

# VII REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

## PROGRAMA E RESUMOS

JV  
4p  
4

2004.00621

Programa e resumos...

1994

PC-2004.00621

ALVES, RS



27835-1

de maio de 1994

**VII REUNIÃO ESTADUAL DE  
BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**PROGRAMA  
E  
RESUMOS**

**BENTO GONÇALVES, RS**

**19 e 20 de maio de 1994**

**Emprego**

Unidade: Ai-Sede  
Valor aquisição: \_\_\_\_\_  
Data aquisição: 02/09/04  
N.º N. Fiscal/Fatura: \_\_\_\_\_  
Fornecedor: \_\_\_\_\_  
N.º OCS: \_\_\_\_\_  
Origem: Doação  
N.º Registro: 621/04

**PROMOÇÃO**

**Grupo Integrado de Biotecnologia Vegetal  
do Rio Grande do Sul**

**APOIO**

**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande  
do Sul- FAPERGS**

**EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho**



**COMISSÃO ORGANIZADORA**

Elcí Terezinha Henz Franco

José Antonio Peters

Magali Ferrari Grandó

Maria Helena Bodanese Zanettini

Paulo Ricardo Dias de Oliveira



## APRESENTAÇÃO

O Grupo Integrado de Biotecnologia Vegetal do RS foi criado em 1988 pela iniciativa de alguns pesquisadores da área de Biotecnologia Vegetal, com o estímulo e apoio decisivos da FAPERGS e da Secretaria de Ciência e Tecnologia do RS. Ao grupo inicialmente formado, foram agregando-se outros laboratórios interessados em desenvolver pesquisas na área. Atualmente participam do Programa Integrado de Biotecnologia Vegetal do RS quinze laboratórios vinculados a diferentes instituições de ensino e pesquisa. Os projetos em desenvolvimento nestes laboratórios utilizam diferentes abordagens biotecnológicas (ao nível celular e molecular), abrangendo inúmeras espécies de importância econômica para o Estado.

Encontros anuais têm sido organizados com o objetivo de favorecer o efetivo intercâmbio entre as diferentes equipes de pesquisa. Em consequência do grande interesse despertado por estes encontros e dos resultados palpáveis em termos de avanço nas pesquisas, decidimos, neste ano, além do espaço reservado para a troca de experiências, programar a participação de especialistas para abordar temas relevantes à biotecnologia vegetal.

A Comissão Organizadora



# **PROGRAMA**



## VII REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

### 19.05.94 - Quinta-feira

- 13:30 h - Abertura
- 13:45 h - Apresentação de painéis
- 15:30 h - Reunião em subgrupos (por técnica utilizada)
- 17:15 h - Intervalo
- 17:30 h - Reunião do grande grupo (discussão dos temas abordados nos subgrupos)
- 19:00 h - Encerramento/Coquetel

### 20.05.94 - Sexta-feira

- 8:30 h - Palestra "Cultura de tecidos: interação entre reguladores de crescimento e competência celular" - Dr. Gilberto B. Kerbauy (Dep. de Botânica - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)
- 9:45 h - Intervalo
- 10:00 h - Mesa-redonda: "Biotecnologia x Melhoramento Vegetal"  
Coordenadora: Dra. Maria Helena Zanettini  
Participantes: Dr. Miguel P. Guerra (Departamento de Fitotecnia - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina)  
Dr. Rubens O. Nodari (Departamento de Fitotecnia - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina)  
Dr. Luiz Carlos Federizzi (Departamento de Plantas de Lavoura - Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul)  
Dra. Maria Irene B.M. Fernandes (Centro Nacional de Pesquisa de Trigo-CNPT/EMBRAPA)
- 12:00 h - Almoço
- 14:00 h - Reunião Plenária
- 16:00 h - Encerramento



## **ÍNDICE DOS RESUMOS**



**PALESTRA:**

Cultura de tecidos: interação entre reguladores de crescimento e competência celular GILBERTO BARBANTE KERBAUY (USP) .....	19
---	----

**MESA-REDONDA: Biotecnologia x Melhoramento Vegetal**

Biotecnologia no melhoramento genético de plantas LUIZ CARLOS FEDERIZZI (UFRGS) .....	23
Biotecnologia & melhoramento vegetal & ética MARIA IRENE B. MORAES FERNANDES (EMBRAPA-CNPT) .....	25
Sistemas morfo genéticos <i>in vitro</i> e suas aplicações para o melhoramento de plantas MIGUEL PEDRO GUERRA (UFSC) .....	28
Implicações das modernas biotecnologias no melhoramento de plantas RUBENS ONOFRE NODARI (UFSC) .....	31

**PAINÉIS:**

Técnicas de biologia celular e molecular como apoio ao melhoramento de cereais de inverno no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo .....	37
Atividades de pesquisa em desenvolvimento no laboratório de cultura de tecidos do Dep. de Fitotecnia da UFSM .....	39
Organogênese <i>in vitro</i> de plantas .....	41
Estudo de proteínas relacionadas à patogênese (.PRs) em cultivares brasileiras de trigo .....	42
Cultura de tecidos e transferência de genes em soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) .....	43
Genética, cultura de tecidos e transferência de DNA em cevada .....	45
Programação do laboratório de cultura de tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT/EMBRAPA) .....	47
Cultura <i>in vitro</i> de feijão comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	48
Obtenção de duplo-haplóides de arroz irrigado ( <i>Oryza sativa</i> L.) através da cultura de anteras.....	49

