS, U. & HILZ, H. Rapid isolation of undergraded polysomal RNA without phenol. *FEBS Lett.*, **23**:77-82, 1972.
- WILLIAMS, J.G. & LLOYD, M.M. Changes in the abundance of polyadenylated RNA during slime mould development measured using cloned molecular hybridization probes. *J. Mol. Biol.*, **129**:19-35, 1979.

THE USE OF Ti-PLASMIDS IN PLANT GENETIC ENGINEERING

Eugen S. Gander¹

ABSTRACT - This review deals exclusively with the history, the characterization and the use of the most important of the known plant vectors, the Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* which induce tumors in dicotyledonous plants.

INTRODUCTION

One of the goals of genetic manipulation is the isolation of a specific DNA segment, its characterization and its subsequent introduction into a new genetic environment where the traits specified by the original DNA segment should be propagated in a Mendelian manner and should be expressed orderly in time and in space.

Consequently, plant recombinant DNA technology focusses on the following three main topics:

1. the isolation and characterization of desirable, defined genes, e.g. genes that confer resistance to biological or physiological stresses, or genes that are responsible for superior nutritional properties in plants of economic interest;
2. the search of vector systems that can carry the genes of interest and that guarantee the gene's integration and expression in a host genome; and
3. the regeneration, from transformed plant cells, of entire plants which transmit the newly acquired traits in a Mendelian manner.

HISTORY

The interest in plasmids of *Agrobacterium* did not arise because of their potential as vectors for gene transfer, but originated in the research of Jensen (1910), and Smith et al. (1911) who studied animal tumors and plant pathology respectively. Jensen, in particular, was deeply interested in cancer. By 1910 cancers were known from all types of vertebrates; he proposed a survey for similar phenomena in plants, arguing that since plants seemed to be less complex than animals, faster and more fundamental insight into the problems of neoplastic growth could be gained by investigating plant tumors (Jensen 1910).

Since 1913 "spontaneously" occurring tumors in red beets had been known; by transplanting these tumors to sugar beets (which gave him a color marker), Jensen showed that the resulting tumors were entirely derived from the transplanted cells and should be propagated serially in the same manner as the animal carcinomas. In 1918 he demonstrated that the tumors, which he initially believed to be "spontaneous", were without any doubt caused by

Bacterium tumefaciens, nowadays *Agrobacterium tumefaciens*, the gram-negative crown gall bacterium. In addition, he found that the bacteria themselves could never be isolated from the tumor cells, and concluded that the plant cells became altered through some bacterial agent which caused them to proliferate in a non-orderly manner.

With the development of tissue culture techniques it became possible to demonstrate that crown gall tumor cells grow continuously in simple culture media and that do not allow the growth of normal plant cells. Since, obviously, the plant cells had been transformed by something which had to do with *Agrobacterium*, and since in no case were bacteria found in sterile secondary tumors, it was concluded that the bacteria transmitted some factor to the cells which was responsible for the neoplastic transformation. At the time, this hypothetical factor was called "tumor-inducing-principle" or TIP (Braun 1947).

The key observation which ultimately led to the identification of the TIP was only made by Hamilton & Fall (1971), who found that certain crown gall bacteria lose their ability for tumor-induction when grown at 36°C. At about the same time, further insight into the crown gall problem was gained by groups that asked the somewhat pragmatic question of whether the tumor-inducing bacteria drew any benefit from the tumors they induced, and consequently studied the biological and physiological characteristics of the crown gall bacteria. In the pursuit of this research, it soon became evident that crown gall cells exhibit biochemical changes, mainly with respect to the arginine metabolism when compared with untransformed cells. Furthermore, it became clear that these changes were not related with the host plant, but were dependent on the particular bacterial strain used to induce the tumors. These observations confirmed and extended by Smith et al. (1911) showed that different crown gall bacteria strains had different host ranges and caused morphologically different tumors in the same host plant. More refined biochemical and genetic analyses of the physiology and biology of crown gall cells and of the bacteria that caused them revealed the finer points of the interaction between the two systems, which can be summarized as follows:

1. the tumor cells show biochemical characteristics that are determined by the *Agrobacterium* strain that caused them and not by the original host cells;
2. the tumor cells synthesize unusual amino acids, called "opines", that can be used by *Agrobacterium* as sole energy, nitrogen and carbon sources.

¹ Eng^o-agr^o, Dr., EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 10.2372, 70770 Brasília, DF.

The fact that these biochemical changes in the tumor cells are perpetuated in subsequent cell generations suggested that the TIP is most probably a nucleic acid, most likely a DNA. Since basically three types of DNAs can be found in any bacteria, i.e., chromosomal DNA, prophage DNA and plasmid DNA, various groups sought to elucidate the role of these DNA types in tumor formation. The clear-cut demonstration that plasmid DNA was responsible for tumor formation came when Zaenen et al. (1974) showed that virulent *Agrobacterium* strains all contained a special type of large plasmids that is not found in non-tumorigenic strains. On the basis of Hamilton & Fall (1971) report that two *Agrobacterium* strains lost their tumorigenic properties when incubated at high temperatures and the demonstration that the incubation at high temperature resulted in the loss of the large plasmids, it was concluded that these structures were absolutely necessary for tumor formation and, therefore, these plasmids were called "Ti-plasmids" for tumor-inducing plasmids.

The subsequent observations that the genes responsible for opine synthesis in the transformed cells as well as the genes enable opine catabolism in *Agrobacterium* are encoded by Ti-plasmid DNA (Bomhoff et al. 1977), that Ti-plasmid DNA is transferred from the bacterium to the plant genome, where at least parts of it are transcribed (Chilton et al. 1977, Drummond et al. 1977), were incorporated by Schell (1979) into a concept that he called the "Genetic Colonization" concept. Fig. 1 shows the specific genetic information to plant cells, i.e., the information for uncontrolled growth and the synthesis of opines. The beneficiary of these actions is *Agrobacterium*, because, due to the presence of its Ti-plasmid DNA coding for enzymes that enable opine catabolism, it can use the opines as energy, carbon and nitrogen sources. This concept definitely shifted the focus of the *Agrobacterium*-Ti-plasmid-tumor system as a model for studying neoplastic growth towards the notion that the Ti-plasmids are in fact naturally occurring vectors that promote gene transfer from one organism to another. Or, as Tepfer (1983) put it: "Nature go there first..."

CLASSIFICATION, ORGANIZATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF TI-PLASMIDS

Classification

The various Ti-plasmids can be classified according to the opines they specify in the transformed host cell. At present, mainly three types of plasmids are known:

1. the **octopine** plasmids carrying the information for the synthesis and catabolism of octopines and octopine-related compounds (all arginine and lysine derivatives);

2. the **nopaline** plasmids whose DNA encodes the information for nopaline, nopalinic acid (arginine and ornithine derivatives) and agrocinopine (a phosphorylated sugar compound) synthesis and catabolism; and

3. the **agropine** plasmids which carry the information for agropine (a condensation product of amino acids with aldohexoses) synthesis and catabolism.

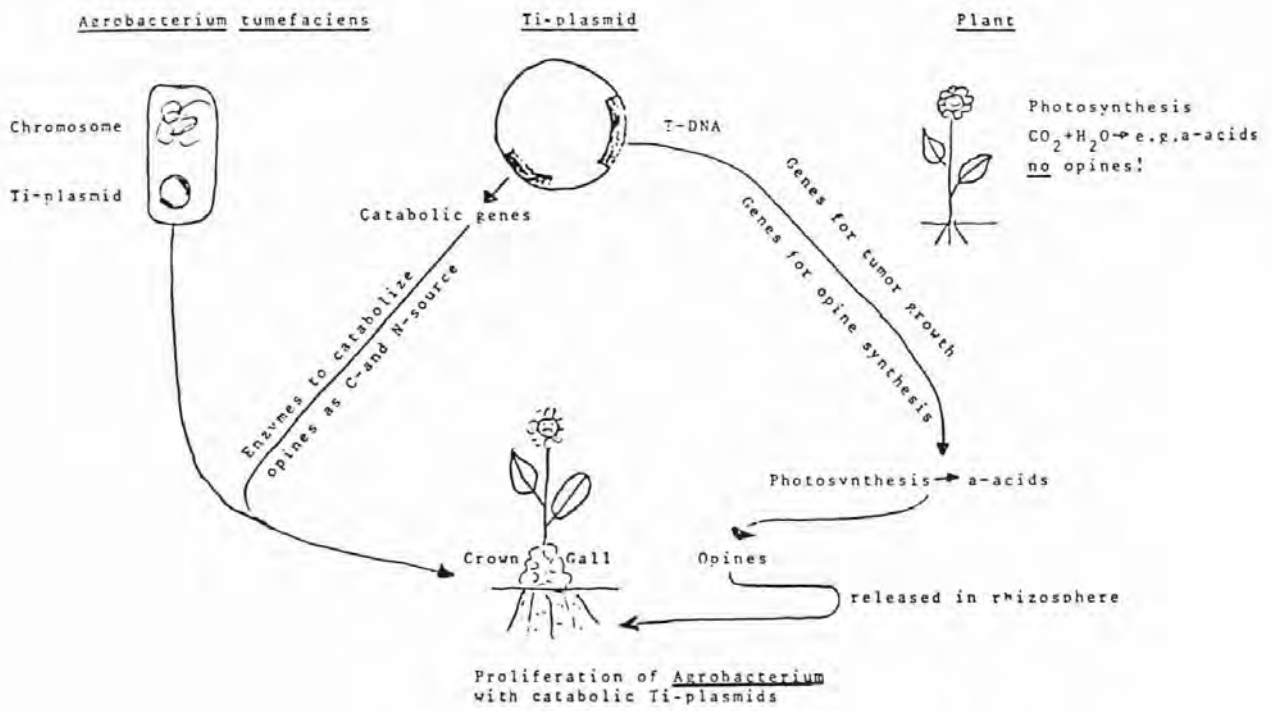
Organization and functional properties of Ti-plasmids

The finding that during host cell transformation some of the plasmid's genetic information is transferred to the host cells and integrated into the host genome provoked extensive studies on the organization of the plasmid DNA. In Fig. 2 the basic findings with respect to the organization of typical opaline and plasmids are shown (Depicker 1983): Ti-plasmids are large, circular molecules with molecular weights spanning from 90 to 120 million daltons, corresponding to about 200 kilobases. In both plasmid types two regions are of particular importance for the production of tumor cells. The first region was termed "T-DNA" for transferred DNA, because it was shown that this part of the plasmid DNA is integrated into the plant genome. The T-region contains the oncogenes that determine the tumor phenotypes and the genes coding for opine synthases. The oncogenes are homologous in opaline and nopaline plasmids, and form a common T-DNA "core" (homology region A) of about 8-9 kb. Detailed studies of the T-DNA border sequences revealed that a 25 bp sequence at the right of T-DNA border is essential for the DNA transfer and integration from the bacterium to the host cells (Wang et al. 1984). Thirteen T-DNA transcripts have been identified so far, and it is note-worthy that they all show characteristics of eukaryotic mRNAs in that they are polyadenylated and that their transcription can be inhibited by low doses of alpha-amanitin. Six of the transcripts, called 5, 2, 1, 4, 6a and 6b, are identical in opaline and nopaline tumors. Transcripts 4, 2 and 1 are for special interest because the inactivation of 4 leads to root induction, while inactivation of 1 and 2 results in shoot induction; the effect of gene 4 can be compared to the effects when normal plants are grown at high concentrations of cytokinins and that of genes 1 and 2 to effects of the presence of high doses of auxins (Depicker et al. 1983). On the basis of these facts, one could postulate that undifferentiated crown gall tumor growth could be caused by unusual high levels of auxin-like and cytokinin-like substances synthesized under the direction of T-DNA genes.

