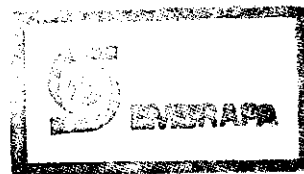


## PERSPECTIVAS DA BIOTECNOLOGIA, PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS

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

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



---

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

<sup>2</sup> Bel. H. Nat., Dr, em Genética, Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, EMBRAPA, Passo Fundo, RS.

## INTRODUÇÃO

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

Por outro lado, a regeneração de plantas em escala ampla, através da cultura de células, tecidos ou órgãos "in vitro", abriu um horizonte totalmente novo para a Biologia Vegetal. Este horizonte ampliou-se ainda mais quando se tornou possível associar o uso da cultura de tecidos com a tecnologia do DNA recombinante. O uso destas técnicas tem sido denominado Biotecnologia, Engenharia Genética ou Engenharia Biogenética (Knopf, 1983). Esta área de pesquisa está sendo considerada por muitos como inteiramente nova. Entretanto, a manipulação ou reestruturação dos genomas dos seres vivos não é recente. Se observarmos as diferenças que ocorrem, atualmente, entre cultivares comerciais de espécies como o milho, o trigo ou a soja, em relação a seus ancestrais selvagens, teremos a evidência do resultado da Biotecnologia que já foi praticada, inicialmente, apenas pela natureza e, mais tarde, também pelo homem, à medida que a Agricultura e a Genética se desenvolveram.

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

uma população vegetal ao nível da célula, do tecido e do indivíduo ao ecossistema de cultivo em uso, visando atender às necessidades do homem.

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

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

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

Esta tecnologia pode ser usada, no melhoramento, ao "nível molecular", através da indução de mutações específicas no material genético (DNA), o qual pode ser isolado, cortado por enzimas de restrição em pontos definidos e reconstruído em combinações diversas pelas enzimas ligases. Posteriormente, o DNA é incorporado aos chamados "veículos de clonagem" que podem ser plasmídios (DNA extracromossomal), ou bacteriófagos. Pelo processo de transformação genética, o DNA estranho é incorporado à célula hospedeira, onde poderá se expressar (Knopf 1983), (Fig. 2).

Já a manipulação para o melhoramento, ao "nível celular", (Fig. 3) se baseia na totipotência da célula vegetal: células germinais, (o tecido germinal é aquele que irá dar origem às células reprodutivas) ou somáticas, cultivadas em meios artificiais (sólidos ou suspensões) adequados no que se refere às condições físicas (luz e temperatura

apropriadas) e químico-nutricionais (proporções corretas de sais, açúcares e hormônios), podem regenerar plantas viáveis e férteis. Esta tecnologia abriu perspectivas para a agricultura em áreas tão diversas como hibridação somática entre espécies distintas ou incompatíveis, mutação e seleção ao nível celular, utilizando a variação somaclonal, (ver item 3), clonagem de genótipos, preservação de germoplasma e melhoramento genético, através da cultura de anteras ou pólen, originando plantas haplóides. A cultura de tecidos, quando associada à tecnologia do DNA recombinante, permite o isolamento, a modificação e a transferência precisa e específica da expressão gênica. As aplicações práticas incluem a produção de compostos farmacêuticos, a limpeza viral, a multiplicação rápida de culturas de propagação demorada ou difícil, a seleção "in vitro" para resistência a patógenos ou suas toxinas, ou para tolerância a agroquímicos e a estresses ambientais variados, além do uso de haplóides através de cultura de anteras ou pólen, abreviando o tempo necessário para a obtenção de novas cultivares. Esta última técnica apresenta perspectivas muito promissoras para o arroz, o trigo, a cevada e o fumo (Riley et al. 1979, Foroughi-Wehr et al. 1982 e Wenzel 1980). O cultivo de embriões, obtidos de cruzamentos entre gerações segregantes de cultivares comerciais de cevada e a espécie selvagem *Hordeum bulbosum*, também origina plantas haplóides porque os cromossomos desta última são eliminados nas primeiras divisões celulares do embrião, o que já permite o uso eficiente desta técnica como recurso para acelerar o melhoramento da cevada (Kasha 1974) (Fig. 4).

Até recentemente, tinha sido possível para o homem praticar a Biotecnologia apenas em nível de "planta inteira". Neste nível, a criação da variabilidade para a seleção pelo melhorista pode ser obtida somente por mutação ou hibridação e a obtenção dos genótipos desejados se baseia em probabilidades. Mutagênicos químicos, radiações ionizantes

ou genes mutadores (como o sistema 5B do trigo descrito na Figura 5), são utilizados no primeiro caso (Sears 1972). No segundo, a variabilidade pode ser obtida por hibridações artificiais, tanto entre cultivares, combinando características úteis (melhoramento convencional), como entre espécies distintas: um exemplo do último caso é a ressíntese experimental do trigo hexaplóide, que foi efetuada por McFadden & Sears (1944), pela primeira vez, tornando disponíveis genes de outro modo inacessíveis ao melhoramento. A Figura 6 ilustra a obtenção de uma linhagem de trigo sintético (PF 834001), que expressa a resistência ao oídio (*Erysiphis graminis*) encontrada nas espécies afins usadas como genitoras no cruzamento original. A cultura do embrião híbrido, em meio artificial, permite sua sobrevivência, substituindo o endosperma que degenera. A linhagem assim obtida pode ser trabalhada do mesmo modo que as normalmente utilizadas pelo melhorista, sem necessidade de recursos de laboratório (Riley & Kimber, 1966).

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

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

A seleção natural também discrimina a planta inteira, do mesmo modo que o melhorista, por isto, a atuação do último, neste nível, nunca

poderá ser substituída. Entretanto, apesar do melhoramento depender, basicamente, do julgamento do melhorista, ele pode se apoiar em critérios objetivos, utilizando metodologias mais ou menos sofisticadas para minimizar os enganos que são inerentes à subjetividade humana.

Duvick (1983) considera que, embora "muitas das promessas da Biotecnologia possam também ser cumpridas pelo melhoramento convencional e de que outras sejam exequíveis apenas em um futuro distante", as perspectivas de aplicação imediata estão, em primeiro lugar, na Fitopatologia, permitindo a identificação de moléstias viróticas mais rápida e precisamente do que os anti-soros atuais, usando o cDNA ou DNA complementar, assim denominado por ser obtido a partir do RNA viral, e, em segundo, no Melhoramento, através de transformação genética de bactérias fixadoras de nitrogênio das leguminosas que podem ser adaptadas a outras culturas e pelo uso, em larga escala, de plantas homozigotas, através da indução da haploidia (ver item 2). Por outro lado, como é necessário o conhecimento da regulação de qualquer gene, antes que ele seja inserido e expresso na planta, "o progresso no conhecimento da biologia e da genética de nossas plantas cultivadas deverá ser considerável nos próximos anos". Neste trabalho, serão discutidas, com maiores detalhes, as implicações genéticas e as perspectivas, para o melhoramento, da cultura de tecidos. Revisões amplas dos assuntos aqui abordados podem ser encontradas em; Kasha 1974, Thomas et al. 1979, Sharp & Lansen et al. 1979, Riley et al. 1979, Sala et al. 1980, Thorpe 1981, Crocomo & Ochoa Alejo, 1983, Kosuge et al. 1983, Yeoman et al. 1980.