## VII REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

	Página
Micropropagação de espécies hortícolas .....	51
Indução de calos a partir de embriões imaturos de diferentes cultivares de aveia ( <i>Avena sativa</i> L.) .....	52
Obtenção de plantas haplóides de aveia ( <i>Avena sativa</i> ) via cruzamentos intergenéricos .....	53
Genética da regeneração de plantas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....	55
Uso de filtrados tóxicos para avaliar a resistência ao fungo <i>Helminthosporium sativum</i> em trigos hexaplóides <i>in vitro</i> ....	56
Herança da resistência a filtrados tóxicos de <i>Helminthosporium sativum</i> em culturas <i>in vitro</i> de trigo hexaplóide .....	57
Embriogênese somática em aspargo .....	58
Cultura de anteras em arroz e aspargo .....	59
Micropropagação de espécies lenhosas .....	61
Transformação genética de plantas .....	63
Principais atividades desenvolvidas no laboratório de cultura de tecidos da EMBRAPA-CNPUV .....	64
Cultura <i>in vitro</i> de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) .....	66
Cultura <i>in vitro</i> de leguminosas .....	67
Cultura de tecidos vegetais em aveia, batata, tomate e morango na Faculdade de Agronomia da UFP .....	69
Protoplastos de maçã .....	71
Protoplastos de olerícolas .....	73
Citologia de plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	75
Produção de demetoxitabernulosina em cultura de células de <i>Rauwolfia sellowii</i> Müll Arg. ....	77
Quantificação de pilocarpina em culturas de células de <i>Pilocarpus pennatifolius</i> .....	79

**PALESTRA**



## CULTURA DE TECIDOS: INTERAÇÃO ENTRE REGULADORES DE CRESCIMENTO E COMPETÊNCIA CELULAR

Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy<sup>1</sup>

O estado de imobilidade dos vegetais tem sido interpretado como consequência da capacidade de fotossintetizar. Nesta situação, as plantas desenvolveram estratégias que possibilitaram minimizar situações ambientais adversas, e maximizar as condições favoráveis. Ao nível de desenvolvimento, as principais estratégias conhecidas envolvem: 1) a manutenção de células em um estado não especializado, e 2) o controle do desenvolvimento por meio de meristemas apicais caulinares e radiculares. A presença destes meristemas, em processo contínuo de divisão e diferenciação celular, resulta em um sistema de desenvolvimento aberto, portanto recorrente, ao contrário dos animais, representado por um sistema fechado. Sob este enfoque, as folhas, flores e frutos são órgãos cujo desenvolvimento mais se aproximam dos animais.

Conhecem-se cinco grupos de substâncias promotoras de crescimento e centenas de respostas de desenvolvimento. A presença de receptores específicos (proteínas) complexadas com o hormônio, dependendo da célula alvo, desencadeia respostas diferentes.

Células com competência para responder de forma específica a um sinal hormonal são normalmente encontradas nas plantas, podendo-se destacar a título de exemplo, aquelas da camada de aleurona (giberilina), do periciclo (auxina) e da camada de abscisão das folhas (etileno). Experimentos realizados sob condições *in vitro* tem evidenciado de forma intensa, que a divisão celular resultaria na "desdiferenciação" de células maduras, a qual, de alguma forma, implicaria na aquisição do estado de competência. Conhecem-se entretanto, casos no quais mesmo induzidas a se dividir, as células mantinham certas características do estado diferenciado inicial (desdiferenciação incompleta).

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

As células alvos (competentes), sofrendo o processo de indução por um sinal específico, tornam-se determinadas (comprometidas) para uma rota de desenvolvimento também específico. O estado determinado é reconhecidamente estável, podendo ser transmitido através de divisões mitóticas sucessivas por várias gerações de células ("herança somática"). Nos eventos regenerativos, as células no estado determinado sofrendo o processo de diferenciação celular, originam um primórdio de gema ou raiz. Uma vez uma célula (ou grupo de células) ter sofrido o processo de determinação, elas não mais seriam susceptíveis a outros sinais indutores. A estabilidade do estado determinado pode ser detectada de forma proeminente na ocorrência, por exemplo, da fase juvenil e reprodutiva em plantas arbóreas ("phase change") e na indução precoce da floração (vernalização) em embriões de centeio. Nestes casos, a determinação do estado reprodutivo é perdida na formação dos gametas. Em calos de tabaco habituados (autônomos) para citocininas, este estado de determinação é perdido na formação das gemas adventícias, tornando os tecidos das plantas regeneradas dependentes de citocininas exógenas quando cultivados *in vitro*.

A estabilidade estrutural e funcional dos meristemas apicais (caulinares e radiculares), tem sido interpretada sob duas hipóteses alternativas. Conforme uma delas, os meristemas seriam "hereditariamente" programados, constituídos por células verdadeiramente especializadas. A outra interpretação é de que os meristemas seriam representados por células não comprometidas com rotas específicas de desenvolvimento, sendo por conseguinte regulados pelas células maduras, total ou parcialmente diferenciadas.

**MESA-REDONDA**

**BIOTECNOLOGIA x MELHORAMENTO VEGETAL**



## A BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Luiz Carlos Federizzi<sup>1</sup>

O melhoramento genético é a arte e a ciência de modificar geneticamente as plantas em benefício do homem. As principais etapas de um programa de melhoramento são: incremento da variabilidade genética, seleção (ajuste do genótipo ao ambiente), testes regionais, aumento da quantidade de semente e uso pelos agricultores.