The second region important for tumor formation is the virulence region (*vir*) on the left of the T-DNA. Since "vir" sequences cannot be found in tumor cells, and since many non-tumorigenic Ti mutants map in this region, it is thought that "vir" plays a role in the early events of tumor formation and in the *Agrobacterium* - plant cell

Fig. 1

GENETIC COLONIZATION



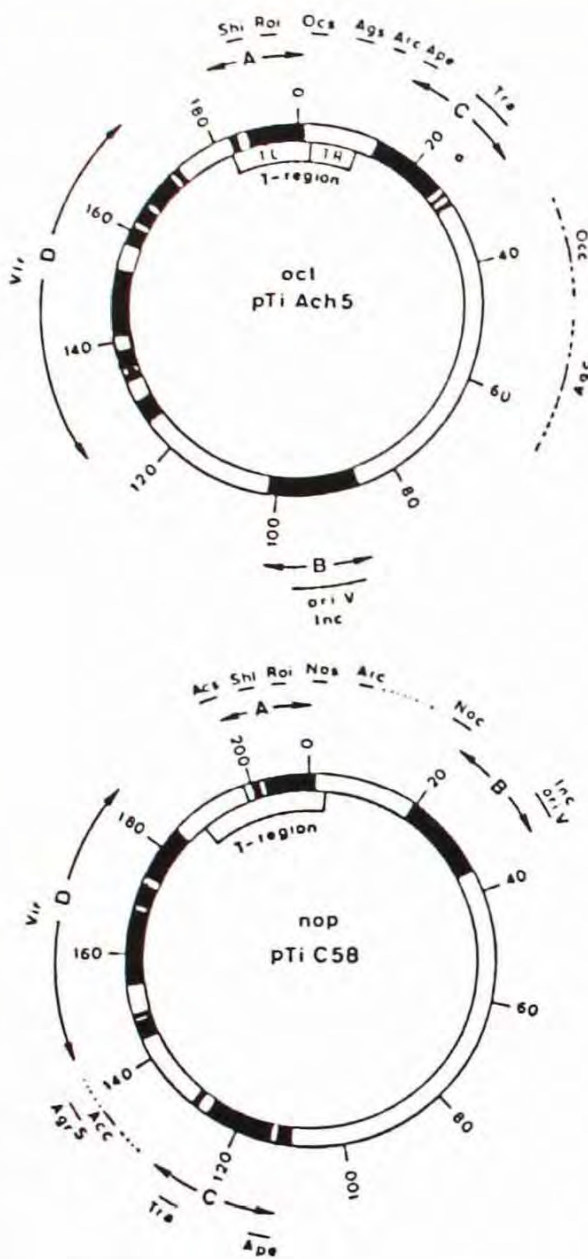


FIG. 2. Functional maps of typical octopine and nopaline plasmids.

interactions, but is not required once the tumors are established. The "vir" regions of opaline and nopaline plasmids also show a high degree of homology (homology region D). In addition to the T-DNA and the "vir" region, two more homologous DNA segments can be distinguished: the C-region, which encodes conjugative functions, and the B-region, which is involved with the replicative process of the Ti-plasmids.

T-DNA as a vector for foreign DNA transfer

Since it is obvious that the Ti-plasmids are natural vectors for gene transfer, the question was whether their natural properties could be used for the introduction of any foreign gene into a plant genome, and whether the introduced genes would be expressed in an orderly manner. On the basis of what was stated above, the requirements for using Ti-plasmids as cloning vehicles for foreign genes are the following:

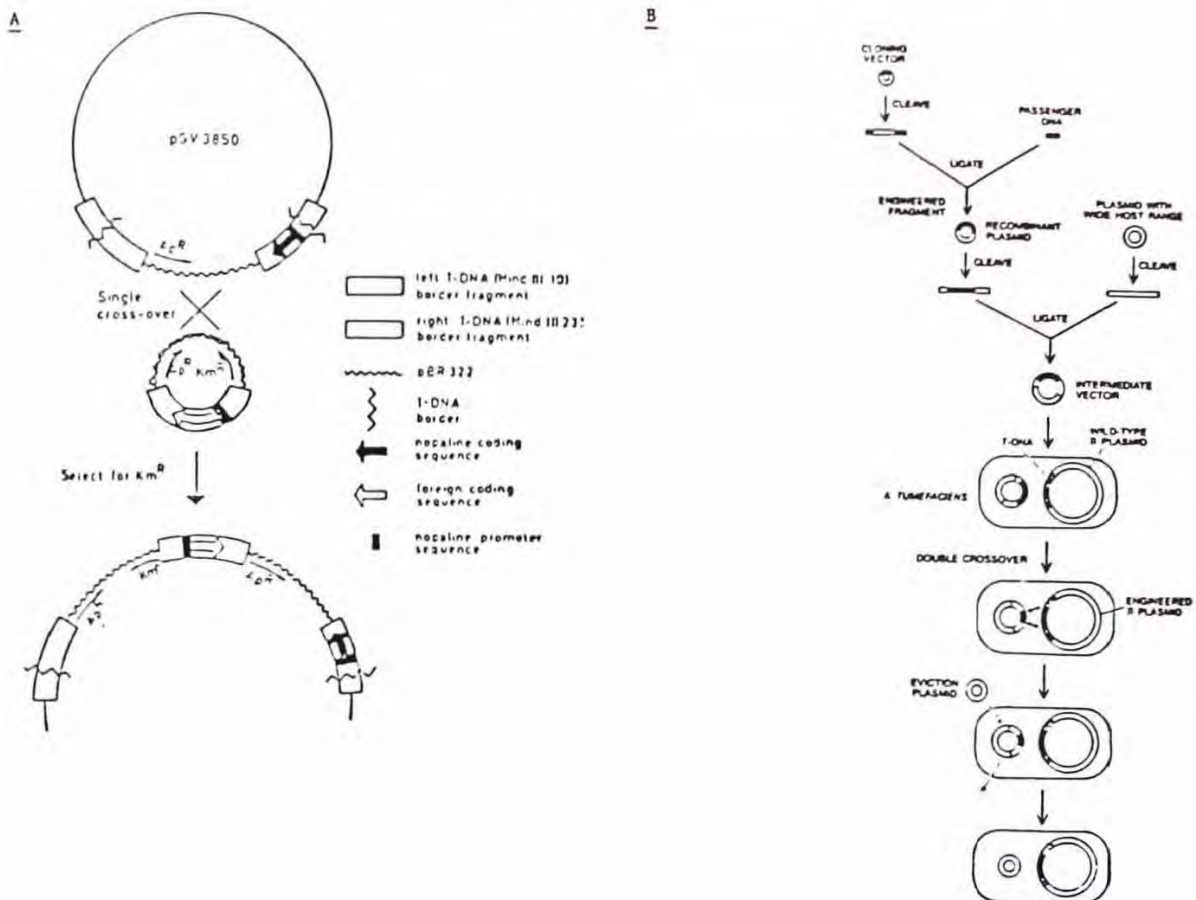
1. the T-DNA's ability to integrate into a host genome should be preserved, while, on the other hand;
2. the DNA transfer should not interfere with the host cell's normal development: i.e., the oncogenes on the T-DNA responsible for the tumor phenotypes should be either silent or absent. Furthermore, together with the foreign gene (s), a selectable marker should be transferred, which allows for easy and rapid detection of transformed cells.

Since T-DNA is large and contains few unique restriction sites which are suitable for inserting foreign genes, the use of a "shuttle" or "intermediate" vector is mandatory. One of the strategies for intermediate vector construction and for its shuttle into Ti-plasmids is shown in Fig. 3a (Chilton et al. 1981). In the central portion the "shuttle" is shown, and consists of the narrow host range plasmid pBR 322 into which a foreign gene under the control of a opine promoter and an additional resistance marker (Km^R) have been introduced. The upper portion shows the "acceptor" Ti-plasmids pGV3850, in which the oncogenes in the T-DNA have been replaced by a pBR322 sequence and in which only the border sequences of the T-DNA (which are responsible for transfer and integration) and the "vir" region have been maintained. A single cross-over event between the shuttle and the acceptor (lower part in Fig. 3a) causes the integration of the foreign gene into the acceptor plasmid. Since pBR322 cannot replicate in *Agrobacterium*, the additional Km^R -site allows for the selection of the recombinants.

A slightly more sophisticated alternative to this strategy is shown in Fig. 3b. Here, a pBR322 derivative carrying a T-DNA fragment, i.e., the Bam 14a fragment which contains a unique Hpa I site, is cleaved with this enzyme and a foreign gene plus an additional antibiotic resistance marker (Km^R) are introduced in between. The construction is then linearized and ligated into a wide host range plasmid; e.g., pRK290. This chimaeric plasmid, containing the foreign gene and the genetic marker flanked by T-DNA regions, is subsequently introduced into *Agrobacterium* carrying a wild-type Ti-plasmid. A rare double cross-over event, between the homologous T-DNA stretches, will introduce the foreign gene and the antibiotic marker into the wild-type Ti-plasmid. After eviction of the vector with an incompatible plasmid, recombinants are selected against kanamycin.

Fig. 3

SHUTTLE STRATEGIES



PROSPECTIVES

During the last four years, Ti-plasmid vectors were used for the introduction of numerous bacterial and plant genes into taxonomically different host plants. The genes coding for various antibiotic resistances, such as for neomycin phosphotransferase, dihydrofolate reductase, and chloramphenicol acetyl transferase (Herrera-Esrella et al. 1983a, b), have been introduced and expressed in host plants. However, probably the most exciting prospect for Ti-plasmid vectors is their use in studies concerning the regulatory signals in gene expression. Using these vector systems, recently a 3.8 kb fragment, containing the entire coding region plus about 1000 bp's – each of the 5' and 3' flanking sequence of the beta-phaseolin gene, was introduced

into tobacco cells (Sengupta-Gopalan et al. 1985). Subsequently, it was shown that the phaseolina gene was correctly expressed in space and in time in the regenerated tobacco plants: i.e., the gene was only expressed in the cotyledons of the tobacco embryos as is the case in the proper bean. The implication is, of course, that tissue specificity is encoded in a phaseolin signal region: e.g., the promoter, which, in turn, implies tissue-specific inducing signals. This result emphasizes the value of the Ti-plasmid as vector systems and gives rise to the hope that this system will serve equally well for the introduction of commercially interesting traits into recipient plants such as the regulatory and coding sequences for a methionine-rich storage protein from Brazil-nut into *Phaseolus* sp.

Though the Ti-plasmid system works at its best in

dicotyledonous hosts – insofar as the reports on its use in monocotyledonous are scarce –, studies focussing, for instance, on the mechanisms that specify *Agrobacterium* host range could open the way for its use in monocotyledonous plants.

REFERÊNCIAS

- BOMHOFF, G.; KLAPWIJK, P.M.; KESTER, H.C.M.; SCHILPE-ROORT, R.A.; HERNALSTEENS, J.P. & SCHELL, J. Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, 145:177-81, 1977.
- BRAUN, A.C. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *Am. J. Bot.*, 34:234-40, 1947.
- CHILTON, M.D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIACKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P. & NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells; the molecular basis of crown-gall tumorigenesis. *Cell*, 11:263-71, 1977.
- CHILTON, M.D.; BEVAN, M.V.; YADAV, N.; MATZKE, A.J.M.; BYRNE, M.; GRULA, M.; BARTON, K.; VANDERLEYDEN, J.; De FRAMOND, A. & BARNES, W.M. Tailoring the *Agrobacterium* Ti-plasmid as a vector for plant genetic engineering. *Stadler Symp.*, 13:39-52, 1981.
- DEPICKER, A.; van MONTAGU, M. & SCHELL, J. Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., ed. *Genetic Engineering of plants*. New York and London, Plenum Press, 1983. p.143-76.
- DRUMMOND, M.H.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. & CHILTON, M.D. Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown-gall tumors. *Nature*, 269:535-6, 1977.
- HAMILTON, R.H. & FALL, M.Z. The loss of tumor initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia*, 27:229-30, 1971.
- HERRERA-ESRELLA, L.; DEPICKER, A.; van MONTAGU, M. & SCHELL, J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303:209-13, 1983a.
- HERRERA-ESRELLA, L.; De BLOCK, M.; HERNALSTEENS, J. P.; van MONTAGU, M. & SCHELL, J. Chimaeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.*, 2:987-95, 1983b.
- JENSEN, C.O. Von echten Geschwuelsten in Pflanzen. Rapp. Conf. Int. Etude Cancer, 2, 1910. p.243-54.
- SCHELL, J. Crown-gall; transfer of bacterial DNA to plants via the Ti-plasmid. In: HALL, T.C. & DAVIES, J.W., ed. *Nucleic acids in plants*. Boca Raton, CRC Press, 1979. p.195-210.
- SENGUPTA-GOPALAN, C.; REICHERT, N.A.; BARKER, R.F.; HALL, T.C. & KEMP, J.D. Developmentally regulated expression of the bean beta-phaseolin gene in tobacco seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3320-4, 1985.
- SMITH, E.F.; BROWN, N.A. & TOWNSEND, C.O. Crown-gall of plants; its cause and remedy. *U.S. Agric. Bur. Plant Ind. Bull.*, 213:1-201, 1911.
- TEPFER, D. In: LURQUIN, P.F. & KLEINHOF, A., ed. *Genetic engineering in eukaryotes*. New York and London, Plenum Press, 1983.
- WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; van MONTAGU, M. & ZAMBRYSKY, P. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, 38:455-62, 1984.
- ZAENEN, I.; van LAREBEKE, N.; FEUCHY, H.; van MONTAGU, M. & SCHELL, J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 86:109-27, 1974.