#### CULTURA DE TECIDOS E HAPLOIDIA NO MELHORAMENTO

Mutações de importância científica e econômica são difíceis de serem

detectadas em plantas diplóides ( $2n$  cromossomos) heterozigotas, principalmente, porque estas mutações são, em geral, recessivas. Entretanto, numa planta haplóide, que apresenta apenas a metade do patrimônio genético ( $n$  cromossomos), todas as mutações podem ser, rapidamente, detectadas, já que todos os genes estão em dose simples. Após a duplicação do número cromossômico, que pode ser espontânea ou induzida pela colchicina (alcalóide de origem vegetal, extraído de "*Colchicum autumnale*"), a homozigose é obtida imediatamente, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata, sendo, também, restaurada a fertilidade, pois a planta haplóide é estéril (Moraes Fernandes & Picard, 1983).

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

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

Nas angiospermas, a fase gametofítica ocorre logo após a meiose. O micrósporo sofre uma divisão mitótica assimétrica que dá origem ao grão de pólen com duas células desiguais: uma com um núcleo altamente

condensado (generativo) e outra, com um núcleo difuso (vegetativo). A primeira divide-se novamente, originando os dois gametas masculinos: um, fertilizará a oosfera e o outro, o endosperma.

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

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

A organização e as características da cromatina dos dois núcleos do grão de pólen mostram que o generativo condensado tem histonas em estado ativo de supressão da transcrição, enquanto o núcleo vegetativo difuso, com histonas ausentes ou em forma inativada ou estruturalmente alterada, permitiria a continuação da transcrição sob condições apropriadas, aceitando a reversão do desenvolvimento (Vasil et al. 1979).

As pesquisas, visando à ampliação do uso da cultura de anteras no melhoramento, têm sido realizadas através de dois enfoques principais: o fisiológico e o genotípico. No primeiro, é importante o conhecimento do papel das interações entre os componentes do meio de cultura,



principalmente hormonais, que "disparam" as divisões celulares morfogênicas, bem como os fatores que permitem a sobrevivência dos embriões e sua diferenciação correta. Este conhecimento é crítico para a melhora da eficiência dos trabalhos atualmente em andamento e para a utilização desta tecnologia no melhoramento de outras plantas cultivadas. No segundo caso, a identificação dos fatores genéticos, relacionados à "capacidade androgenética", que é a capacidade de um genótipo de formar embriões em meio de cultura e diferenciá-los originando plantas verdes viáveis, permite que seja efetuada seleção para disseminação desta característica nos blocos de cruzamento (Picard 1984, Fouroughi-Wehr et al. 1982, Moraes-Fernandes & Picard 1983, Schaeffer et al. 1979).

Diversos estudos, principalmente em cevada, mostram que a variabilidade obtida por cultura de anteras de plantas pertencentes à populações  $F_1$ ,  $F_2$  e  $F_3$ , é comparável, ou até superior, à variabilidade obtida por outros métodos como: "Single seed descent", "Bulk" ou "Pedigree", permitindo, portanto, o mesmo nível de discriminação para o melhorista (Friedt & Fouroughi-Wehr 1983). Choo et al. (1982), por exemplo, mostraram que ocorreram distribuições similares para rendimento, porte e precocidade quando linhagens duplo-haplóides, obtidas por cultura de anteras de cevada, foram comparadas com as obtidas por "Single seed descent".

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

Até recentemente, poucos pesquisadores, na área de cultura de células vegetais, se preocupavam com a análise detalhada das plantas regeneradas

ou consideravam a manipulação das células cultivadas dentro de um contexto genético. Como, para sua multiplicação, as plantas originadas a partir de células ou tecidos cultivados não passam pelo processo de reprodução sexual, a pressuposição de sua uniformidade genética está fora de qualquer dúvida, sendo admitidas apenas mutações ocasionais como eventuais fontes de variação. As mutações, entretanto, são eventos raros e a observação de variantes em frequências inesperadamente altas, nas linhagens obtidas por cultura, que foi denominada variação somaclonal, despertou grande interesse, pelas perspectivas de seu uso no melhoramento e pelo seu valor científico. Esta variação foi explicada, em alguns casos, como consequência de alterações dos números cromossômicos que são observados com frequência, nos tecidos cultivados em meios artificiais. Aneuploidia e poliploidia ocorrem, frequentemente, em somaclones de culturas como batata, arroz, cevada, sorgo, azevém, aveia e cebola; alterações na estrutura dos cromossomos (bandas c) foram observadas em culturas de fava. Mas, em outros casos, a natureza genética da variação continuava desconhecida (Larkin & Scowcroft 1983).

Na estação experimental havaiana dos plantadores de cana, na indústria do fumo e na floricultura, foi observado, pela primeira vez, o potencial da variação somaclonal. No entanto, os estudos mais detalhados deste tipo de variação foram efetuados em duplo-haplóides de fumo. O possível efeito mutagênico da colchicina foi eliminado para explicar a variação das linhas que, teoricamente, seriam totalmente homozigotas quando se verificou que duplo-haplóides espontâneos também mostraram heterogeneidade. Um segundo ciclo de cultura de anteras, a partir de duplo-haplóides, originou ainda variação adicional. Há sugestões de que os variantes seriam resultantes da fusão dos núcleos generativo e vegetativo do grão de pólen, os quais teriam diferenças epigenéticas, mas esta afirmação necessita de maiores investigações (De Paepe et al.

1981). Variações herdáveis foram descritas, também, em somaclones derivados de protoplastos de fumo, de nabo, de arroz, de milho e de trigo para resistência à doenças e herbicidas, respostas hormonais e caracteres agronômicos como número de grãos e peso de 1000 grãos. A variação somaclonal encontrada na batata por Shepard e seu grupo é descrita na Fig. 10. (Shepard 1981, Secor & Shepard 1981, Shepard et al. 1980).

Há, também, descrição de variação de origem citoplasmática em milho, originada pela perda de fragmentos do DNA mitocondrial, modificando a resposta à toxina do *Helminthosporium maydis* e recuperando a macho-fertilidade. Esta variação foi, matematicamente, transmitida. As investigações comprovam que a variação não era pré-existente e foi induzida pelas condições de cultura. Algumas mutações somaclonais são mais freqüentes como, por exemplo, folhas enroladas, resistência à hidroxiurea e ao herbicida picloram no fumo, e resistência à toxina do *Helminthosporium saccharum* na cana de açúcar (Larkin & Scowcroft 1983).

Verifica-se, pois, que o cultivo das células isoladas abre perspectivas para a manipulação de plantas como se fossem microrganismos, mostrando a possibilidade de seleção de genótipos a partir de populações de células em condições de cultivo onde ocorre uniformidade fisiológica e de desenvolvimento. No entanto, os esforços para selecionar mutantes obtidos "in vitro", através da variação somaclonal, mostraram que as células não se comportam como organismos unicelulares independentes, mas são componentes de sistemas de desenvolvimento altamente complexos (os tecidos e órgãos). Características agronômicas importantes como rendimento não são expressão do genótipo-celular, mas resultam da diferenciação de células, tecidos e órgãos que ocorre na planta inteira. Genótipos que expressam mutações favoráveis em meio de cultura, como resistência a herbicidas,

por exemplo, não o expressam sempre nas plantas daí regeneradas.