As biotecnologias modernas podem tornar os programas de melhoramento genético mais ágeis e eficientes, especialmente no aumento da variabilidade genética disponível e na seleção dos melhores genótipos, eliminando desta forma as inconsistências do fenótipo. Das presentes técnicas utilizadas: cultura de células e tecidos, seleção *in vitro*, uso de marcadores moleculares, fusão de protoplasma e DNA recombinante todas apresentam potencial de uso nos programas de melhoramento genético de plantas e suas principais vantagens e limitações foram discutidas.

A escolha dos genótipos a serem utilizados é de fundamental importância, porque as variedades ficam em média somente cinco anos em cultivo. A escolha e uso de genótipos ultrapassados é uma das principais causas do fracasso de muitos programas de biotecnologia vegetal. A escolha de genótipos promissores ainda em testes, só é possível com o auxílio de um melhorista da espécie, e programas de biotecnologia vegetal dissociados de um programa de melhoramento forte estão destinados ao fracasso.

As técnicas biotecnológicas são um meio e não um fim e algumas serão rotina nos programas de melhoramento genético de plantas do futuro. A interação de biotecnologistas e melhoristas será extremamente benéfica se os primeiros entenderem quais são as características e necessidades dos programas de melhoramento e os segundos compreenderem que as técnicas biotecnológicas são úteis para a resolução

<sup>1</sup> Depto. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia/UFRGS

de problemas comuns do melhoramento (novas soluções para problemas velhos).

Finalmente que os genes de interesse de todos sejam aqueles que possam representar ganhos reais ao País (criar nossa própria biotecnologia), e não cópias imperfeitas de trabalhos sendo executados no exterior, colaborando para aumentar ainda mais nossa dependência externa.

## BIOTECNOLOGIA & MELHORAMENTO VEGETAL & ÉTICA

Maria Irene B. Moraes Fernandes<sup>1</sup>

No momento de selecionar, nas gerações segregantes resultantes de seus cruzamentos, plantas de produtividade superior, mais bem adaptadas ao agroecossistema, de melhor qualidade e de maior sanidade, o melhorista deve associar ao conhecimento científico das várias disciplinas ligadas à planta e ao ambiente, como a genética, a fisiologia, a botânica, a fertilidade do solo e a climatologia, uma visão coerente dos aspectos econômicos, aliada à consciência de sua responsabilidade social.

O melhorista pratica ciência quando usa ou gera conhecimentos nas disciplinas de apoio, mas também pratica arte, porque necessita de usar uma aptidão que não é definida claramente por padrões objetivos: a "sensibilidade ou intuição" que auxilia a preencher requisitos ainda não descobertos pelo conhecimento científico, quando mentaliza o idiótipo mais adequado a ser criado através da reestruturação do genótipo.

Os resultados do trabalho do melhorista são evidenciados apenas a longo prazo. Entre a escolha dos genitores de um cruzamento, no caso da cultura do trigo, por exemplo, até a utilização de uma cultivar pelo agricultor, há um período de cerca de 12 anos de atividades de pesquisa e experimentação.

Em virtude das inúmeras decepções quanto à performance de genótipos aparentemente promissores, os melhoristas são, de modo geral, céticos quanto a novidades.

A Biotecnologia é uma novidade que tem recebido grande publicidade, principalmente por causa da expectativa de impacto econômico. Entretanto, o progresso que virá como resultado do uso das novas metodologias da Biologia Celular e Molecular, aumentando a compreensão da Biologia, da Genética, da Fisiologia e da Bioquímica das plantas úteis, é considerado por muitos autores, como o maior e mais

---

<sup>1</sup> Pesquisadora do CNPT/EMBRAPA

imediatos benefícios dos investimentos nas novas tecnologias.

Por outro lado, para cada espécie cultivada, o enfoque biotecnológico somente permitirá abordagens úteis para a agricultura se aliar, à noção realista da problemática agrícola, o conhecimento da biologia de planta e de seu sistema genético (Moraes-Fernandes, 1989).

As expectativas e os resultados já obtidos através das novas tecnologias biológicas, no que se refere ao melhoramento, mostram a importância da interação biólogo-agrônomo para o futuro da agricultura brasileira.

A interação multidisciplinar, no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, envolvendo a Biologia Celular, a Biologia Molecular e diversas áreas da Pesquisa Agronômica teve início formal em 1975, com a criação do laboratório de Citogenética para apoiar o melhoramento através do estudo da relação entre a instabilidade meiótica e a desuniformidade varietal. Em 1978, foi introduzida a cultura de embriões híbridos imaturos que, associada à citogenética, deu suporte à transferência de resistência às moléculas fúngicas de espécies afins. Em 1980, a cultura de anteras permitiu a produção de linhagens duplohaplóides. Em 1983, estudos de biologia celular permitiram aumentar o conhecimento a respeito da genética da tolerância à acidez do solo. A partir de 1990, foram introduzidas as técnicas de Biologia Molecular através do uso da eletroforese como apoio à seleção para qualidade de panificação. Em 1993, teve início o cultivo de células em suspensão, visando a seleção *in vitro*. A interação entre biólogos e agrônomos das Áreas de Melhoramento, de Fitopatologia, de Solos e de Fisiologia foi se intensificando ao longo dos 19 anos de existência do laboratório.