Note: Fig. 1 was redrawn from Schell (1979); Figs. 2 and 3 were taken from Depicker et al. (1983).

TISSUE CULTURE AND GENETIC ENGINEERING: COMPLEMENTARY TOOLS FOR POTATO IMPROVEMENT

John H. Dodds¹
Jesse M. Jaymes²

ABSTRACT - This article has highlighted an innovative approach of tissue culture and genetic engineering for potato improvement. It stresses the construction of synthetic genes, in cases of difficulties of locating and purifying genes with desirable characteristics.

INTRODUCTION

Conventional plant breeding techniques offer powerful tools for the incorporation of genetic traits and their subsequent selection. However, conventional crossing methods cannot be used to incorporate a single gene trait without modifying other gene characters. A combination of conventional plant breeding and genetic engineering should enable production of new varieties that cannot be achieved by either technique alone.

The insertion of genes into plants is normally pursued through the use of an infective plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes*. This infective plasmid (a small ring of DNA) has been commonly named "Nature's genetic engineer". Successful use of the plasmid depends upon susceptibility of the species to infection by *Agrobacterium*. Also, the plants species must respond to the appropriate tissue culture techniques. These two pre-requisites currently limit widespread application of this new technology to many important crops.

The potato, one of the world's most important staple food crop, is susceptible to *Agrobacterium* and is easily cultured *in vitro*. Thus the potato is a model for genetic engineering studies.

Which genes should be inserted? At the present time, knowledge of methods for identification, isolation, and purification of genes is inadequate. Consequently, we have adopted an alternative approach, involving production of synthetic genes.

USE OF SYNTHETIC PROTEIN GENES

The potato is a major source of dietary protein but, like most plant proteins, potato protein is deficient in certain essential amino acids. We will describe the methods used to synthesize and insert a synthetic gene into potato, which produces a protein rich in the limiting amino acids methionine, lysine, tryptophan, isoleucine and threonine.

CONSTRUCTION OF SYNTHETIC DNA SEQUENCE

We have constructed (using a DNA synthesis machine), cloned, and obtained in bacteria the expression of synthetic genes for potato protein improvement. The sequences for several of these synthetic gene fragments were designed, and the potential protein sequences were obtained by inspection of the genetic code (Fig. 1a and 1b). The designation of proteins A and B represents sequences of the proteins derived from both possible reading directions of gene fragment sp 47. That is, gene fragment sp 47 was constructed symmetrically so that a protein containing a high content of essential amino acids would be produced no matter which strand of the synthetic DNA was ultimately read by the plant. Proteins encoded within the potato by these synthetic gene fragments would markedly improve the diet of many people in Lesser Developed Countries and elsewhere.

These methods of gene synthesis are flexible enough to produce proteins possessing any particular amino acid composition; therefore, genes could be specifically designed to supplement any desired animal feed or human food. It should be pointed out that the insertion of lysine at frequent intervals in these synthetic proteins not only ensures supply of a limiting amino acid but also provides numerous sites for proteolytic attack by trypsin (one of the main protein-degrading enzymes found in the digestive tract). This feature is important, as it increases the bioavailability of the supplemental protein. Bioavailability refers to the amount of amino acids actually taken up from a particular dietary protein and used by the animal to make its own protein.

HOW TO GET THE GENE FRAGMENT INTO PLANTS

One strategy for introducing foreign DNA into a plant, by means of *A. tumefaciens* plasmids, is to use a small recombinant plasmid into which a known fragment of T-DNA has been inserted. Using this method, we opened the recombinant plasmid by means of a restriction enzyme, which recognizes a specific short sequence of DNA, and causes a double strand break at a site within the T-DNA. At this breakage point, the synthetic essential amino acid encoding(EAAE) DNA was inserted. Along with the EAAE-

¹ International Potato Center, Apartado Postal 5969, Lima, Peru.

² Department of Biochemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.

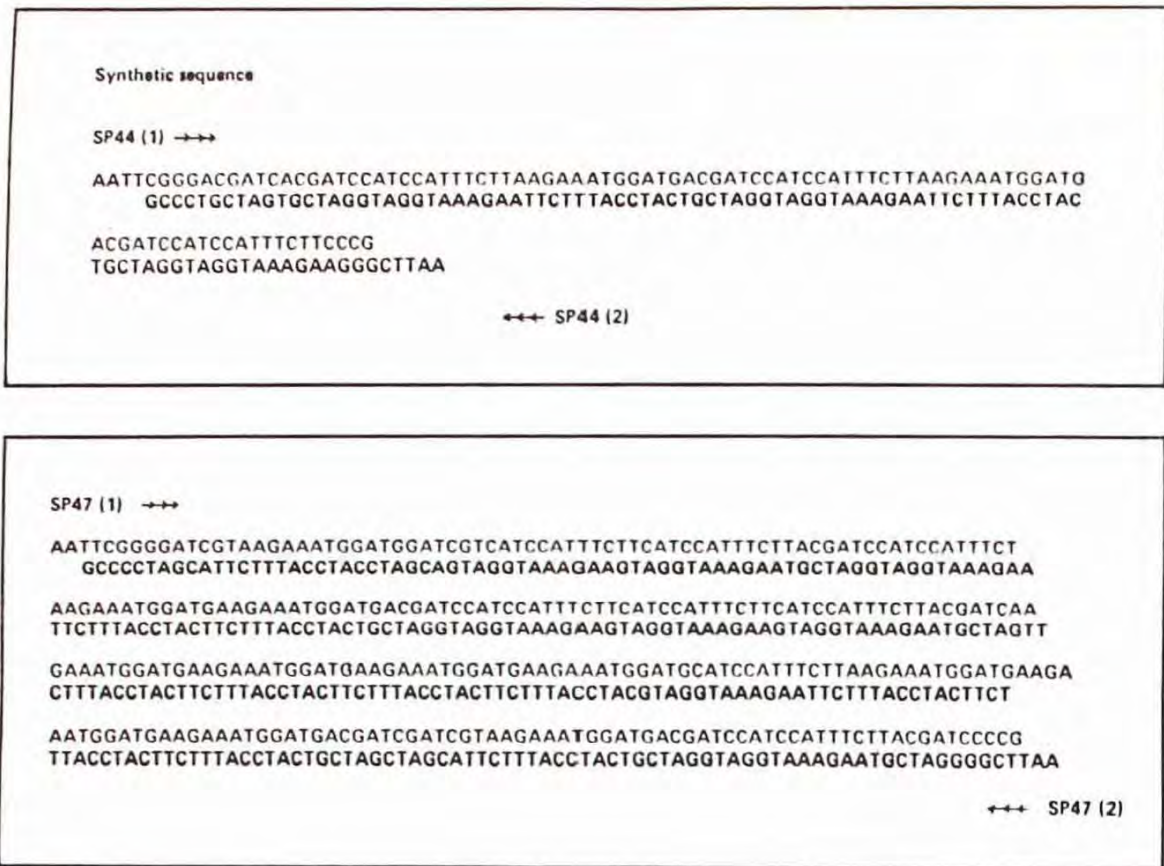


FIG. 1a. Sequence of synthetic gene fragments from potato protein improvement.

-DNA, a selectable marker, i.e., the bacterial gene encoding for resistance to a specific antibiotic, was included. This new plasmid was then introduced into a *A. tumefaciens* strain carrying the unmodified *Agrobacterium* plasmid. Since these two different plasmids contain homologous (similar) sequences, a rare double-recombination between the two plasmids occurred and resulted in a new plasmid in which the T-DNA harbors the insert of EAAE-DNA. The *agrobacteria* containing the new plasmid were identified and selected by their survival on media containing the selecting antibiotic. These selected bacteria were then used to transfer the modified T-DNA (containing the EAAE-DNA) into the plant genome.

It is clear that the technology exists to insert, on a routine basis, foreign DNA into the potato plant. But to ensure the expression of a particular desirable gene or a DNA fragment in the plant, one must insert it next to the proper control regions of another already existing gene, which has had its protein encoding part removed. These control regions or promoters, as they are commonly called,

are usually found at the beginning of the gene and are vital switches attuned to the many influences that regulate and temper the expression of the gene to its final protein product. It is highly desirable to use promoters that allow abundant expression of the EAAE-protein and also control its tissue-specific expression within the potato tuber.

Until recently we have always used the nopaline synthase promoter; this promoter will produce reasonable quantities of the gene product throughout the whole plant. We are now using the CaMV 32S promoter which produces large amounts of gene product throughout the whole plant, and the potato promoter which permits expression only in the potato tuber.

TISSUE CULTURE OF TRANSFORMED PLANTS

The potato is a model plant for tissue culture, and its plasticity of development allows intact plants to be regenerated from almost any plant part. It is possible, therefore, to infect potato plants with *A. tumefaciens*

SP44 (1)

GlyThrIleThrIleHisProPheLeuLysLysTrpMetThrIleHisProPheLeuLysLysTrpMet
ThrIleHisProPheLeuPro

SP44 (2)

GlyLysLysTrpMetAspArgHisProPheLeuLysLysTrpMetAspArgHisProPheLueLysLys
TrpMetAspArgAspArgPro

SP47 (1)

GlyAspArgLysLysTrpMetAspArgHisProPheLeuHisProPheLeuThrIleHisProPhe
LeuLysLysTrpMetLysLysTrpMetThrIleHisProPheLeuHisProPheLeuHisProPheLeuThr
IleLysLysTrpMetLysLysTrpMetLysLysTrpMetLysLysTrpMetHisProPheLeuLysLysTrp
MetLysLysTrpMetLysLysTrpMetThrIleAspArgLysLysTrpMetThrIleHisProPheLeuThr
IlePro

SP47 (2)

GlyAspArgLysLysTrpMetAspArgHisProPheLeuThrIleAspArgHisProPheLeuHis
ProPheLeuHisProPheLeuLysLysTrpMetHisProPheLeuHisProPheLeuHisProPheLeuHis
ProPheLeuAspArgLysLysTrpMetLysLysTrpMetLysLysTrpMetAspArgHisProPheLeuHis
ProPheLeuLysLysTrpMetAspArgLysLysTrpMetLysLysTrpMetThrIleHisProPheLeuThr
IlePro

FIG. 1b. Potential protein sequence obtained by inspection of genetic code of gene fragments SP44 and SP47.

(containing the EAAE-DNA) and induce the formation of transformed plants. In the potato plant, which is normally asexually propagated, there are no problems of segregation and loss of the inserted information through the processes of meiotic recombination, although, it would be interesting to see how this newly inserted information (EAAE-DNA) segregates and if it is transmitted sexually to the progeny.

Transformed potato plants are easily micropropagated using standard *in vitro* methods. The two methods used at the International Potato Center are:

a) Single node cuttings

In vitro plantlets are carefully removed from the test tubes and cut into single nodes. The small leaves are removed without damaging the axillary buds. The single nodes are then inoculated onto fresh propagation medium, after which the axillary buds begin to grow. In about 6-8 weeks the *in vitro* plantlet is ready again to be subcultured. The growth of nodes after 2, 4 and 6 weeks is shown in Fig. 2.



FIG. 2. Growth of single node cutting; tubes from left to right show a sequence of growth.

b) Shaken shoot cultures

In vitro plants are removed from test tubes and the roots and shoot apex are removed. The leaves are then removed, thus leaving a stem segment with many axillary buds. The stem segments are cultured in Erlenmeyer flasks in a liquid medium containing gibberellic acid. The axillary buds rapidly grow out and branch. In 2 to 3 weeks the flask is full of young plantlets ready for subculture (Fig. 3).



FIG. 3. Shaken culture for rapid propagation. The flask shown is now ready to be subcultured.