Uma interpretação (Chaleff 1983) sugere que, em contraste com as mutações genéticas que seriam mudanças do DNA ou cromossomo, as mutações epigenéticas refletiriam modificações na expressão gênica, caracterizando-se por estabilidade através das divisões mitóticas e por reversibilidade quando tivessem que atravessar os processos da meiose e da diferenciação. Seriam definidas pela capacidade de persistir após as divisões celulares que seguem a remoção das condições indutoras, mas não se expressariam nas plantas regeneradas ou na sua descendência sexual. No momento, a transmissão de um caráter após a reprodução sexual é o critério aceitável que distingue uma modificação genética de uma modificação epigenética. O fenômeno denominado "habituação" é que melhor explicaria a variação epigenética. A necessidade de suplementação exógena de hormônios como auxinas e citoquininas para células de fumo em cultura, por exemplo, pode ser perdida e as células se multiplicariam sem necessidade de adição de hormônios ao meio.

De acordo com revisão de Chaleff (1983) a resistência ao herbicida paraquat, em células de fumo, apresentou mecanismos de resistência variáveis. Em alguns casos, a resistência foi selecionada ao nível de célula via respiração mitocondrial. Outras culturas mostraram resistência de "calos", mas destas, apenas parte das plantas regeneradas foram resistentes ao herbicida no campo. Também no fumo a resistência ao herbicida picloram foi variável: em alguns casos, a resistência ocorreu apenas quando o herbicida foi adicionado ao meio, em outros, na germinação das sementes de plantas originadas de cultivo "in vitro" e, finalmente, houve casos em que ocorreu "in vitro" e a campo. Foi selecionada uma nova mutação estável no nível celular, e com alto grau de tolerância de planta inteira. Experimentos, cuidadosamente conduzidos, mostram que, em muitos casos, a restauração da necessidade de suplementação hormonal, em cultura de plantas regeneradas de células

"habitadas à ausência do hormônio", era uma reversão verdadeira, mantendo-se após a reprodução sexual. Tolerância ao frio e ao herbicida picloram mostraram o mesmo mecanismo. A característica mutada pode desaparecer em muitos casos, porque a diferenciação modifica a expressão do gene mutado. O papel das isozimas (formas múltiplas de enzimas que são codificadas por genes distintos, embora possuam atividade catalítica semelhante) seria importante para explicar estas situações. As várias formas de isozimas seriam sintetizadas em taxas diversas, em momentos distintos do desenvolvimento da planta. Estas mutações poderiam, também, estar ligadas a algum mecanismo disparado pelas condições da cultura ou, talvez, ao comportamento dos "genes saltadores", os quais, por efeito de posição, alteram a expressão de outros genes.

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

Protoplastos são células desprovidas de parede celular. Para sua obtenção é necessária a degradação da parede celular por enzimas específicas (celulase, pectinase), bem como combinações adequadas de pH, temperatura e a rápida colocação no meio de cultura. Neste meio, a adição de polietileno glicol favorece a fusão, permitindo a formação de células híbridas tanto homo como heterocarióticas (núcleos geneticamente semelhantes e distintos respectivamente). É possível a fusão de células de espécies distintas, mesmo daquelas distantemente relacionadas, em que a obtenção de híbridos por polinizações artificiais tem sido impossível (Vasil et al. 1979).

As limitações para a obtenção de híbridos entre espécies distantes se referem, principalmente, à ocorrência de eliminação seletiva de todos os

cromossomos de uma das espécies, à dificuldades na regeneração de plantas viáveis a partir da célula híbrida e a problemas de esterilidade das plantas híbridas de origem genética, que não podem ser superados com a duplicação dos cromossomos com colchicina. O sucesso destes trabalhos ficou, até o momento, limitado a Solanáceas (revisão em Evans & Flick 1983).

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

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

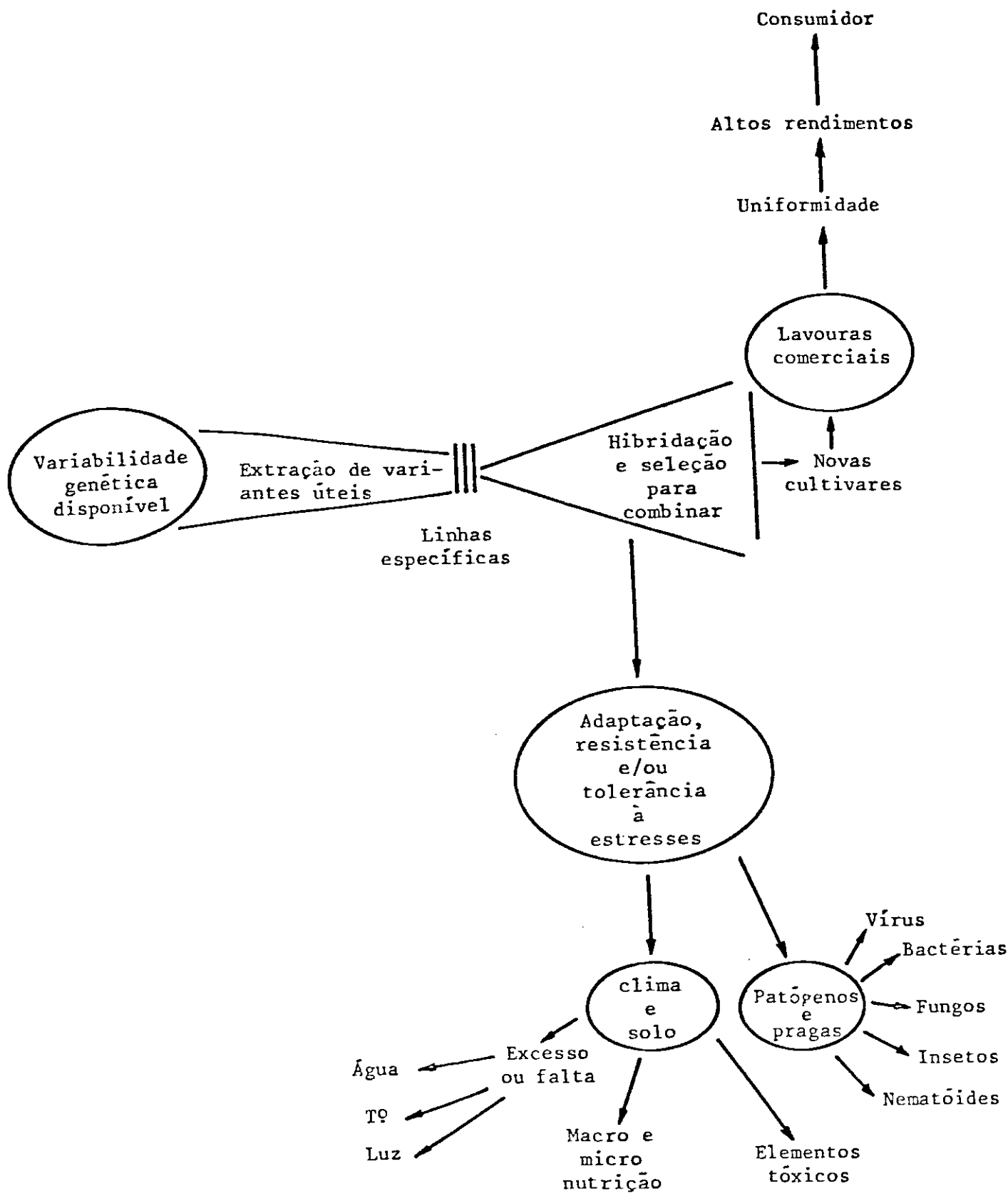


Fig. 1. Etapas principais do trabalho de melhoramento das plantas cultivadas.