O enfoque multidisciplinar obtido pelo Programa Integrado de Biotecnologia Vegetal, iniciado em 1987, e o crescimento do grupo nesses poucos anos, mostra a necessidade de interação sentida em todas as instituições que atuam no ensino e na pesquisa bioagronômica, no Estado. A continuidade dessa interação é fundamental e novas questões resultantes da crescente importância das novas tecnologias biológicas no melhoramento, devem ser trazidas à discussão, no futuro, entre as quais: Como abordar a crescente interface entre a iniciativa privada e o serviço público? Quais os padrões de conduta do cientista quanto à ética e a tecnogenia? Assim como a iatrogenia trata dos efeitos negativos da prática médica, a tecnogenia trata dos efeitos negativos da tecnologia, entre os quais, especialmente dramático tem

sido o uso dos químicos na agronomia e na veterinária. (Eguiazu, 1988). Este autor coloca que, "a ciência, por ser reducionista, deforma a visão de mundo do cientista, ao exigir a abstenção de muitos fatores na condução de um experimento: entre estes, é abstraído o fator ético ou moral... a ciência experimental, ao se converter em valor supremo ou fórmula mágica, desenvolve, em muitos cientistas, uma grande arrogância, ser senhor da natureza e submetê-la à sua vontade (Galileu), que é extrapolada para os valores éticos. A tecnogenia é o mais duro golpe sobre a arrogância do cientista e do técnico".

Na abertura de um simpósio sobre Biotecnologia, ocorrido na Suécia, foram considerados de extrema importância a avaliação e o acompanhamento dos efeitos das mudanças em andamento no mundo científico e na sociedade. Foi enfatizado que... "a ciência deixou de ser uma atividade artesanal de grafitação romântica para se transformar numa atividade empresarial hipotético-dedutiva, primeiro na física e na química e, depois, na biologia, levando à BIOLOGILIZAÇÃO cada vez maior, na medicina e na agronomia" (Norrby, 1990). O autor considera que "um equilíbrio deve ser obtido entre as vantagens e desvantagens de cada aplicação particular da tecnologia genética. As discussões devem ser permanentes para que usos irrealísticos, cenários imaginários e extrapolações superespeculativas sejam evitados" ... declarando-se "um biólogo otimista, ao invés de um ecólogo pessimista, acredita firmemente na discussão aberta como a única abordagem para avaliar o complexo dos problemas éticos precipitados pela emergência da nova biologia".

### Bibliografia

- EGUIAZU, G.M. Plaguicidas y error tecnogenicos. Rosario, FAC/UNR, 1988. 30p. Trabalho apresentado no Primer Congreso Internacional de Ecotoxicologia, Buenos Aires, 1988.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Relações com o melhoramento agrônômico. Simpósio: Genética e Sociedade do Rio Grande do Sul. VII Encontro de Geneticistas do RGS. Porto Alegre. Anais (73-75). 1989.
- NORRBY, E. Introduction: the age of reason or of treason? In: INTERNATIONAL CONFERENCE/1990/Sweden. Advances in biotechnology; proceedings. Sweden, Swedish Council for Forestry and Agricultural Research, 1990. p.5-11.

## SISTEMAS MORFOGENÉTICOS "IN VITRO" E SUAS APLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS

Miguel P. Guerra<sup>1</sup>

Novas estratégias para a propagação clonal, para a fixação de ganhos genéticos e novas abordagens para gerar variação genética são requisitos fundamentais para o melhoramento de plantas.

O maior benefício da propagação clonal para o melhoramento de plantas perenes, refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética. Desta maneira técnicas de cultura de tecidos, órgãos e células vegetais, baseadas que são na totipotencialidade de explantes, podem se tornar ferramentas poderosas para a propagação massal de genótipos superiores.

Processos regenerativos que levam à propagação clonal podem ser obtidos por três maneiras (Sinnot, 1960): i) reconstituição; ii) restauração; iii) propagação vegetativa ou reprodutiva. Na reconstituição, células associadas ao pro-embrião zigótico, recapitulam processos ontogenéticos conservativos, formando 'de novo' estruturas originais. Este é o caso da poliembrionia, definida como a formação de mais de um embrião por óvulo. Um embrião zigótico ou somático (adventício) é definido como um novo indivíduo com promeristemas bipolares, originado a partir de uma célula simples e, em consequência, sem apresentar conexões vasculares evidentes com o tecido materno. A restauração define aqueles casos em que células, tecidos e órgãos faltantes são restaurados através de processos de desdiferenciação e re-diferenciação, e é, portanto, predominantemente organogenética, como é o caso da microestaquia. Conexões vasculares com os tecidos originais e monopolaridade são aspectos característicos deste processo. Por fim, a regeneração reprodutiva refere-se à separação de uma célula, tecido ou órgão na fase esporofítica ou gametofítica e sua regeneração em uma nova planta através da organogênese ou da embriogênese. Processos de excisão de explantes, indução, desdiferenciação,

<sup>1</sup> Prof. Titular, Depto. Fitotecnia, CCA/UFSC, 88.040-900, Florianópolis, SC

rediferenciação e transformações de fase são aspectos característicos da regeneração reprodutiva.

Protocolos regenerativos baseados na organogênese estão hoje disponíveis para um grande número de espécies. Esgotamento da capacidade regenerativa ao longo dos subcultivos, assincronia no desenvolvimento dos eixos caulinares e riscos de variações genéticas, principalmente em modelos indiretos, são algumas das limitações deste sistema. A utilização comercial em larga escala deste sistema é rotineira para abacaxi e banana em países da América Central e do Caribe.