SOME POSSIBLE FUTURE APPLICATIONS

Through our collaborative research, we have demonstrated that it is now possible to incorporate desirable genes into the potato via the methods of recombinant DNA technology. The major limitation to the large-scale application of these genetic engineering techniques, for the

improvement of the potato and other crop plants, is the general lack of knowledge about plant genes and how to identify, isolate, and purify them. This article has highlighted an innovative approach that is: if you cannot locate and purify desirable genes, then they can be constructed synthetically.

We are in the process of producing synthetic DNA sequences that may interfere with potato virus or viroid replication. When these sequences are incorporated into the potato, the plant may become permanently "immunized" against infection.

We are also including the freezing characteristics of cells. This "antifreeze" protein may confer resistance to frost to the genotype.

The preliminary results obtained from these experiments are contributing to the basic knowledge of plant biochemistry and gene structure and may, in the future, lead to the development of improved potato varieties. It takes about ten growing seasons to make new potato variety by traditional breeding methods. Perhaps genetic engineering technology will enhance our capabilities to introduce new characteristics into potato plants.

UTILIZAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA O MELHORAMENTO DA QUALIDADE NUTRITIVA DO FEIJÃO

Luiz Antonio Barreto de Castro¹

ABSTRACT - This paper discusses some applications of molecular biology and recombinant-DNA techniques on the improvement of nutritional characteristics of beans. It emphasizes the use of Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* as a vector for the transference of genes from Brazil nut to dry beans.

Quando se analisam as necessidades mundiais de calorias e proteínas para alimentação humana, é fundamental que se considerem as tendências internacionais, que têm profundas raízes econômicas, sociais e políticas. O trabalho de Altschul (1976) permite uma avaliação dessas tendências. Por exemplo: sempre que as disponibilidades de recursos por habitante, em uma determinada população, decrescem, não só decresce o consumo calórico **per capita**, mas também a dieta altera-se no sentido de incluir maior quantidade de calorias na forma de carboidratos (amido), em detrimento de uma dieta equilibrada em carboidratos e proteínas.

Uma dieta composta de quantidades equivalentes de cereais e leguminosas é menos deficiente em aminoácidos essenciais, como lisina e metionina (Bressani & Elias 1984). As populações menos favorecidas, no entanto, raramente conseguem balancear tal dieta, que via de regra é deficiente em proteínas de leguminosas e, por conseguinte, em metionina. A Índia, por exemplo, que no início dos anos 60 mantinha a contribuição de proteínas de leguminosas, em sua dieta, em torno de 24%, viu cair esse índice no final da década para 14%, embora conseguisse manter o consumo calórico **per capita** praticamente inalterado (Schertz 1973).

Uma outra tendência é observada em populações de países em que as disponibilidades de recursos **per capita** têm aumentado. A dieta altera-se no sentido de incluir maior variedade de produtos, de melhor qualidade nutricional em sua composição calórica, por razões diversas, inclusive de ordem estética. Para atender a tais exigências, acima de 70% da disponibilidade proteica de origem vegetal são convertidos em proteína animal. Os países chamados desenvolvidos passam, portanto, a competir com os menos desenvolvidos por alimento e proteína de origem vegetal, os quais poderiam ser utilizados diretamente na alimentação humana, mas que são, entretanto, desviados para a alimentação animal. Como as populações dos países desenvolvidos atingiram níveis de consumo de calorias e proteínas **per capita** muito além dos padrões mínimos estabelecidos, torna-se pouco provável que tais hábitos alimentares sejam modificados para atendimento das necessidades das populações menos favorecidas.

A pergunta que se impõe, portanto, é: O que é possível de se realizar, por parte dos países menos desenvolvidos, em termos de tecnologia para alterar tal estado de coisas? Profissionais de formações as mais diversas apresentam soluções, tais como: utilização de fontes de energia não-convencionais; substituição ou enriquecimento de proteínas de origem animal por proteína de origem vegetal, de valor nutricional equivalente; e melhoramento genético vegetal visando a otimizar nas plantas a eficiência de captação, conversão e armazenamento de energia, na forma de compostos orgânicos de alto valor calórico e nutricional, entre eles, as proteínas. Obviamente, todos os caminhos são igualmente relevantes para a solução do problema proposto. O que é fundamental, no entanto, é que os países em desenvolvimento participem, ainda que como acionistas minoritários, no desenvolvimento da pesquisa tecnológica, para que não tenham de importar os resultados de tal pesquisa por preços cada vez mais proibitivos.

As proteínas das sementes de leguminosas, de um modo geral, e do feijão, em particular, são pobres nos aminoácidos citados. A metionina é um dos 10 aminoácidos essenciais, assim chamados porque não podem ser sintetizados pelo organismo animal, devendo desta forma serem obtidos de proteínas que os liberam após a proteólise.

Como o feijão e outras leguminosas apresentam baixo teor de metionina, uma dieta com base nesta fonte proteica é carente de metionina, e portanto insatisfatória do ponto de vista nutricional.

As proteínas de origem animal, como a carne, o leite e o ovo, satisfazem o aspecto citado, mas são sabidamente de alto custo.

Há décadas melhoristas genéticos de todo o mundo, particularmente de países em desenvolvimento, vêm buscando pelos métodos clássicos elevar o teor de metionina na proteína de sementes leguminosas, sem sucesso.

Entretanto, é do conhecimento do mundo científico, na área da biologia, há cerca de 40 anos, que as sementes de castanha-do-brasil apresentam proteínas cujo teor de metionina é comparável ao da caseína (Horn et al. 1946).

Diante da impossibilidade óbvia de um cruzamento entre leguminosas e a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* L.), o melhoramento proteico de sementes de feijão agora é possível, em face das modernas técnicas de engenharia

¹ Eng^o-agr^o, Ph.D., Fisiologia Vegetal, EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 10.2372, 70770 Brasília, DF.

genética, que incluem manipulação, transferência e expressão de genes entre espécies geneticamente incompatíveis (Caplan et al. 1983).

Os progressos na área de transferência de genes de plantas são recentes (Horsch et al. 1984). Várias dificuldades tecnológicas tiveram que ser superadas, e, assim, considerável esforço na área de pesquisa de processos fundamentais da biologia vegetal ainda se faz necessário. Podemos citar algumas das dificuldades tecnológicas principais, que foram integral ou parcialmente superadas:

1. Vetores apropriados, preferencialmente não-patogênicos, capazes de garantir a expressão de genes de plantas e sua regulação em células vegetais;

2. Marcadores, que permitem a fácil identificação de células transformadas em cultura;

3. Regeneração de plantas de importância econômica, a partir de protoplastos, que deve ser a estrutura de escolha para transformação.

Além disto, é fundamental que se pesquisem os fatores que regulam a expressão de genes de plantas, bem como a organização de genomas de vegetais, como garantia de integração satisfatória dos genes nos transformantes.

A maioria dos genes das principais proteínas de reserva de sementes já foi isolada, purificada e clonada em bactérias (Muntz 1982). O cDNA de fita dupla, preparado por transcrição de mRNA(s) purificados, foi posteriormente inserido em plasmídios linearizados (principalmente pBR 322), e utilizado para transformar estirpes, sem plasmídios, de *Escherichia coli*. A seleção de transformantes foi baseada em genes de resistência a ampicilina e tetraciclina, contidos no plasmídio. O cDNA é inserido no sítio da ampicilina com a enzima de restrição Pst I. Os transformantes são selecionados pela resistência à tetraciclina e sensibilidade à ampicilina. Por este caminho foram clonados em *Escherichia coli* os genes que codificam para zeína, globulina G1 de feijão (*Phaseolus vulgaris*), poli (A) mRNA total, extraído de sementes de ervilha (Muntz 1982), as principais proteínas de reservas de sementes de soja (Timberlake & Goldberg 1982), entre outras proteínas de sementes. Sem dúvida, tais proteínas incluem-se entre as mais bem estudadas proteínas vegetais a nível molecular, embora o controle de sua expressão permaneça ainda sem resposta. As proteínas de reserva são específicas de tecidos embrionários; questiona-se, portanto, se sua expressão será possível em células não diferenciadas em cultura, antes que se conheçam os fatores determinantes de sua expressão.

Vários são os vetores potencialmente utilizáveis para expressão de genes de plantas, em células vegetais. Revisões recentes sob o tema estão disponíveis: Howell (1982), Ream & Gordon (1982), Montagu & Schell (1982). Os maiores progressos têm ocorrido na bactéria que provoca galhas em um grande número de plantas, *Agrobacterium tumefaciens*, que, entretanto, só recentemente teve eliminados seus efeitos patogênicos, e só infecta dico-

tilodôneas. Se o primeiro inconveniente, como já citamos, foi contornado (Otten et al. 1981), o segundo permanece como uma limitação para a sua utilização.

O presente projeto visa a introduzir, no patrimônio genético do feijão, genes que codificam para proteínas com alto teor de aminoácidos sulfurados, em particular a metionina, provenientes de sementes de castanha-do-brasil, utilizando-se exatamente de vetores de transferência e expressão, do tipo Ti-plasmídeo, existente em *Agrobacterium tumefaciens*, desenvolvidos pela Universidade de Gent, na Bélgica.

Trata-se da primeira tentativa, a nível mundial, no sentido de melhorar a qualidade proteica de sementes de feijão e de outras leguminosas, utilizando-se de técnicas de engenharia genética e DNA recombinante.

A equipe de engenharia genética da EMBRAPA-CENARGEN, nos últimos dois anos, isolou, purificou e caracterizou, entre as proteínas existentes nas sementes de castanha-do-brasil, as frações ou famílias com alto teor de metionina e cisteína, portanto, desejáveis para incorporação ao patrimônio genômico de leguminosas.

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), como a maioria das dicotiledôneas, acumula, em suas sementes, proteínas de reserva, que se classificam em três grupos segundo seus coeficientes de sedimentação: 60% das proteínas da semente têm índice de sedimentação 11S; 9% têm índice 7S; e 30% sedimentam a 2S, em gradiente de sacarose. Nas proteínas 2S, 17,33% dos aminoácidos são metionina, o que representa um teor de aminoácidos excepcionalmente elevado, quando comparado ao de outras sementes (Youle & Huang 1981).

Os esforços resultantes desta iniciativa despertaram o interesse da Universidade de Gent, na Bélgica, que detém a liderança mundial nas técnicas de isolamento, transferência e expressão de genes de plantas, utilizando como vetor o plasmídeo Ti existente em *Agrobacterium tumefaciens*.

A bactéria possui um plasmídeo (Ti), cujo peso molecular é da ordem de 120×10^6 daltons, dependendo do tipo de plasmídeo. No processo de infecção, a bactéria transfere uma região do plasmídeo (T-DNA) que corresponde a cerca de 10% do plasmídeo total. O T-DNA é inserido no DNA cromossômico das células vegetais, onde expressa genes que codificam para enzimas capazes de sintetizar as opinas (octopina, nopalina, agropina ou agrocinopinas). As opinas induzem na bactéria a síntese de enzimas que as catabolizam, utilizando-as como fonte de nitrogênio e carbono. O T-DNA é transcrito e traduzido nas células vegetais, sendo que 50% dos produtos da transcrição correspondem a opina sintetases (Ream & Gordon 1982). A transcrição inicia-se e termina no T-DNA realizado pela RNA polimerase II, e os estudos com alguns mRNA (s) provenientes da transcrição revelam características eucarionicas, embora os genes sejam provenientes de bactérias (Montagu & Schell 1982). Por esta razão, os autores acreditam que

outros genes de eucariontes inseridos em posições estratégicas no T-DNA possam ser igualmente transcritos e traduzidos. Hernalsteen et al. (1980) conseguiram inserir um transposon de *Escherichia coli* (tn 7) no T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, na região que codifica para a síntese de nopalina. A bactéria contendo o transposon foi então utilizada para transformar células de *Nicotiana tabacum*. Os transformantes foram selecionados pela resistência a metotrexato contido no tn 7. Culturas não-transformadas não crescem na presença de metotrexato (2 µg/ml), enquanto aquelas transformadas pela bactéria cresceram satisfatoriamente. Produtos da transcrição do tn 7 foram também isolados de núcleos de células transformadas. Utilizando a mesma estratégia, vários mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* foram obtidos, entre eles o pGV2100, que, paralelamente à indução de tumores, induz brotos absolutamente sadios, mas contendo fragmentos do T-DNA. Existem vários exemplos de protoplastos transformados para *Agrobacterium tumefaciens*; como em *Nicotiana tabacum* (Marton et al. 1979), *Vinca rosea* (Hasezawa et al. 1981), *Petunia hybrida*, (Draper et al. 1982). Em todos os casos, a expressão dos genes da bactéria contidos no T-DNA ou a presença de tumores foram utilizadas para seleção dos transformantes. Outros marcadores estão sendo testados, embora ainda sem sucesso. Um possível candidato é o antibiótico G148, que é tóxico para células de fumo em cultura (Ream & Gordon 1982).