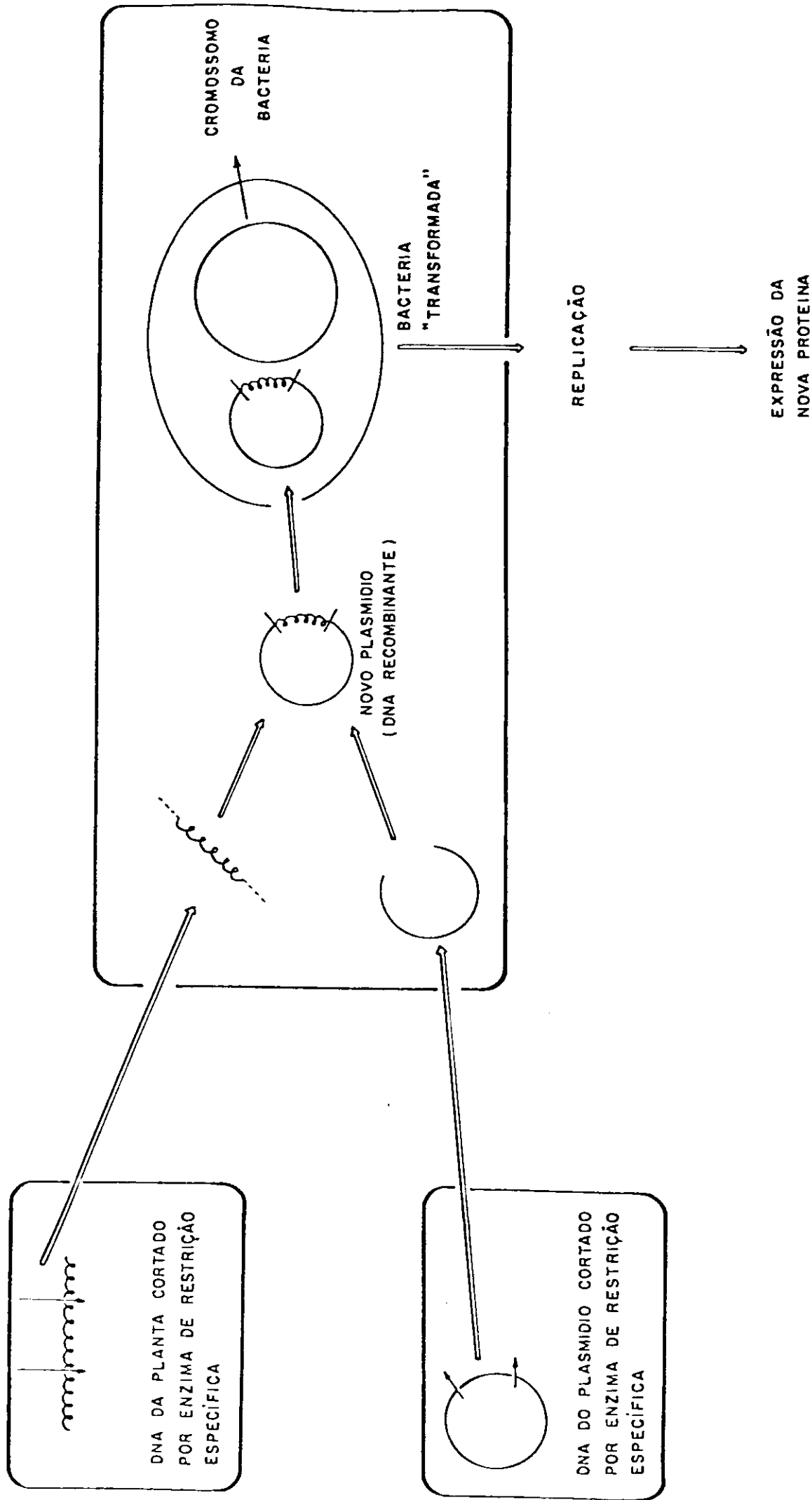


Figura 2. Biotecnologia no Nível Molecular: etapas da transformação genética de bactérias utilizando a tecnologia do DNA recombinante.



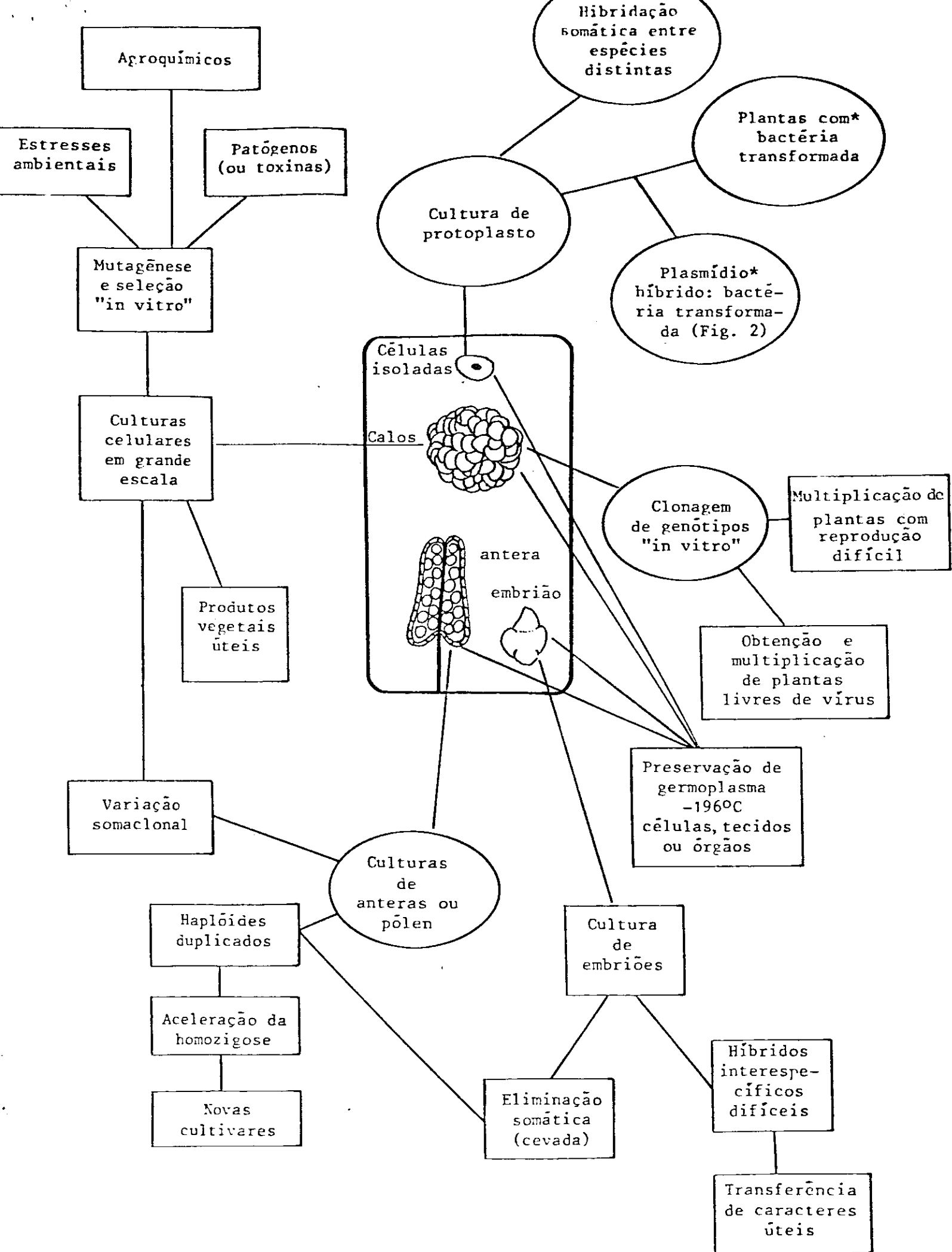


Figura 3. Biotecnologia ao nível das células: as possibilidades de aplicação da Biotecnologia em plantas através da cultura de protoplastos, células, tecidos ou órgãos associada ou não à tecnologia do DNA recombinante.