Sistemas regenerativos baseados na embriogênese somática são uma abordagem elegante e eficiente para a propagação massal de germoplasmas de elite, principalmente quando associados com tecnologias de encapsulamento de embriões e conseqüente obtenção de sementes sintéticas. Reconstituição de endosperma, inoculação de microorganismos benéficos e de protetores químicos, são vislumbrados a curto prazo e se encontram em testes avançados nos EUA e Japão. Obtenção massal de germoplasma superiores, regeneração de haplóides e duplo-haplóides, resgate de embriões em cruzamentos que apresentam barreiras de incompatibilidade pós-zigótica e fixação de características ligadas ao vigor híbrido e de testes de progênie são um conjunto de técnicas que encontram na embriogênese somática uma ferramenta valiosa para o melhoramento e já se encontram em uso por grandes empresas de Biotecnologia como é o caso da Unilever na Malásia com o dendê, na Califórnia pela Calgene e DNAP para gramíneas, leguminosas, tomateiro e café e no Japão pela Sakata Seed Co., para olerícolas em geral e híbridos de Brássicas em particular.

Mais recentemente (Durzan, 1988), desenvolveu-se em coníferas uma revolucionária técnica, baseada na poliembriogênese somática, que pode ser definida como a formação não adventícia, por reconstituição, de vários embriões a partir de uma massa suspensor-embriônica pré-existente. Neste caso torna-se possível o controle da divisão e diferenciação celular através da indução de linhagens celulares poliembriogênicas e do estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e de maturação. Em coníferas, a poliembriogênese somática já é considerada uma nova alternativa em suporte às estratégias clássicas de melhoramento baseadas quase que exclusivamente em cruzamentos e pomares de sementes. Programas baseados nestas

estratégias e que incluem técnicas de criopreservação de linhagens celulares e tecnologia de sementes sintéticas, estão em andamento em uma das maiores empresas de reflorestamento do mundo, a Weyerhaeuser Co., na costa oeste dos EUA. Resultados promissores desta técnica indicam seu potencial para *Araucaria angustifolia* e *Pinus eliottii* (Guerra *et al.*, 1993) e já despertam grande interesse por empresas reflorestadoras do Brasil.

No que tange às técnicas modernas de engenharia genética, a obtenção de plantas geneticamente modificadas depende de sistemas regenerativos confiáveis e de bases celulares conhecidas, sobre as quais seqüências gênicas serão incorporadas. Linhagens celulares embriogênicas são o sistema celular mais adequado para estas finalidades. Incorporação direta de genes através de aparatos biolísticos e posterior regeneração por embriogênese somática são hoje perfeitamente possíveis. A obtenção de protoplastos a partir destas linhagens e a incorporação de genes através de estressantes osmóticos e por eletroporação e sua posterior regeneração, também já são possíveis para muitas espécies.

Finalmente, técnicas de mutagênese *in vitro* podem gerar nova variabilidade em espécies com estreitamento de base genética. Esta técnica, associada à mecanismos de elicitação pode ser particularmente importante para a obtenção de compostos secundários de alto valor agregado, notadamente biofármacos, sendo prioridade para políticas de Biotecnologia na Alemanha, Bélgica e Japão. Esta questão assume importância estratégica para o país quando se considera a biodiversidade vegetal existente.

#### Bibliografia

- DURZAN, D.J. 1988. Somatic Polyembryogenesis for the Multiplication of Tree Crops. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6:341-378.
- GUERRA, M.P.; LUCCA, P.C. de; NIETSCHKE, S.; KEMPER, E. 1993. Biotecnologia de coníferas: indução e estabelecimento de linhagens celulares poliembriogênicas de *Araucaria angustifolia* e *Pinus eliottii* var. *elliottii*. Congresso Florestal Latinoamericano, 1/ Congresso Florestal Brasileiro, 7. Curitiba, PR.1993. Anais... Curitiba, SBS-SBEF, V.1, p.87-91.
- SINNOT, E.W. 1960. *Plant Morphogenesis*. McGraw-Hill, New York.

## IMPLICAÇÕES DAS MODERNAS BIOTECNOLOGIAS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Rubens Onofre Nodari<sup>1</sup>

Bioteecnologias são definidas como as aplicações dos princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos para produzir produtos ou serviços (Bull et al., 1982)<sup>2</sup>. Bioteecnologias não são disciplinas mas técnicas. A base das bioteecnologias é multidisciplinar, estruturando-se na biologia molecular e celular, genética, bioquímica, microbiologia, imunologia, química, computação e engenharia de processos. As bioteecnologias não podem ser desenvolvidas e aplicadas isoladamente. Normalmente, necessitam ser aplicadas às disciplinas tradicionais, como fitopatologia e melhoramento de plantas. Para sofrer forte impacto, tais disciplinas devem apresentar um desenvolvimento científico avançado. A influência das bioteecnologias no melhoramento de plantas se concentra em várias fases da criação de uma nova cultivar: manutenção de germoplasma, recombinação entre genótipos, seleção e estabilização dos tipos superiores e multiplicação dos tipos selecionados.

O surgimento da tecnologia do DNA recombinante a partir da descoberta das enzimas de restrição proporcionou uma verdadeira revolução na biologia nestes últimos 20 anos. A combinação das técnicas de transformação, recombinação genética e regeneração de plantas tem aplicação direta no melhoramento de plantas cultivadas, por permitirem a introdução de genes oriundos de qualquer organismo. Publicamente, já são conhecidos aproximadamente 50 projetos com plantas transgênicas que estão na fase de testes ou em desenvolvimento, contemplando a inclusão de genes de resistência a vírus, herbicidas, insetos e fungos. Destas, aquelas que incluem genes com resistência a viroses apresentam-se mais promissoras que as demais.