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, A.M. Genetic improvement of seed proteins; proceedings of a workshop. s.l., s.ed., 1976. p.5-17.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. New protein foods. New York, Academic Press, 1984. v.1A, p.282.
- CAPLAN, A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; INZE, D.; VAN HAUTE, E.M.; VAN MONTAGU, M. SCHELL, J. & ZAMBRYSK, P. *Science*, **222**:815-21, 1983.
- DRAPER, J.; DAVEY, M.R.; FREEMAN, J.P.; COCKING, E.C. & COX, B.J. *Plant & Cell Phys.*, **23**(3):451-8, 1982.
- HASEZAWA, S.; NAGATA, T. & SYONO, K. *Mol. Gen. Genet.*, **182**:206-10, 1981.
- HORN, M.I.; JONES, D.B. & BLUM, A.E. *J. Biol. Chem.*, **166**:313-20, 1946.
- HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A. & HOFFMANN, N. *Science*, **223**:496-8, 1984.
- HOWELL, S.M. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**:609-50, 1982.
- MARTON, L.; WULLENS, G.J.; MOLENDIJK, L. & SCHILPEROORT, R.A. *Nature*, **277**:129-31, 1979.
- MONTAGU, M. van & SCHELL, J. *Current topics in microbiological research*, **96**:237-54, 1982.
- MUNTZ, K. Cell differentiation; molecular basis and problems. In: NOVER, L.; LUCKNER, M. & PARTHIER, B. ed. Berlin, Springer-Verlag, 1982. p.427-446.
- OTTEN, L.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M.; SCHIEDER, O.; STRAUB, J. & SCHELL, J. *Mol. Gen. Genet.*, **183**(2):209-13, 1981.
- REAM, L.W. & GORDON, M.P. *Science*, **218**:854-9, 1982.
- SCHERTZ, L.P. *Nutrition realities in low income countries*. Washington. U.S.D.A., Economic Research Service, 1973.
- TIMBERLAKE, W.E. & GOLDBERG, R.B. *California Agric.*, **36**:8-9, 1982.
- YOULE, R.J. & HUANG, A.H.C. *Amer. J. Bot.*, **68**:44-8, 1981.

PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR MICROORGANISMOS RECOMBINANTES

Spartaco Astolfi Filho¹
 Maria Beatriz N.S. de Souza²

ABSTRACT - This paper summarizes and discusses some results of using recombinant-DNA technology on the production of α -amylase by recombinant microorganisms.

INTRODUÇÃO

Com o advento da "crise do petróleo", que até o momento tanto interferiu economicamente em nosso país, ficou patente que a humanidade terá necessariamente que lançar mão de fontes alternativas de energia.

O Brasil destaca-se dos demais países pela sua imensa capacidade de produção de biomassa, pois nossa produtividade primária de ecossistemas terrestres tem grande participação na perspectiva mundial. Por isso, caso se desenvolva uma política científico-tecnológica adequada, ao invés de importar qualquer substrato energético, o Brasil brevemente deverá se posicionar fundamentalmente como exportador.

Na área de combustíveis renováveis, uma das prioridades nacionais é a produção de etanol. Em nosso país, três são as alternativas principais para a produção de etanol: a partir de sacarose de cana-de-açúcar, de amido de mandioca e de celulose.

No primeiro caso, o álcool pode ser produzido diretamente da sacarose, através de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. Este processo tem a vantagem de não requerer hidrólise inicial de macromoléculas, mas apresenta duas desvantagens fundamentais: a necessidade de utilização de solos férteis; e a competição com a produção de açúcar. Nos casos da utilização de amido e de celulose, a etapa limitante é a inicial, de hidrólise, que estas macromoléculas necessitam sofrer para fornecer substratos fermentáveis. A hidrólise ácida produz não só derivados fermentáveis, mas também substâncias indesejáveis, ao passo que a enzimática é realizada em condições mais brandas, produzindo alta taxa de açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática do amido pode ser realizada através da digestão com duas enzimas: α -amilase e amiloglicosidase, ao passo que a hidrólise da celulose necessita de um complexo composto no mínimo por 3 enzimas: exoglucanase, endolicanase e β -glucosidase (celobiase).

Tanto a partir do amido como da celulose, o custo de produção do álcool pode ser substancialmente diminuído caso se tenha à disposição:

– microorganismos com alta capacidade de produção das enzimas hidrolíticas; e

– microorganismos que possam, ao mesmo tempo, hidrolisar as macromoléculas e fazer fermentação alcoólica com eficácia.

Para isso, a comunidade científica pode contribuir decisivamente:

- a) na descoberta de novas espécies de microorganismos, com alta capacidade produtiva de enzimas hidrolíticas;
- b) no melhoramento genético das espécies conhecidas;
- c) na criação de microorganismos quiméricos, capazes de realizar tanto a hidrólise inicial das referidas macromoléculas como a fermentação alcoólica; e
- d) na otimização dos processos de produção, em escala pré-industrial.

É importante lembrar que derivados de celulose e amido podem vir a ser utilizados também na produção de proteína unicelular (single cell protein), e que a partir de álcool e açúcares pode ser produzida uma série enorme de compostos químicos, o que poderia fazer florescer toda uma indústria química tipicamente brasileira.

Nos três últimos anos, no que se refere à produção de α -amilase, os itens b e c, anteriormente citados, têm sido abordados pelo nosso grupo, em colaboração com o grupo de Genética de Leveduras do Instituto de Química da USP.

A partir do início desta década, diversos genes e cDNAs de α -amilase foram clonados, analisados e suas expressões estudadas em microorganismos recombinantes.

A seguir, nossos resultados serão apresentados resumidamente, em conjunto com os de outros grupos, procurando dar uma idéia atual da situação na área.

CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE GENES DE α -AMILASE DE *BACILLUS*

1. α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*:

Um banco de genes de *B. amyloliquefaciens* foi construído utilizando-se o plasmídeo pUB110 como veículo. A seguir, isolou-se do banco um plasmídeo recombinante (pTKH10), capaz de conferir capacidade de produção de α -amilase às células de *B. subtilis amy*.

Quando este plasmídeo híbrido foi inserido na cepa de *B. subtilis* (IH6064), produtora de α -amilase, o recom-

¹ Biólogo, M.Sc., Professor, Laboratório de Biologia Molecular, Dept.^o Biologia Celular, Universidade de Brasília, C.P. 15.3081, 70910 Brasília, DF.

² Biomédica, Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Dept.^o de Biologia Celular, Universidade de Brasília, C.P. 15.3081, 70910 Brasília, DF.

binante passou a ser capaz de produzir 2.500 vezes mais α -amilase que o *Bacillus* hospedeiro original, e 5 vezes mais que o doador do gene (Palva 1982). Esforços estão sendo desenvolvidos visando a construção de um eficiente veículo de expressão e secreção para *B. subtilis*, baseado no gene de α -amilase do plasmídeo pKTH10 (Lehtovaara et al. 1984).

2. α -amilase de *Bacillus licheniformis*:

O gene da α -amilase termoestável de *B. licheniformis* RPO1 foi clonado em *B. subtilis*, utilizando-se o plasmídeo pBD64 como vetor. O plasmídeo recombinante pRP1 foi capaz de transformar uma linhagem de *B. subtilis amy* em produtora de α -amilase.

A análise de termoestabilidade de α -amilase produzida pelo *Bacillus* recombinante mostrou que sua atividade não sofre variação significativa, mesmo após 10 min. de aquecimento a 80°C (Piggotti et al. 1984).

3. α -amilase de *Bacillus subtilis*:

O gene de α -amilase de *B. subtilis* NA64, hiperprodutor da referida enzima, foi clonado em *B. subtilis*, utilizando-se como veículo o plasmídeo pUB110 (Yamazaki et al. 1983). A partir deste gene clonado, desenvolveu-se um veículo de expressão e secreção para *B. subtilis* (Ohmura et al. 1984).

Por outro lado, o gene de *Bacillus* sp. (isolado em Brasília, provavelmente *B. subtilis*, em fase final de classificação) foi clonado em *Escherichia coli* 5K, utilizando-se como veículo um plasmídeo bifuncional para *E. coli*-*B. subtilis* (pATUB5). O plasmídeo recombinante contendo o gene de α -amilase de *Bacillus* sp. foi denominado pAKA1 (Ulhoa et al. 1984), e uma série de derivados menores foi produzida. Um dos plasmídeos derivados foi denominado pABC1 (Fig. 1), e é capaz de conferir capacidade de síntese de α -amilase tanto para células de *E. coli* como para *B. subtilis* (Fig. 2). O pABC1 é capaz de aumentar cerca de 10 vezes a produção de α -amilase do *B. subtilis* SB202. Neste caso, esforços também estão sendo realizados objetivando a construção de um veículo de expressão e secreção para *B. subtilis*.

CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE SEQÜÊNCIAS CODIFICANTES DE α -AMILASE DE OUTRAS ORIGENS

1. α -amilase de trigo:

Visando a expressão do cDNA de α -amilase de trigo em *S. cerevisiae*, este foi inserido no veículo de expressão de levedura pMA 230, ficando sob a coordenação do promotor do gene da fosfoglicerato quinase. Células de *S. cere-*

visiae contendo o plasmídeo recombinante apresentaram capacidade de hidrolisar amido a 1%, em placas, produzindo um halo típico após coloração do amido com vapor de iodo. Como 30 a 60% da amilase produzida era secretada no meio, pode-se concluir que o peptídeo sinal de α -amilase de trigo é capaz de funcionar em levedura (Rothstein et al. 1984).

2. α -amilase de glândula salivar de camundongo:

Neste caso, o cDNA de α -amilase de glândula salivar de camundongo foi inserido no veículo de expressão para *S. cerevisiae* pMA56, sob a coordenação do promotor da desidrogenase alcoólica 1 de levedura.

A levedura expressou a mensagem clonada. Em um litro de cultura de células, na densidade de 2×10^7 células/ml, foi possível detectar 75 μ g de α -amilase, o que corresponde a 0,1% do total das proteínas celulares.

Como cerca de 90% da α -amilase sintetizada era secretada no meio, esse resultado indica que o peptídeo sinal de α -amilase salivar de camundongo funciona na levedura (Thomsen 1983).

3. α -amilase de pâncreas de camundongo:

cDNAs de α -amilase pancreática de camundongo foram clonados no sítio de PstI do pBR322, originando uma série de plasmídeos recombinantes denominados pCEPa (Tosi et al. 1984). Como ocorreu com outras mensagens clonadas dentro do gene da β -lactamase bacteriana, um dos plasmídeos desta série, o pCEPa¹⁶, mostrou a capacidade de conferir atividade amilolítica em células de *E. coli*.

O cDNA de α -amilase pancreática do pCEPa¹⁶ foi, em seguida, inserido no sítio de Hind III do veículo de expressão e secreção de *S. cerevisiae* pES, originando o plasmídeo pESA (Fig. 3); desta forma, a mensagem clonada ficou sob a coordenação do promotor do gene MFa1 de levedura e adiante das seqüências codificadoras dos sinais de secreção do fator α .

Células de *S. cerevisiae*, contendo o plasmídeo recombinante, são capazes de produzir e secretar α -amilase pancreática de camundongo, produzindo halo típico em placas de L-ágar-amido, após coloração com vapor de iodo.

Foi possível, neste caso também, selecionar recombinantes estáveis, resultantes provavelmente de recombinação do plasmídeo com o genoma da levedura. Essas células são capazes de secretar cerca de 150 U de α -amilase por ml, valor este comparável com o secretado pela levedura amilolítica *Schwanniomyces alluvius*.

Neste caso, como no cDNA utilizado, a região codificadora do peptídeo sinal de α -amilase está quase totalmente ausente; muito provavelmente as mensagens responsáveis pela secreção da α -amilase pela levedura são os mesmos sinais responsáveis pela secreção do fator α (Astolfi Filho et al. 1985).