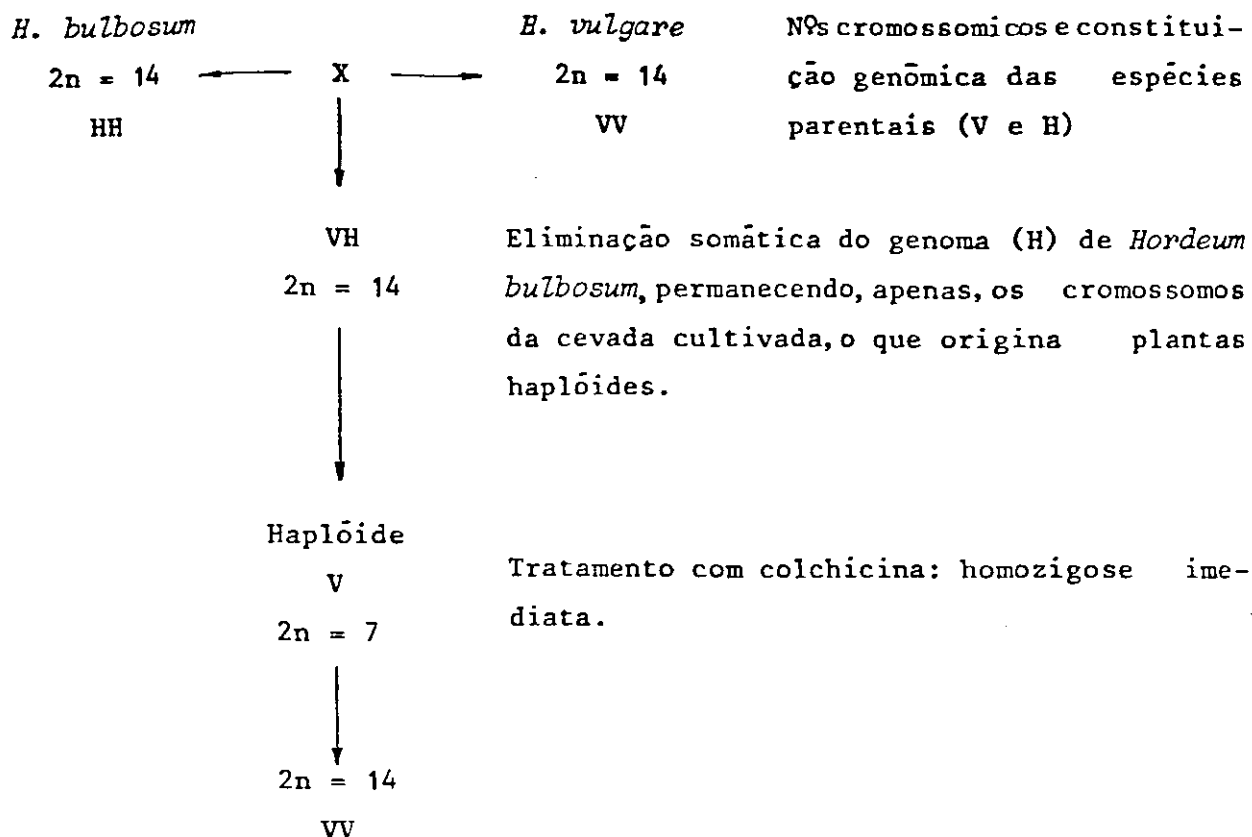
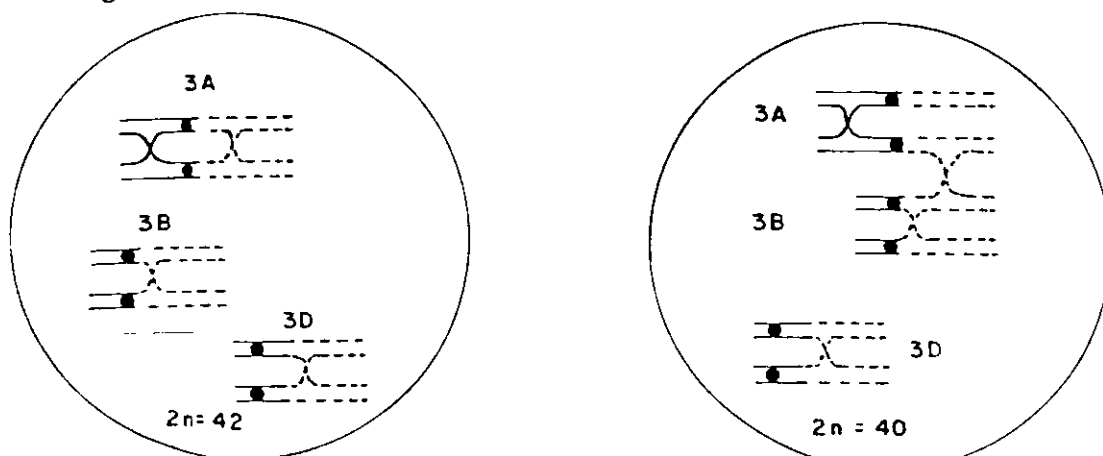


Fig. 4. O uso da hibridação interespecífica como método de obtenção de haploidia na cevada. Os embriões híbridos, cultivados em meio especial, regeneram plantinhas haplóides que, duplicadas com colchicina, originam linhas homozigotas imediatamente, simplificando o trabalho da avaliação do melhorista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

Fig. 5. A ausência do cromossomo 5 do genoma B do trigo faz com que todos os cromossomos, ao invés de se associarem, normalmente, aos pares, formem associações múltiplas, indicando a ocorrência de homologia parcial (homeologia) entre os diferentes genomas que constituem o trigo hexaplóide atual ( $2n = 42$ , AABBDD). O trigo atual tem 3 conjuntos de 7 pares de cromossomos, cada um de uma espécie ancestral. Apesar de formar, normalmente, 21 pares, quando o cromossomo 5 do genoma B está ausente, inúmeras associações múltiplas são formadas, permitindo recombinações não convencionais. Considera-se que o cromossomo 5B (seu braço longo) é portador de um gene ou complexo gênico que limita as associações aos pares estritamente homólogos, sendo crítico para a fertilidade do trigo, pois permite a segregação regular dos cromossomos e a produção de gametas balanceados. Por exemplo, na figura, está ilustrado o comportamento dos pares cromossômicos do trigo 3A, 3B e 3D, (os outros não estão representados) cada um originado de uma espécie ancestral, na presença e na ausência do cromossomo 5B. O mesmo pode acontecer com quaisquer conjuntos homeólogos.