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, 88040-900 Florianópolis-SC, Fax. 0482-342014, e-mail: fitlron@brufsc.

<sup>2</sup> Bull, A.T.; Holt, G.; Lilly, M.D. 1982. *Biotechnology, International trends and perspectives*. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).

Mesmo assim, plantas transgênicas estão defasadas aproximadamente em dez anos, segundo as previsões otimistas dos anos 80. Os genes responsáveis pela tolerância ou resistência a estresses e aqueles envolvidos na expressão de características quantitativas estão ainda distantes da manipulação pela engenharia genética.

Mais recentemente, novas estratégias de transformação de plantas têm sido utilizadas. Entre elas destacam-se aquelas que envolvem genes que modificam o sabor, o tipo de óleo e de proteína e as que alteram a quantidade ou composição de compostos de reservas não-proteicos, os quais podem substituir inclusive certos produtos derivados do petróleo. Com isto, é possível aumentar o valor de certas espécies agrícolas ou mesmo outras espécies ainda não domesticadas. O valor de muitas plantas de importância econômica é determinado pela presença de compostos cuja concentração não ultrapassa 1% do peso seco, como é o caso dos compostos usados como medicinais, pesticidas, fragrâncias, corantes, e aromatizantes. Na medida em que os genes envolvidos na expressão destes compostos se tornam disponíveis, novas oportunidades surgem para aumentar ou modificar a produção destes compostos. Além disso, estima-se que mais de cem mil metabólitos secundários são produzidos pelas plantas; entretanto, geralmente em baixas quantidades. A clonagem de genes de enzimas que catalizam os principais passos da rota de produção ou dos fatores de transcrição, podem aumentar a produção destes metabólitos e tornar exequível o cultivo de plantas transgênicas com tal finalidade.

Marcadores moleculares proporcionam precisão na avaliação genotípica, criando condições para a caracterização de germoplasma, construção de mapas de ligação, realização da seleção indireta em caracteres qualitativos e quantitativos. Apesar da baixa quantidade de locos disponíveis para serem verificados, as isoenzimas continuam sendo os marcadores mais simples e baratos, sendo utilizados concomitantemente com os demais marcadores genéticos. Atualmente, os RFLPs e os RAPDs apresentam o maior potencial de uso nos diversos tipos de estudos e aplicações em plantas, se considerados os atributos de cada um deles. Esses dois tipos de marcadores genéticos apresentam algumas semelhanças entre si: alto nível de polimorfismo, distribuição ao acaso no genoma, estabilidade, elevado número e detectável em qualquer tecido. Entretanto, apesar de serem dominantes em gerações segregantes, os RAPDs são mais eficientes no mapeamento

genético que os RFLPs, pelas seguintes razões: maior número de bandas por reação, a amplificação ocorre em todo o genoma, requer menor quantidade de trabalho e menor quantidade e qualidade do DNA para as análises. Na realidade, os RAPDs têm sido utilizados para alcançar uma maior saturação dos mapas de ligação previamente estabelecidos com isoenzimas e/ou RFLPs. No futuro, o emprego de microssatélites via PCR, poderá se tornar igualmente eficiente (ou superior) aos RAPDs no mapeamento genético e caracterização de germoplasma.

Mesmo nos países do terceiro mundo, as biotecnologias já tangenciam os programas de melhoramento. Desta forma, os melhoristas devem conhecer o potencial e as limitações das principais técnicas biotecnológicas para utilizá-las quando necessário com eficiência.



**PAINÉIS**  
C O N T E N I D O



## TÉCNICAS DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR COMO APOIO AO MELHORAMENTO DE CEREAIS DE INVERNO NO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO/EMBRAPA

Prestes, A.M.<sup>1</sup>; Haas, J.C.<sup>1</sup>; Fernandes, M.I.B. de M.<sup>1</sup>; Silva, S.D. dos A. e<sup>1</sup>; Cardoso, E.<sup>2</sup>; Galon, G.<sup>2</sup>; Fassini, J.<sup>2</sup>; Schleder, M.<sup>2</sup>; Bonfante, R.<sup>2</sup>; Guidolin, A.<sup>2</sup>; Taunous, I.<sup>3</sup>; Barbosa, M.M.<sup>3</sup>; Brammer, S.P.<sup>3</sup>; Stival, A.<sup>4</sup>; Angra, D.<sup>4</sup>; Vasconcellos, N.<sup>3</sup>; Pandolfi, V.<sup>3</sup>; Müller, J.E.<sup>3</sup>; D'Agostini, J.<sup>3</sup>; Ferreira, A.G.<sup>5</sup>; Viégas, J.<sup>6</sup>

O Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT), da EMBRAPA, dentro da filosofia de atividades multidisciplinares, está associando novas tecnologias, resultantes dos progressos da biologia molecular e celular ao programa de melhoramento de cereais de inverno, principalmente de trigo.

Técnicas de resgate de embriões híbridos imaturos e de cultura de anteras vêm sendo utilizadas para a produção de plantas haplóides androgenéticas e gimnogênicas e para a introdução de genes agronomicamente úteis de espécies afins. Estas técnicas estão sendo associadas à utilização de marcadores protéicos, através da eletroforese, para a seleção de genótipos de trigo com qualidade superior de panificação.

Este projeto vem propiciando o aumento da interação entre as áreas de fitopatologia, melhoramento varietal, cultura de tecidos, citogenética e biologia celular e molecular.