FIG. 1. Representação esquemática do plasmídeo recombinante pABC1. Este plasmídeo é derivado do pUB110 e pATI53, e contém o gene de α -amilase de *Bacillus* sp.

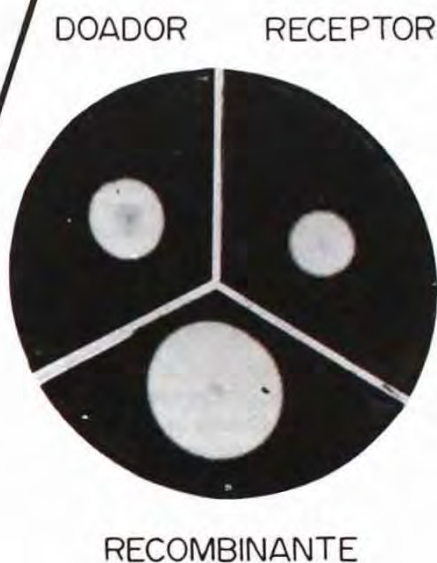
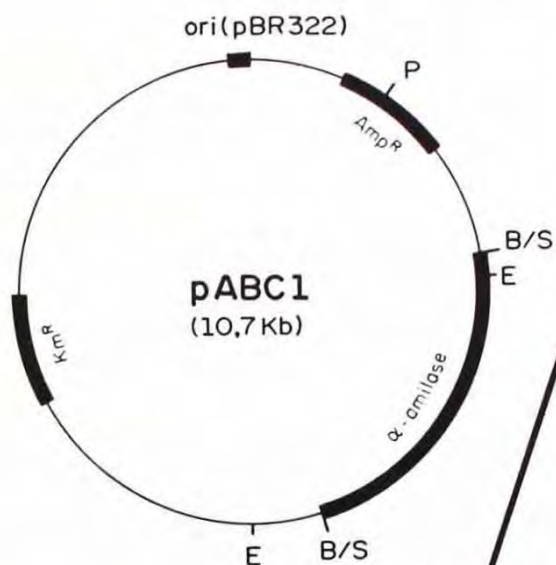


FIG. 2. Hidrólise de amido em placa. Mostra-se a degradação de amido formando halos típicos, em placas de L-ágar contendo 0,5% de amido, após coloração em vapor de iodo. O *Bacillus* recombinante contém o plasmídeo pABC1, enquanto o receptor está transformado com o plasmídeo pATUB5 utilizado como veículo de clonagem molecular.

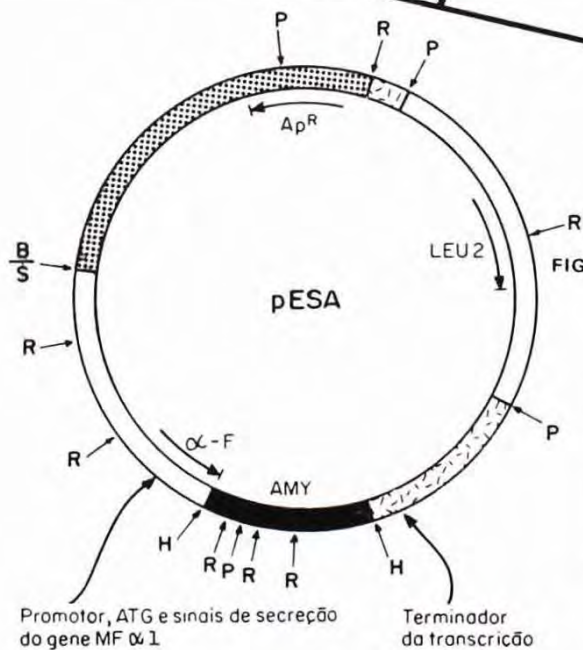


FIG. 3. Representação esquemática do plasmídeo pESA. Este plasmídeo contém o cDNA α -amilase pancreática de camundongo, e é capaz de conferir atividade amilolítica a células de *Saccharomyces cerevisiae*.

	● DNA de pBR 322
	● DNA de 2 μ
	● DNA cromos. de levedura
	● C - DNA de α -amilase

Promotor, ATG e sinais de secreção do gene MF α 1

Terminador da transcrição

REFERÊNCIAS

- ASTOLFI FILHO, S.; GALEMBECK, E.V.; FARIA, J.B. & FRASCINO, A.C.S. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. Artigo submetido ao periódico *Biotechnology* (1985).
- LEHTOVAARA, P.; ULMANEN, I. & PALVA, I. In vivo transcription initiation and termination sites of an α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* cloned in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 30:11-6, 1984.
- OHMURA, K.; SHIROZA, T.; NAKAMURA, K.; NAKAYAMA, A.; YAMANE, K.; YODA, K.; YAMASAKI, M. & TAMURA, G. A *Bacillus subtilis* secretion vector system derived from the *B. subtilis* α -amylase promoter and signal sequence region, and secretion of *Escherichia coli* β -lactamase by the vector system. *J. Biochem.*, 95:87-93, 1984.
- PALVA, I. Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene*, 19:81-7, 1982.
- PIGGOTTI, R.P.; ROSSITER, A.; ORTLEPP, S.A.; PEMBROKE, J.T. & OLLINGTON, J.F. Cloning in *Bacillus subtilis* of an extremely thermostable alpha amylase; comparison with other cloned heatstable alpha amylase. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, 122:175-83, 1984.
- ROTHSTEIN, S.J.; LAZARUS, C.M.; SMITH, W.E.; BAULCOMBE, D.C. & GATENBY, A.A. Secretion of a wheat α -amilase expressed in yeast. *Nature*, 308:662-5, 1984.
- THONSEN, K.K. Mouse α -amylase synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* is released into the culture medium. *Carlsberg Res. Com.*, 545-55, 1983.
- TOSI, M.; BOVEY, R.; ASTOLFI FILHO, S.; BODARY, S.; MEISLER, M. & WELLAUER, P. Multiple non-allelic genes encoding pancreatic fashion. *EMBO J.*, 3:2809-16, 1984.
- ULHOA, C.J.; SOUZA, M.B.N.S.; TEIXEIRA, S.M.R.; SILVA, S.L.B.; PEREIRA, I.S.; MENEZES, M.C.N.D.; LIMA, V.M.Q.G. & ASTOLFI FILHO, S. Expression and secretion of *Bacillus* sp. α -amilase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In: IV JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY. Rio de Janeiro, 1984. *Resumos...* Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1984. p32.
- YAMAZAKI, H.; OHMURA, K.; NAKAYAMA, A.; TEKEICHI, Y.; OTOZAI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. & YAMANE, Y. α -amylase genes (amy R2 and amy E⁺) from an α -amylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain; molecular cloning and nucleotide sequences. *J. Bacteriol.*, 156:327-37, 1983.

**PROGRAMA DE PESQUISA APRESENTADO
PELOS PARTICIPANTES**

MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXI IN VITRO

José Renato Santos Cabral¹

A propagação do abacaxi é feita, usualmente, utilizando-se mudas de vários tipos: coroa, filhote e rebentão. Outro método que pode ser utilizado é a micropropagação, que consiste na regeneração de plantas a partir de gemas axilares, cultivadas em meio nutritivo sintético, em condições definidas. Um problema encontrado no melhoramento genético do abacaxi é a multiplicação de plantas selecionadas a partir de mudas convencionais. A micropropagação *in vitro* apresenta-se como alternativa eficiente para a propagação rápida do abacaxi, visto que diversos autores já conseguiram alta frequência de regeneração de plantas através de explantes de gemas axilares. O Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, da EMBRAPA, está desenvolvendo, em Cruz das Almas, Bahia, pesquisas de micropropagação do abacaxi *in vitro*, para aplicá-la na multiplicação rápida de plantas selecionadas no programa de melhoramento genético e no intercâmbio de germoplasma. Gemas axilares são cultivadas, inicialmente, em meio líquido, contendo macro e microelementos (Murashige &

Skoog 1962), acrescido de (30 g/l) sacarose e vitaminas (meio 1), com ponte de papel de filtro. Após a diferenciação dos explantes, estes são transferidos para novo meio de cultivo de composição idêntica ao anterior, suplementado com (em mg/l): ágar, 7.000; ANA 0,2; e BAP 0,2 (meio 2).

As brotações desenvolvidas são repicadas individualmente, para recipientes contendo o meio 1 acrescido de 0,7% de ágar. Nestas condições, ocorrem o enraizamento das brotações, formando plântulas que são transplantadas para uma mistura contendo solo e vermiculita (esterilizados) e colocadas em condições de casa de vegetação. Através dessa técnica, consegue-se a regeneração de 10-15 plantas por explante inicial.

REFERÊNCIA

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-7, 1962.

¹ Eng.^o-agr.^o, M.Sc., EMBRAPA/CNPMP, C.P. 007, 44380 Cruz das Almas, BA.

**PRODUÇÃO DE HAPLÓIDES DE CACAUEIRO
PELO CULTIVO DE EMBRIÃO DE SEMENTES
CHOCHAS IN VITRO**

Luiz Roberto Martins Pinto¹
Antonio Valeriano Pereira dos Santos²
Messias Gonzaga Pereira¹
Geraldo Adami Carletto¹

INTRODUÇÃO

A heterose no cacaueteiro tem grande importância no melhoramento desta espécie. Ela é aproveitada, especialmente, através da formação de variedades híbridas, pois é este um dos métodos de melhoramento onde se procura tirar proveito deste fenômeno.

Os híbridos de cacaueteiro atualmente desenvolvidos são resultantes de cruzamentos entre clones (materiais heterozigotos), sendo, portanto, altamente heterogêneos; é muito difícil prever produção, suscetibilidade a doenças e pragas etc., embora sejam vigorosos e precoces. Grande sucesso na produção de híbridos poderia ser alcançado com a cultura do cacaueteiro se fossem utilizadas linhas puras na sua obtenção. Considerando-se, no entanto, o grande dispêndio de recursos humanos e financeiros, além do grande período de tempo, necessário para a produção de tais linhas puras a partir de autofecundações sucessivas, a produção de haplóides duplicados parece constituir a via mais indicada para obter esta homozigose (Dublin 1978).

A obtenção de haplóides duplicados de cacaueteiros foi estudada por Dublin (1973a, b, 1974, 1978) como uma alternativa para a obtenção de plantas homozigotas em curto espaço de tempo, com fins de melhoramento do cultivo (produção de híbridos), além do interesse em estudos citogenéticos.

Uma alternativa para a obtenção de haplóides é a partir das sementes chochas, comumente encontradas no meio de sementes normais, pois há uma relação entre a porcentagem de haploidia e o caráter sementes chochas (Dublin 1973a).

A porcentagem de sementes chochas na mesma cultivar é variável entre frutos, lotes de frutos e entre origens genéticas (Amelonado, Trinitários, Alto Amazônicos, Híbridos Amazônicos). Normalmente encontram-se as porcentagens maiores nos frutos procedentes de hibridações interespecíficas (*T. cacao* x *T. grandiflorum*) ou intergenéricas (*T. cacao* x *Herrania*) (Dublin 1973a). A produção de sementes chochas pode também ser induzida através de polinizações, 24 horas após a abertura da flor (Dublin 1973b).

O presente trabalho tem como objetivo obter e estudar plantas haplóides obtidas a partir dos diversos genótipos existentes no Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPLAC-CEPEC), bem como estudar as obtidas a partir dos híbridos existentes, com a finalidade de estudos citogenéticos e de melhoramento do cacaueteiro, através da obtenção de linhas puras.

MATERIAL E MÉTODOS

Serão utilizados clones de boa habilidade combinatória e com características agrônômicas superiores, existentes no Banco de Germoplasma do CEPEC.

Os métodos utilizados para a obtenção das sementes chochas serão os seguintes:

1. A simples observação e coleta das sementes chochas, que ocorrerem naturalmente (Dublin 1973a).
2. Obtenção de sementes chochas, através de cruzamentos interespecíficos (*T. cacao* x *T. grandiflorum*) e intergenéricos (*T. cacao* x *Herrania*) (Dublin 1973a).
3. Obtenção de sementes chochas, através de polinização em flores, 24 horas após sua abertura e emasculação (Dublin 1973b).

Considerando que nem sempre os embriões de sementes chochas têm capacidade para germinar em condições de sementeira, a cultura desses embriões *in vitro* é uma ferramenta importante na obtenção de haplóides a partir destas sementes (Jensen 1977, Raghavan 1977, Day 1980).