(a) Células mães de pólen de plantas com o cromossomo 5B presente.

(b) Células mães de pólen de plantas com o cromossomo 5B ausente.

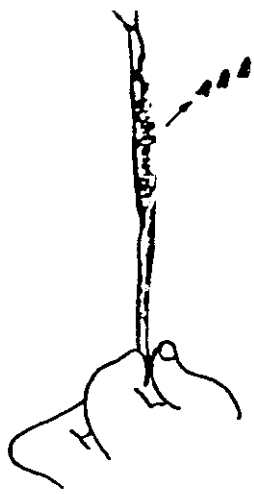
— Regiões não homólogas nos três pares.

-- Regiões ainda homólogas.

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

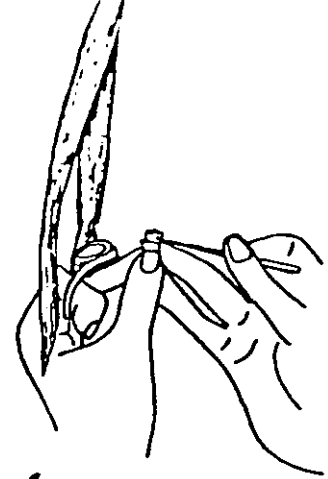
Quando o cromossomo 5B está ausente (b), o pareamento pode ocorrer entre cromossomos parcialmente homólogos, quaisquer (ex. 3A, 3B ou 3D) permitindo a translocação de segmentos sem necessitar recorrer ao uso da irradiação.

(M. Fernandes, M.I.B. 1985 - Ci. Hoje).

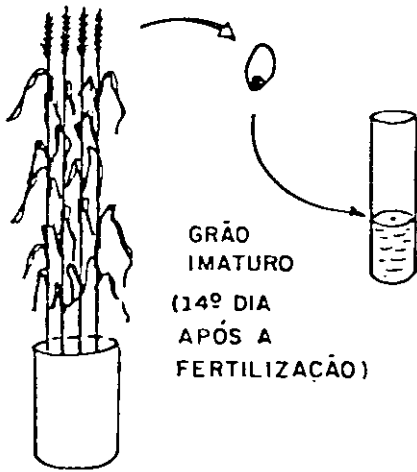


♀ *T. durum*  
 (V. Hercules  
 (NE 29912)  
 $2n = 4x = 28 - AABB$   
 EMASCULAÇÃO  
 (RETIRADA DAS ANTERAS  
 COM POLEN AINDA IMATURO)

X

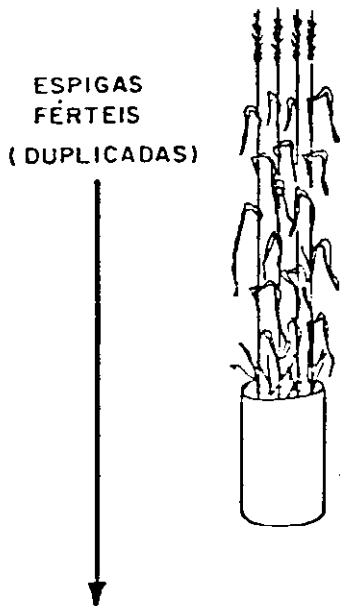


♂ *Aegilops squarrosa*  
 (NE 293421)  
 $2n = 2x = 14 - DD$   
 ANTERAS COM POLEN  
 MADURO SÃO COLOCADAS  
 SOBRE OS ESTIGMAS DE  
 OVÁRIOS RECEPTIVOS NA  
 PLANTA MÃE  
 (POLINIZAÇÃO ARTIFICIAL)



O EMBRIÃO  
 É TRANSFERIDO  
 PARA MEIO  
 DE CULTURA

CULTURA EMBRIÃO  
 PLANTA HÍBRIDA



TRATAMENTO  
 COM COLCHICINA



CONTAGEM DE  
 CROMOSSOMOS



PLANTA  
 VERDE

( $2n = 21$ )  
 ABD

$2n = 42 (AABBDD) - PF 834001$

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

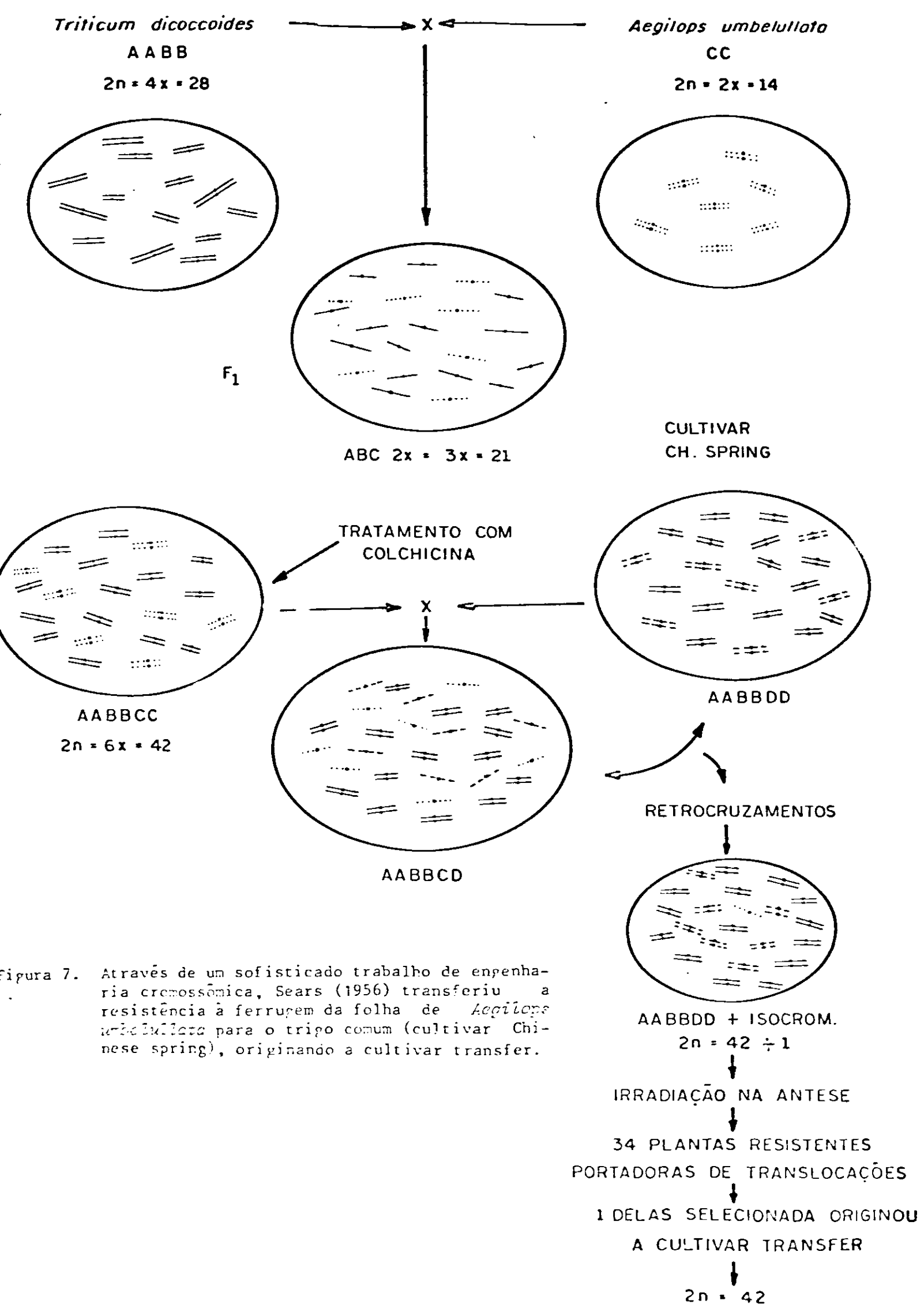


Figura 7. Através de um sofisticado trabalho de engenharia cromossômica, Sears (1956) transferiu a resistência à ferrugem da folha de *Aegilops umbellulata* para o trigo comum (cultivar Chinese spring), originando a cultivar transfer.