Até o momento, através de marcadores moleculares protéicos e com auxílio da técnica da eletroforese, SDS-PAGE, foram caracterizados 270 genótipos do bloco de cruzamentos e, aproximadamente, 300 linhagens de trigo em experimentação. Até o final de 1994, a meta prevista é caracterizar cerca de 3.000 genótipos quanto às subunidades

<sup>1</sup> Pesquisadores - EMBRAPA/CNPT

<sup>2</sup> Apoio - EMBRAPA/CNPT

<sup>3</sup> Bolsista - RHAÉ

<sup>4</sup> Pós-graduando

<sup>5</sup> UFECS - Depto de Botânica

<sup>6</sup> UFPel - Depto de Zoologia e Genética

de gluteninas, proteínas responsáveis por 50% da qualidade de panificação de trigo. Serão avaliadas também as gliadinas, que são complementos da qualidade. Estas avaliações, associadas à produção de plantas haplóides, permitirão rápida melhoria na qualidade panificativa dos trigos nacionais.

Desde o início, na década de 80, das pesquisas para produção de plantas haplóides, mais de mil linhagens de trigo foram produzidas através de androgênese ou da gimnogênese, as quais apresentaram grande variabilidade genética, inclusive o primeiro trigo de proveta das Américas e o quarto do mundo, chamado TRIGO BR 43, que foi lançado para cultivo, em 1991. A cultura de anteras vem sendo utilizada também como apoio ao melhoramento do triticale desde 1989, e ao melhoramento da cevada, desde 1993.

As técnicas de citogenética e de resgate de embriões híbridos imaturos são utilizadas com o objetivo de tornar disponíveis, nos trigos modernos, características úteis de espécies silvestres ancestrais. Desde 1989, vêm sendo obtidas plantas híbridas resultantes de cruzamentos e de retrocruzamentos entre trigo e espécies do gênero *Agropyron* portadoras de altos níveis de resistência a moléstias fúngicas. Durante os próximos dois anos, as plantas geradas serão testadas e novos híbridos serão desenvolvidos. O CNPT espera, no futuro, lançar cultivares com melhor qualidade de panificação e resistência às principais doenças de trigo que ocorrem no Brasil.

A partir de 1993, passou a ser introduzida, também, a técnica de suspensões celulares para seleção *in vitro*, que se encontra atualmente em fase de ajuste de metodologia.

**ATIVIDADES DE PESQUISA EM DESENVOLVIMENTO NO  
LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS DO  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA DA UFSM**Sepel, L.M.N.<sup>1</sup>

MICROPROPAGAÇÃO DE *Cedrella fissilis*. Devido à grande suscetibilidade a algumas pragas, o cultivo de cedro branco em grandes áreas de reflorestamento é economicamente inviável. Tal situação só será alterada com o desenvolvimento de métodos de controle para as principais pragas e a implantação de programas de melhoramento. O cedro branco é uma espécie de fecundação cruzada cuja propagação por estaquia é pouco produtiva e origina plantas com características indesejáveis. O desenvolvimento de um protocolo para micropropagação dessa espécie poderá auxiliar na formação de cultivos mais homogêneos e principalmente na manutenção de genótipos de interesse. Já foi estabelecida uma metodologia para coleta, pré-tratamento e desinfecção de explantes que reduz a contaminação das culturas a níveis inferiores à 10%. Durante a primeira fase de coleta de gemas (primavera-verão de 93) foram selecionadas três combinações de reguladores de crescimento que aparentemente se igualam na indução de brotação. Atualmente os testes visam à obtenção de um alongamento mais rápido das gemas e formação de raízes.

INDUÇÃO DE CALOS, ORGANOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM FEIJÃO. Estão sendo testados, em algumas cultivares de feijão, a ação de diferentes combinações de reguladores de crescimento na indução de calos a partir dos seguintes explantes: pontas de raiz e plúmulas de embriões maduros e imaturos, cotilédones imaturos, anteras e ovários de flores em desenvolvimento. A indução de calos em plúmulas e pontas de raiz extraídas de sementes maduras está indicando a existência de um grupo de cultivares dependentes de citocinina e outro independente desse tipo de regulador. A amostra de anteras e ovários é ainda pequena e não permite nenhuma antecipação de

<sup>1</sup> Bióloga, MS, responsável técnico pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria

resultados. A utilização de explantes originados de sementes imaturas, bem como os experimentos específicos para regeneração estão em fase de implantação.

## ORGANOGENESE "IN VITRO" DE PLANTAS

Battistin, A.<sup>1</sup>; Franco, E.T.H.<sup>1</sup>; Paranhos, J.<sup>2,3</sup>;  
Lovatto, M.T.<sup>3</sup>; Mazocatto, A.M.<sup>4</sup>; Perrando, E.<sup>2</sup>;  
Montovani, N.<sup>2</sup>; Viana, T.B.<sup>5</sup>

O Laboratório de CULTURA de TECIDOS do Departamento de BIOLOGIA tem desenvolvido estudos com o objetivo de estabelecer protocolos eficientes na organogênese de algumas espécies ornamentais (*Begonia rieger* e *rex*, *Gladiolus* sp., *Hemerocallis fulva*) e hortaliças (*Lycopersicum esculentum*). Ainda trabalha com espécies do gênero *Lathyrus* L. visando explorar o potencial de regeneração *in vitro*.