A determinação das plantas haplóides será feita pelo estudo de:

1. densidade estomática;
2. comprimento das células-guarda;
3. número de cloroplastos das células-guarda;
4. desenvolvimento geral da plântula; e
5. contagem de cromossomos nas folhas, gemas e ponta de raízes.

A manutenção destas plântulas haplóides, devido à sua debilidade, é feita enxertando-se em plantas haplóides, podendo ser realizada na fase cotiledonar ou em plantas de até 6 meses de idade (Dublin 1974).

REFERÊNCIAS

DAY, P.R. Tissue culture methods in plant breeding. In: INGRAN, D.S. & HELGESON, J.P., ed. *Tissue culture methods for plant pathologists*. s.l., Blackwell, 1980. p.223-31.

DUBLIN, P. Les "feves plates"; une nouvelle source d'haploidie chez le cacaoyer (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé*, 17: 25-36, 1973a.

¹ Divisão de Genética, CEPLAC-CEPEC.

² Divisão de Botânica, CEPLAC-CEPEC, C.P. 7, 45600 Itabuna, BA

- DUBLIN, P. Note sur l'utilisation d'un marqueur génétique dans les recherches d'haploïdes chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé*, 17:205-10, 1973b.
- DUBLIN, P. Les haploïdes de *Theobroma cacao* L.; diploïdisation et obtention d'individus homozygotes. *Café Cacao Thé*, 18: 83-96, 1974.
- DUBLIN, P. Haploïdes diploïdisés et obtention de génotypes homozygotes fertiles chez les cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé*, 22:275-84, 1978.
- JENSEN, C.J. Monoploïd production by chromosome elimination. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant cell, tissue and Organ Culture*; applied and fundamental aspects. s.l., Springer-Verlag, 1977. p.299-340.
- RAGHAVAN, V. Applied aspects of embryo culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. *Plant Cell, tissue and organ culture*. s.l., Springer-Verlag, 1977. p.375-97.

CULTURA DE ANTERAS E EMBRIÕES IN VITRO COMO APOIO AO MELHORAMENTO DO TRIGO NO CNPT-EMBRAPA

Maria Irene B. de M. Fernandes¹
Vanderlei da R. Caetano²

Haplóides são indivíduos que apresentam um só genoma e, em geral, originam-se de gametas que não foram fertilizados; apresentam problemas de esterilidade porque, na meiose, não há pareamento. O uso da colchicina, na duplicação dos cromossomos, restaura a fertilidade, permitindo o pareamento regular, a formação de gametas balanceados e a produção normal de sementes.

O potencial dos haplóides para o melhoramento baseia-se na possibilidade de obter, em uma geração, a homozigose, que levaria de oito a nove gerações para ser atingida, pelos métodos tradicionais.

Em outubro de 1979, com a consultoria do Dr. E. Picard, de Orsay, foram cultivadas anteras de trigo, pela primeira vez, no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT) da EMBRAPA, em Passo Fundo.

Em 1980, foram avaliados meios de cultura e a duração ideal do choque térmico, para maior produção de embriões (Moraes-Fernandes & Picard 1983).

Para a obtenção de plantas haplóides, as anteras com grãos de pólen uninucleados são colocadas em meio de cultura, o que induz a embriogênese. Após 4-8 semanas, os embriões são transferidos para o meio de regeneração, onde desenvolvem as plantinhas verdes (\pm 8 semanas). Após serem aclimatadas fora do tubo de ensaio, é efetuada a contagem dos cromossomos: as plantas autoduplicadas espontaneamente serão levadas até a colheita normalmente, enquanto as haplóides são tratadas primeiro com colchicina. Nova multiplicação é efetuada após a colheita, quando é feita a avaliação a campo. As linhagens multiplicadas são colocadas em ensaios, cerca de 1 ano e dez meses após a cultura.

A Fig. 1 ilustra o procedimento para obtenção de plantas haplóides de trigo, mediante cultura de anteras.

Três genótipos mostraram até o momento excelente "capacidade androgenética" (NB*3/AG/NB*3 ALD), (ALZ 110/IAS 54*2/6/TP/4/TZPP/SON 64/NAPO/3/CIANO/5/PF 6968) e (TP/4/TZPP/SON 64/NAPO/3/CIANO/5/PF 6968/HAD/SEL/JACUÍ/7/COPUSU DIV 18088/8/LD/CNT 1/LD*2/ALD SIB/31/AC 5/HAD SEL), pois foram os mais eficientes na produção de embriões e plantas haplóides.

Na Tabela 1 aparecem os números de genótipos avaliados em cada ano e os números dos que apresentaram "capacidade androgenética."

Na Tabela 2 são apresentados resultados quanto ao número de linhagens obtidas, avaliadas, multiplicadas e colocadas em ensaios de rendimento em cada ano.

TABELA 1. Número de genótipos que produziram plantas verdes após cultura.

Ano	Nº genótipos	Total genótipos testados
1980	4	10
1981	1	11
1982	3	22
1983	11	21
1984	24	74

TABELA 2. Número de linhagens duplo-haplóides que apresentaram duplicação espontânea ou que foram duplicadas com colchicina, colhidas, multiplicadas e avaliadas em ensaio de rendimento.

Ano	Duplicação espontânea	Duplicação p/colchicina	Linhagens férteis Colheita	Seleção e multiplicação	Ensaio de rendimento
1979	.	4	4	.	.
1980	1	4	5	.	.
1981	.	23	20	.	.
1982	6	21	25	.	.
1983	6	11	16	21	21
1984	6	7	6	.	.
1983	28	236	248	30	16
1984	11	88	99	.	.
1984	10	39	19	114	3

¹ B.S. em História Natural, Dr.^a em Genética, EMBRAPA/CNPT, Passo Fundo, RS.

² Eng.^o-agr.^o, Doutor em Agronomia, EMBRAPA/CNPT, Passo Fundo, RS.

Na Tabela 3 podem ser visualizados os resultados obtidos pelas linhagens duplo-haplóides nos ensaios preliminares de rendimento, onde pode ser verificado que algumas, como PF 813019 e PF 823011, mostraram produções equivalentes às das melhores testemunhas, o que indica a viabilidade do uso desta metodologia no melhoramento do trigo.

A metodologia da cultura de embriões *in vitro* está sendo utilizada no CNPT no programa de utilização do geroplasma de espécies afins.

A hibridação interespecífica é um recurso a ser utilizado quando não se encontra, nas cultivares disponíveis, a variabilidade necessária para a identificação dos genes úteis,

ou quando se desejam diversificar genes para uma característica. A estratégia de transferência, no caso dos cruzamentos interespecíficos, depende fundamentalmente do sistema genético da espécie afim, portadora da característica desejada e não da característica em si. Existem grandes dificuldades que são inerentes à metodologia, tais como, baixo sucesso nos cruzamentos, necessidade de cultura de embriões e a ocorrência de interações que podem suprimir ou limitar a expressão da resistência.

Na Fig. 2 o procedimento utilizado para a transferência de gene de resistência presente em *Aegilops squarrosa* é apresentado.

Doze linhagens sintéticas foram deste modo obtidas no CNPT. PF 804001 e PF 804002 são fontes de resistência à ferrugem do colmo; PF 834001 é fonte de resistência ao oídio; PF 844004 e 844005 são fontes de resistência à ferrugem da folha. As outras estão sendo multiplicadas para avaliação.

TABELA 3. Resultados obtidos na avaliação de linhagens duplo-haplóides. CNPT, 1982, 1983 e 1984

Nº linhagem	Produção kg/ha	Altura	Nº dias até espigamento
1982			
PF 813001 1 DH	447	75	87
PF 813002 2 DH	413	70	87
PF 813003 4 DH	363	65	91
PF 813004 5 DH	784	75	74
PF 813005 6 DH	326	70	95
PF 813006 6 DH	372	70	94
PF 813007 8 DH	326	75	93
PF 813008 9 DH	1.365	75	92
PF 813009 10 DH	851	90	74
PF 813010 11 DH	613	90	76
PF 813011 13 DH	965	65	95
PF 813012 14 DH	758	80	74
PF 813013 15 DH	661	80	74
PF 813014 17 DH	1.231	85	74
PF 813015 20 DH	865	85	74
PF 813016 26 DH1	1.305	100	74
PF 813017 28 DH1	1.423	70	95
PF 813018 28 DH2	1.426	70	95
PF 813019 28 DH3	1.640	70	95
PF 813020 24 DH1	1.484	100	73
PF 813021 24 DH2	1.405	100	70
Testemunhas			
PAT 7392	1.454	90	82
CNT 9	394	75	87
IAC 5	1.405	95	74
1983			
PF 823011 35 DHa	3.306	80	88
PF 823012 35 DHb	3.272	80	88
PF 823015 37 DHa	2.529	85	87
PF 823016 37 DHb	2.662	85	87
PF 823021 40 DH	2.671	80	93
PF 823022 40 DH	2.361	80	93
PF 823028 44 DH	2.060	75	87
PF 823040 51 DH	2.693	80	94
PF 823042 53 DH	2.642	80	87
PF 823043 53 DH	2.217	80	87
PF 823046 55 DH	2.383	85	87
PF 823047 56 DH	3.086	90	93
PF 823051 58 DH	2.842	90	93
PF 823052 58 DH	2.944	90	93
PF 823055 29 DH1	2.269	85	93
PF 823056 29 DH3	2.288	85	93
Testemunhas			
PAT 7392	3.308	100	79
CNT 8	2.857	95	87
IAC 5 - Maringá	3.054	106	79
1984			
PF 823011	3.751	120	106
PF 823012	3.969	120	118
PF 823032	2.735	120	115
Testemunhas			
CNT 8	3.980	110	106
IAC 5	2.607	65	93
Minuano 82	3.542	85	101

Resultados dos ensaios preliminares de rendimento efetuados no CNPT, em 1982, 83 e 84, conduzidos por J.C.S. Moreira (não publicado).

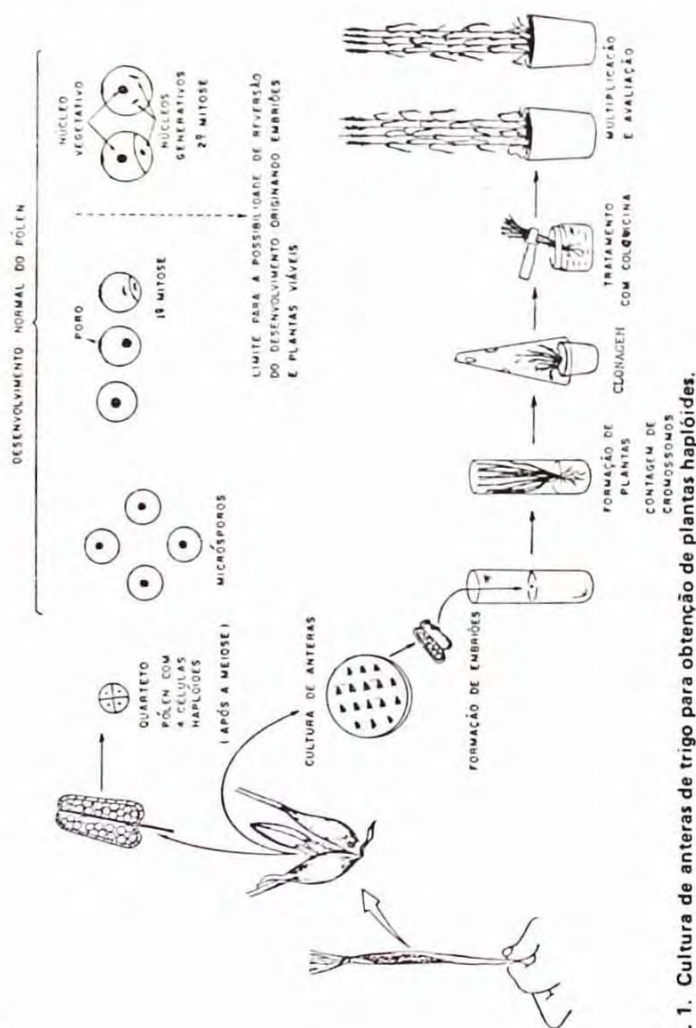


FIG. 1. Cultura de anteras de trigo para obtenção de plantas haplóides.

REFERÊNCIA

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de & PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using Brazilian wheat genotypes. *R. bras. Genet.*, 6(2):261-77, 1983.