DESENVOLVIMENTO NORMAL DO PÓLEN

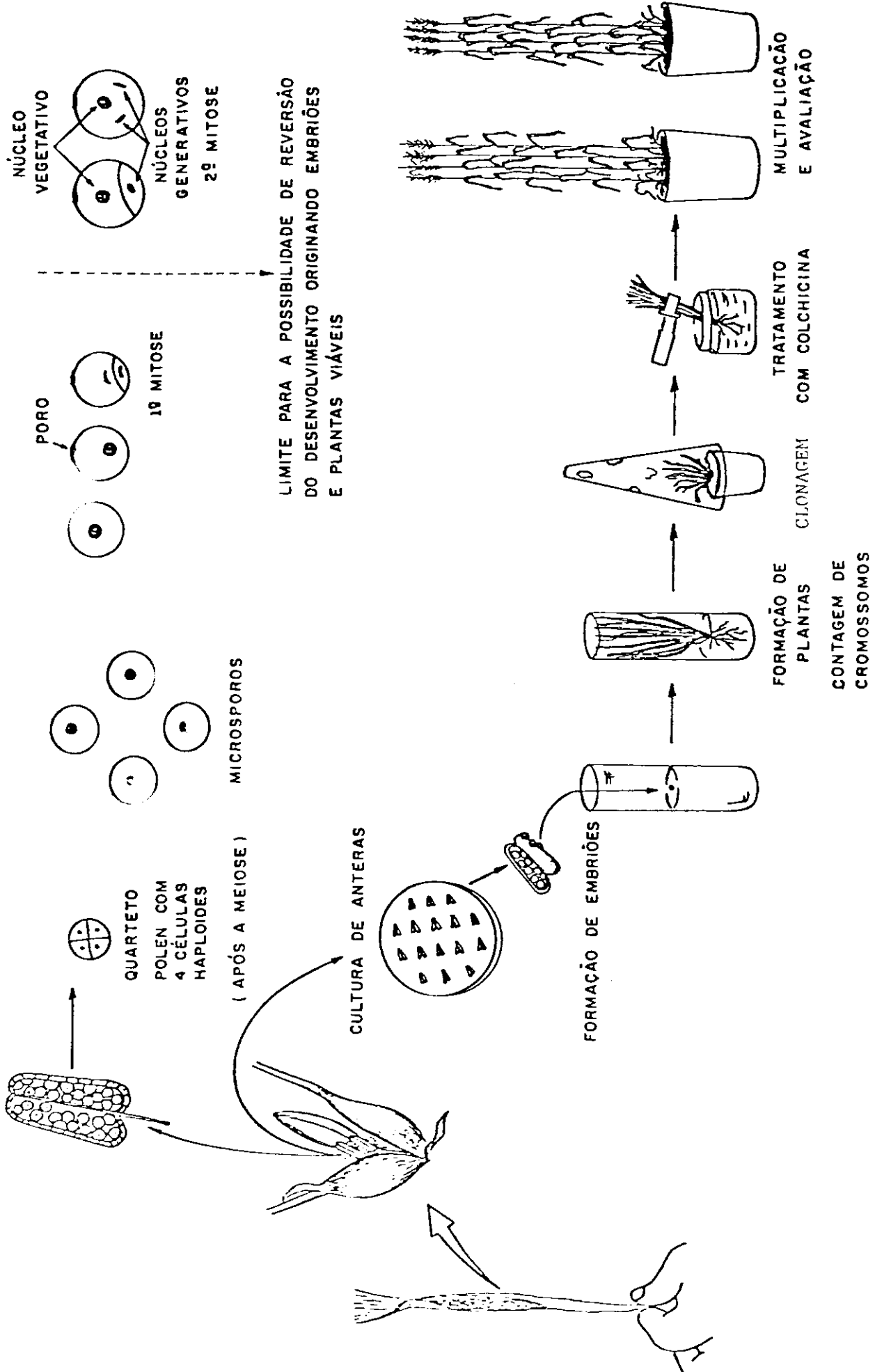


Figura 9. Cultura de anteras em trigo para obtenção de plantas haploides.

BATATA (CULTIVAR RUSSET BURBANK; ESTÉRIL)

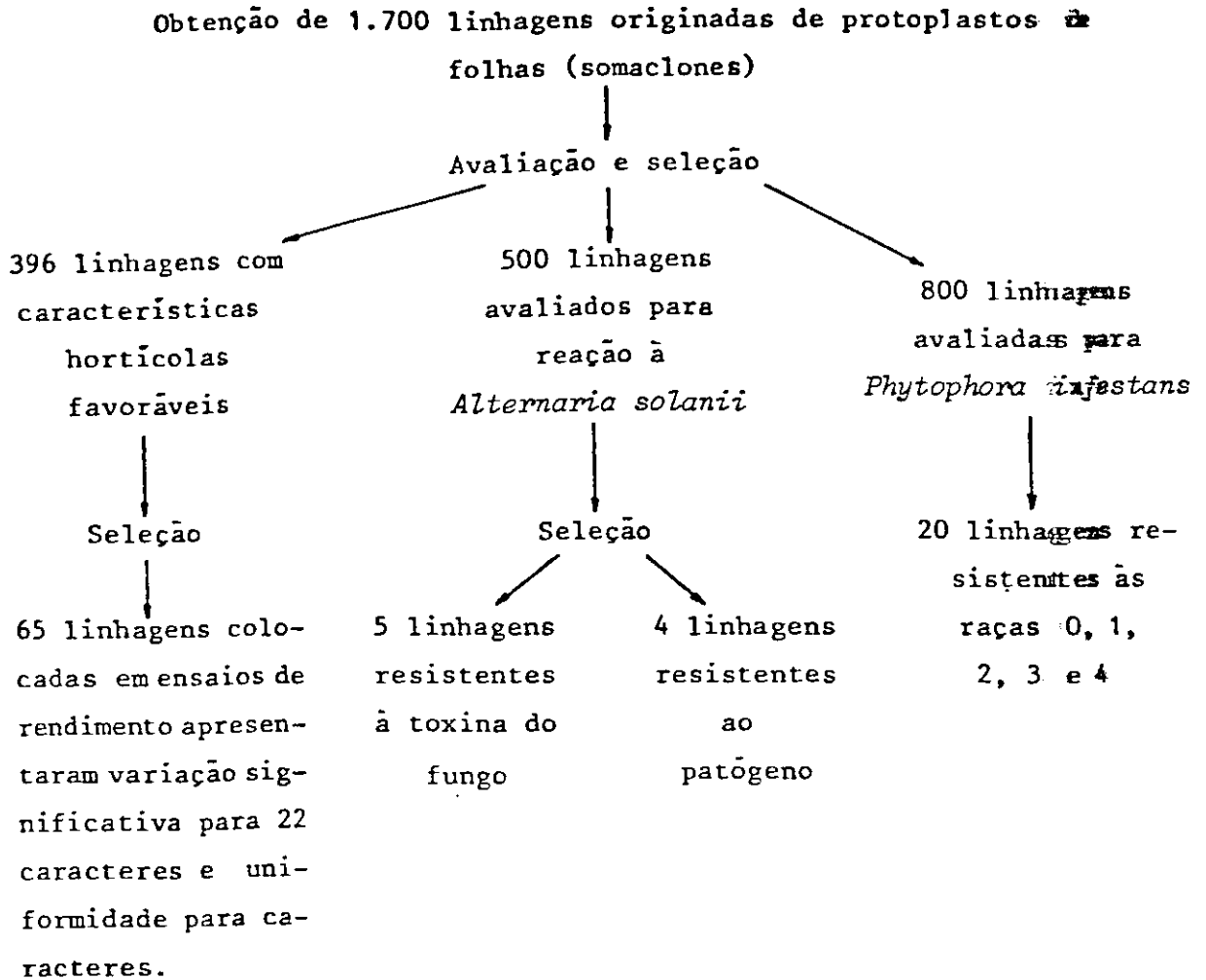


Fig. 10. Resultados obtidos por Sheppard e seu grupo, evidenciando ocorrência de variação somaclonal na batata. a

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHALEFF, R.S. Considerations of developmental biology the plant cell geneticist. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A. eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. p.157-70.
- CHOO, T.M.; REINBERGS, E. & PARK, S.J. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, 61:215-8, 1982.
- CROCOMO, O.J. & OCHOA-ALEJO, N. The potential contribution on cell and plant tissue culture to crop improvement. In: SHEMILT, L.W., ed. *Chemistry and world food supplies: the new frontiers (CHEMRAWN II)*. s.l., Pergamon Press, 1983. p.607-19.
- DE PAEPE, R.; BLETON, E. & GNANGBE, F. Basis and extent of genetic variability among double haploid plants obtained by pollen culture in *Nicotiana sylvestris* *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, 59:177-84, 1981.
- DUVICK, D.N. Round table discussion on research priorities. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. p.482-4.
- EVANS, D.A. & FLICK, C.E. Protoplast fusion: agricultural applications of somatic hybrid plants. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. p.271-88.
- FOROUGHI-WEHR, B.; FRIEDT, W. & WENZEL, G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, 62:233-9, 1982.
- FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMANN, N.L. & WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natt. Acad. Sci.*, Washington, 80:4803-7, 1983.

- FRIEDT, W. & FROUGHI-WEHR, B. Field performance of androgenetic double haploid spring barley from F<sub>1</sub> hybrids. *Z. Pflanzenzüchtg.*, Berlin, 90:177-84, 1983.
- KASHA, K.J., Haploids from somatic cells. In: Kasha, K.J. ed. *Haploids in higher plants; advances and potential: proceedings*. Guelph, University of Guelph, 1974. 421p.
- KNOFF, V.C. Practical aspects of biogenetic engineering in crops. *Outlook Agric.*, Oxford, 12(2):50-6, 1983.
- KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. 499p.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation and crop improvement. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. p.283-314.
- McFADDEN, E.S. & SEARS, E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.*, Washington, 37:81-9, 107-16, 1944.
- MASCARENHAS, J.P. RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth. In: HESLOP-HARRISSON, J., ed, *Pollen; development and physiology*. London, Butterworth, 1971. p.201-22.
- MIL, M. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, Berlin, 80:206-14, 1976.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. de & PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using brazilian wheat genotypes. *R. Bras. Genet.*, Ribeirão Preto, 6(2):261-77, 1983.
- PICARD, E. Contribution a l'etude de l'heredite et de l'utilisation en selection de l'haploïdiploidisation par androgenase in vitro chez une cereale autogame: *Triticum aestivum* L. Paris, Universite de Paris - SUD, 1984. 269p. Tese Doutorado.

- RILEY, R.; HERMSEN, J.G.T.; LIE, T.A.; MULDER., E.G.; MIEDEMA, P.; GELDER, W.M. J. van; COCKING, E.C.; POWER, J.B. & SCHILPEROORT, R.A. Methods for the future. In: SNEEP, J.; HENDRIKSEN, A.J.T. & HOLBEK, O., eds. Plant breeding perspectives. Wageningen, PUDOC, 1979. p.321-69.
- RILEY, R. & KIMBER, G. The transfer of alien genetic variation to wheat. Report of the Plant Breeding Institute (1964-5), Cambridge, 1966. p.6-36.
- SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O., eds. Plant cell cultures: results and perspectives; proceedings. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. 433p. (Developments in Plant Biology, 5).
- SCHAEFFER, G.W., BAENZIGER, P.S. & WORLEY, J. Haploid plant development from anthers and "in vitro" embryo culture of wheat. *Crop Sci.*, Madison, 19:697-702, 1979.
- SEARS, E.R. Chromosome engineering in wheat. In: STADLER SYMP., 4,, Columbia, 1972. p.23-8.
- SEARS, E.R. Transfer of genes from wild relatives to wheat. *Genetics*, 1(5):107-120. 1965.
- SEARS, E.R. The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brokhaven Symposia in Biology*, 9:1-22, 1956.
- SECOR, G. & SHEPAERD, J.F. Variability of protoplast-derived potato clones. *Crop Sci.*, Madison, 21:102-5, 1981.
- SHARP, W.R. & LARSEN, P.O. Plant cell and tissue culture: current applications and potential. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F. & RAGHAVAN, V. Plant cell and tissue culture; principles and applications. Columbus, Ohio State University Press, 1979. p.115-20.
- SHEPAERD, J.F. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 19:145-66, 1981.

- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D. & SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, Washington, 208:17-24, 1980.
- SIMMONDS, N.W. Plant breeding: the state of the art. In: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P. & HOLLAENDER, A., eds. *Genetic engineering of plants; an agricultural perspective*. New York, Plenum Press, 1983. p.5-25.
- THOMAS, E.; KING, P.J. & POTRYKUS, I. Improvement of crop plants via single cells *in vitro* - an assessment. *Z. Pflanzenzüchtg*, Berlin, 82: 1-30, 1979.
- THORPE, T.A., ed. *Plant tissue culture; methods and applications in agriculture* - New York, Academic Press, 1981. 379p.
- VASIL, I.K. The new biology of pollen. *Naturwissenschaften*, 60:247-53. 1973.
- VASIL, I.K.; AHUJA, M.R. & VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genet.*, New York, 20:127-215, 1979.
- WENZEL, G. The potential and limits of classical genetics in plant breeding. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O., eds. *Plant cell cultures results and perspectives; proceedings*. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. p.33-48.
- YEOMAN, M.M.; MIEDZYBRODZKA, M.B.; LINDSEY, K. & McLAUHLAN, W.R. The synthetic potential of cultured plant cell. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R. & CIFERRI, O., eds. *Plant cell cultures: results and perspectives; proceedings*. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. p.327-43.