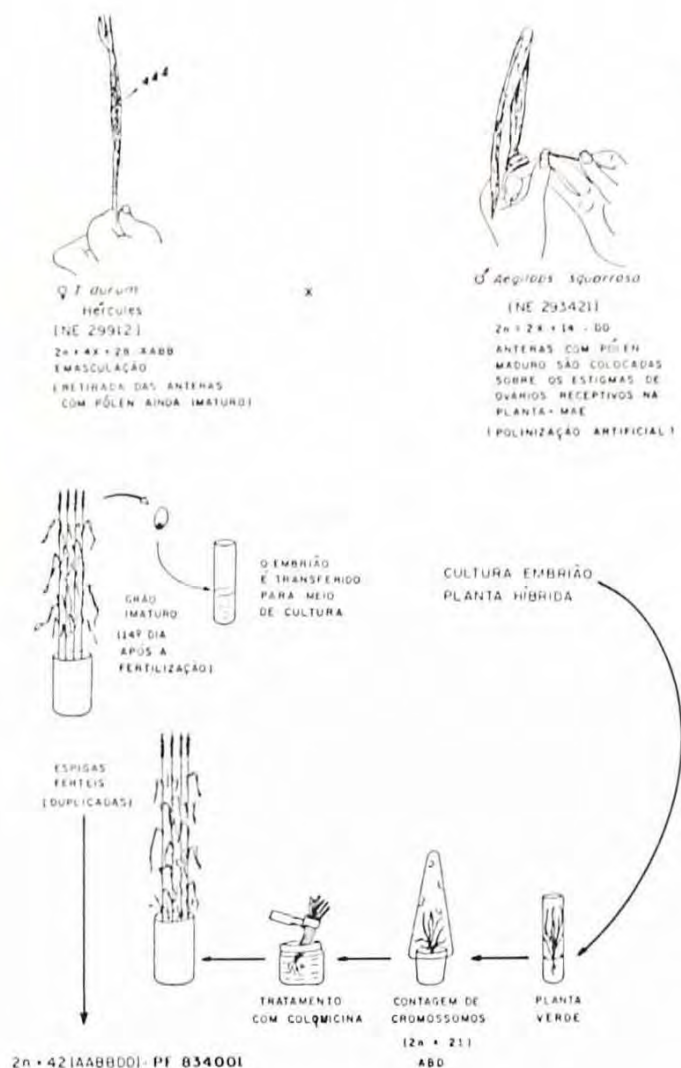


FIG. 2. Ilustração do cruzamento entre *T. durum* (2n = 28, AABB) com *Aegilops squarrosa* (2n = 14, DD). O embrião híbrido produzido deve ser cultivado *in vitro*, devido à degeneração do endosperma. A plantinha resultante tem seus cromossomos duplicados com colquicina, atingindo o número de 2n = 42 e a constituição genômica do trigo atual (AABBDD).



DATURA INSIGNIS, BARB. RODR. : CULTURA DE TECIDOS, ULTRA-ESTRUTURA FOLIAR E OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS¹

M.A. Esquibel²
F.C. Miguens²
R.D. Machado²
C.G. Costa³

A *Datura insignis*, Barb. Rodr. apresenta 0,30% de escopolamina e 0,02% de hiosciamina em suas folhas (Rizzini & Bastos 1956).

Folhas jovens, de 8 a 11 cm de comprimento, retiradas de plantas cultivadas no campo, foram usadas para estudos da estrutura e da ultra-estrutura, bem como para isolamento de protoplastos. Os fragmentos examinados em microscopia ótica foram fixados em formol-ácido acético-álcool e corados com fucsina básica-hematoxilina. Os fragmentos destinados à observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram fixados em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão Cacodilato 0,05 M, e pH 7,2 (Karnovsk 1965), durante 2 horas, no vácuo, à temperatura ambiente. A desidratação foi feita em série alcoólica, e as amostras foram secadas pelo ponto crítico do dióxido de carbono e recobertos, por "spultering", com uma camada de 20 nanômetros de ouro (Glauert 1980). As folhas das quais isolamos os protoplastos foram desinfestadas por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,53%, durante 15 minutos, e em etanol 70%, durante 2 minutos. Após a desinfestação, a epiderme inferior foi removida e a pré-plasmólise foi realizada em meio CPW contendo 13% de Manitol, durante 60 minutos (Reinert & Yeoman 1982). O isolamento dos protoplastos foi feito em solução enzimática contendo Celulase Onozuka R10 2%, Pectolyase 0,2%, em meio CPW com 13% de Manitol (Nagata & Ishii 1979). Os protoplastos isolados foram separados por flotação em meio CPW com 21% de sacarose. Os fragmentos que deram origem à cultura de tecidos foram desinfestados, como descrito anteriormente, e, em seguida, colocados em meio MS (Murashige & Skoog 1962). A lâmina foliar, vista em cortes transversais, apresenta epiderme mais espessa na superfície adaxial que na abaxial, há estômatos anomocísticos em ambas as faces, o parênquima paliçádico constitui-se de células cilíndricas, e o lacunoso é estratificado em até 5 camadas. Observou-se uma camada de células coletoras entre estes dois parênquimas, além de inclusões em forma de drusas, possivelmente de oxalato de

cálcio, no parênquima paliçádico. Nas células coletoras e no parênquima lacunoso, em ambas as epidermes, há tricomas tectores e capitados. Estrias epicuticulares também foram observadas em ambas as superfícies das folhas.

Os explantes foliares colocados em meio de MS, no escuro, deram origem a "calo" de aspecto claro e friável, com células arredondadas. Na MEV, peças submetidas à fratura em nitrogênio líquido mostraram que as células do parênquima lacunoso estão em nítida proliferação. Outros explantes deixados sob iluminação, em meio LS (Linsmayer & Skoog 1964), deram origem a raízes e calos; entretanto, quando submetidos à abstenção de luz, apenas observou-se a formação de calos. Os protoplastos obtidos, na concentração de 10⁴/ml, aproximadamente, apresentavam cloroplastos adjacentes à membrana celular, com vacúolo central e aparentemente íntegro, e totalmente desprovidos de parede celular, sendo esta a morfologia típica de uma célula isolada e viável (Fowke & Gamborg 1980). Quando observados por MEV, apresentavam dobramentos da membrana celular, provavelmente devido à plasmólise, inerente à metodologia de isolamento, e também à retração do processamento para MEV. Estes dados gerais sobre a estrutura da folha e dos protoplastos foram obtidos como base para os próximos trabalhos de ultra-estrutura, que acompanharão os estudos de isolamento e fusão de protoplastos.

REFERÊNCIAS

- FOWKE, L.C. & GAMBORG, O.L. Applications of protoplasts to the study of plant cells. *Int. Rev. Cyt.*, 68:9-51, 1980.
- GLAUERT, A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. s.l., North-Holland, 1980.
- KARNOVSKY, M.S. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *S. Cell Biol.*, 27:137, 1965.
- LINSMAYER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18:100-27, 1965.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-97, 1962.
- NAGATA, I. & ISHII, S. A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. *Can. J. Bot.*, 57:1820-3, 1979.
- REINERT, J. & YEOMAN, M. *Plant cell and tissue culture*. Springer-Verlag, 1982.
- RIZZINI, C.T. & BASTOS, M.L. *Datura insignis*, Barb.: seus alcalóides. *An. Acad. bras. Ci.*, 28(4):473-83.

¹ Pesquisa parcialmente financiada por UFRJ-PBV/CNPq/FINEP e BIOMATRIX.

² Instituto de Biofísica, UFRJ-PBV.

³ Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA VEGETAL

Marisa de Goes¹

A consciência da necessidade de preservar recursos genéticos é hoje uma realidade mundial. No caso dos vegetais, que na maioria das espécies se propagam por via sexual, existem grandes coleções de germoplasma sendo conservadas na forma de sementes, em câmaras com baixas temperaturas. As espécies, cujas sementes têm curto período de viabilidade, ou não se reproduzem com facilidade por via sexual e que são, normalmente, propagadas por via vegetativa, também correm riscos de perdas. Para manter estas espécies, a melhor técnica disponível, atualmente, é a conservação *in vitro*, que, apesar de não ser o método definitivo e não possuir metodologia para todas as espécies, apresenta-se como um recurso mais seguro do que a conservação a campo. O uso deste método permite manter o germoplasma livre de danos causados por fatores edafoclimáticos, pragas e doenças, além de conservar grandes coleções em pequenos espaços sob controle, em laboratório, liberando as áreas de campo para outras atividades. A conservação de germoplasma *in vitro* engloba 2 tipos de coleções, de acordo com o Comitê de Orientação para Conservação *In Vitro*, do International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR (FAO 1982):

1. Coleção de base *in vitro* – É a conservação de germoplasma a longo prazo através de criopreservação. A técnica consiste, basicamente, em tratar o tecido com um crioprotetor, que pode ser o glicerol, DMSO, prolina e outros, ou mesmo uma mistura deles, e, a partir daí, promover um congelamento lento e controlado até -70°C . Posteriormente, é imerso em nitrogênio líquido, onde é mantido a -196°C por tempo indefinido. O descongelamento é feito também sob controle, até atingir a temperatura ambiente. A coleção de base *in vitro* não é usada para intercâmbio.

2. Coleção ativa *in vitro* – O germoplasma é mantido em crescimento mínimo sob condições controladas, replicando periodicamente, podendo ser usado para multiplicação, avaliação, indexação, distribuição e intercâmbio. Este é o tipo de coleção de germoplasma existente atualmente na maioria das instituições que trabalham com conservação *in vitro*.

O Centro Nacional de Recursos Genéticos-CENARGEN, começou as atividades de conservação *in vitro* em 1980, trabalhando inicialmente com mandioca (*Manihot esculenta*) e batata (*Solanum tuberosum*). A coleção engloba, hoje, além dos produtos iniciais, a batata-doce (*Ipomea batatas*) e o cará (*Dioscorea* sp.), totalizando 1.086 acessos (Tabela 1),

TABELA 1. Crescimento das coleções de germoplasma *in vitro*, expresso em números de acessos.

Produto/ano	1983	1984	1985
Mandioca	120	210	725
Batata	82	102	230
Batata-doce	-	84	96
Cará	11	12	35
Total	213	408	1.086

mantidos em 2 câmaras com capacidade total de 15.000 acesso, sob condições de temperaturas de $20-25^{\circ}\text{C}$ e $5-10^{\circ}\text{C}$ para plantas de climas tropical e temperado, respectivamente, e luminosidade próxima a 2.500 Lux.

O germoplasma conservado *in vitro* provém de meristemas de plantas originadas de coletas ou intercâmbio, visando a manter a estabilidade genética. O meio de cultura comumente usado consiste em sais de Murashige & Skoog (1962), acrescidos de vitaminas, sacarose e reguladores de crescimento, em quantidades variáveis de acordo com a espécie e o tecido usado. A diminuição dos níveis de sacarose e o uso de baixa luminosidade têm promovido o aumento dos intervalos de repicagem, que variam de 6 meses até 2 anos, de acordo com a espécie e as plantas da mesma espécie. Além das atividades de conservação de germoplasma, a equipe vem pesquisando meios de cultura para preservar *Colocasia* e espécies selvagens de *Manihot*, assim como, desenvolvendo projetos na área de criopreservação, indicada, hoje, como ideal para a conservação de germoplasma.

REFERÊNCIAS

- FAO, International Board for Plant Genetic Resources. IBPGR advisory committee on *in vitro* storage. Rome, 1982. 11p. (FAO. IBPGR. AGPG 82/84).
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.*, 15: 493-7, 1962.

¹ Eng.^a-agr.^a, Pesquisadora EMBRAPA/CENARGEN, C.P. 102372, 70770 Brasília, DF.

Departamento de Difusão de Tecnologia - DDT

Chefe: Ivan Sergio Freire de Souza

Coordenadoria de Comunicação Técnico-Científica - COTEC

Coordenadora: Evanir Pimenta Figueiredo

Tratamento Editorial

Antonio Carlos Naves

Cláudia Brod Siqueira - DID

Glória Balué Gil

José Eustáquio Menezes - CNPH

Patrícia Maia Souto Maior

Vania Grace Nogueira

Composição

Francisca Bezerra de Assis Soares

Júlio César da Silva Delfino

Vera Lúcia Alves

Montagem e arte-final

Valter Silva

Capa

Arthur H. Foerstnow

Arte-final de capa

José Edgar O. Barreiros