Das espécies ornamentais já foi estabelecido protocolo para *Begonia rex* e para *B. rieger* o uso de diferentes concentrações de Thidiazuron vem apresentando resultados satisfatórios na indução de brotos aéreos. Para *Hemerocallis* foi obtido 100% de regeneração a partir de calos embriogênicos, sendo as plantas transferidas diretamente para o jardim com sobrevivência total. Quanto aos gladiolus continuam os trabalhos testando-se diferentes doses de sacarose e o efeito do retardador de crescimento (paclobutrazol) a fim de aumentar o tamanho dos bulbos obtidos *in vitro*. Além disso, microvioletas são produzidas rotineiramente para fins comerciais.

No caso do tomate obteve-se organogênese direta cultivando segmentos nodais em MS. As plantas estão sendo transferidas para a estufa de polietileno. Para *Lathyrus* obteve-se calos utilizando-se meio MS e combinações de ANA e Cinetina.

Além destes trabalhos estamos iniciando trabalho de investigação com caixeta (*Didimopanax morototoni*).

<sup>1</sup> Professora do Departamento de Biologia

<sup>2</sup> Bolsista da Fapergs

<sup>3</sup> Mestre em Agronomia

<sup>4</sup> Bolsista Pet-Biologia

<sup>5</sup> Laboratorista

## ESTUDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATOGÊNESE (PRs) EM CULTIVARES BRASILEIRAS DE TRIGO

Freitas, L.B.<sup>1</sup>; Salzano, F.M.<sup>1</sup>

O aparecimento de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) tem sido observado em várias espécies de plantas logo após a infecção por patógenos. As PRs são proteínas espécie-específicas, produzidas pelas plantas como uma forma de defesa química contra a infecção, sendo induzidas por vírus, bactérias ou fungos. Sua ativação implica na diminuição ou total desaparecimento dos sintomas provocados pelo agente patogênico em infecções subseqüentes. Tal fato relaciona estas proteínas diretamente com a indução da resistência adquirida.

Muito é sabido sobre essas proteínas e sobre os genes que as codificam, tanto em mono como em dicotiledôneas, mas nenhum estudo foi feito em trigo, especialmente com cultivares brasileiros. O objetivo do presente trabalho é estabelecer o padrão de ativação das PRs em trigo e caracterizar os genes que as codificam. Para tanto estão sendo empregadas técnicas de RAPD, PCR, RFLP, seqüenciamento, western-blot e ensaios enzimáticos associados à eletroforese vertical de proteínas. Os resultados até agora obtidos indicam diferenças genéticas entre as cultivares quanto às PRs, que podem ser correlacionadas ao comportamento de reação frente à infecção por patógenos. Os resultados destas pesquisas poderão ser usadas em programas de melhoramento de trigo, uma vez que a identificação de genomas ricos em elementos que conferem resistência a patógenos poderiam ser usados preferencialmente em cruzamento ou programas de seleção.

---

<sup>1</sup> Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## CULTURA DE TECIDOS E TRANSFERÊNCIA DE GENES EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.)

Zanettini, M.H.B.<sup>1</sup>; Droste, A.<sup>1</sup>; Santos, E.K. dos<sup>1</sup>; Leite, P.C.P.<sup>1</sup>;  
Santos, K.G.B. dos<sup>1</sup>; Feijó, K.S.<sup>1</sup>; Strussmann, W.<sup>1</sup>; Richter, S.N.C.<sup>1</sup>;  
Lauxen, M.S.<sup>1</sup>; Passaglia, L.P.<sup>1</sup>; Lange, C.E.<sup>2</sup>; Tragnago, J.L.<sup>2</sup>

A variabilidade do germoplasma da soja é bastante restrita, uma vez que a maioria das cultivares é derivada de poucas linhas ancestrais. A estreita variabilidade tem sido considerada responsável por: a) vulnerabilidade do germoplasma às condições de estresses e b) dificuldades para o avanço no melhoramento convencional. As técnicas de cultura de tecidos e de transferência de genes constituem importantes instrumentos de apoio ao melhoramento. O sucesso com estas abordagens tem sido limitado devido à falta de sistemas eficientes de regeneração e de transformação de plantas de soja. Este projeto inclui 3 abordagens: 1) Híbridações interespecíficas com espécies selvagens do sub-gênero *Glycine*: estas espécies possuem características agrônômicas favoráveis (resistência a várias doenças, tolerância à seca, a sais, a herbicidas etc.) não encontradas na espécie cultivada (*G. max*). Em nossos laboratórios, um protocolo para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos foi utilizado com sucesso para a recuperação de híbridos entre *G. max* e *G. tomentella*. As plantas híbridas são perenes e estéreis. A confirmação da condição híbrida foi obtida pela análise de cromossomos mitóticos, bem como pela análise dos padrões isoenzimáticos por eletroforese. Estamos buscando duplicar os cromossomos dos híbridos, visando a restauração da fertilidade. Novos cruzamentos envolvendo cultivares brasileiros e as espécies *G. tomentella*, *G. tabacina* e *G. canescens* foram realizados no início de 1994. Os 120 embriões supostamente híbridos obtidos estão sendo cultivados *in vitro*. 2) Cultura de anteras: devido à natureza recalcitrante da soja a cultura de anteras ainda está num estágio muito inicial. Foi detectada em nosso laboratório a ocorrência de um

<sup>1</sup> Departamento de Genética

<sup>2</sup> FUNDACEP-FECOTRIGO

dimorfismo em grãos de pólen (pólens normais e "pólens-p"), até então não registrado na literatura. Foram obtidos também diferentes tipos de calos a partir da cultura de anteras de 4 cultivares. Um dos tipos de calos apresentava estruturas globulares semelhantes a embrióides. A partir de uma destas estruturas foi conseguida a regeneração de uma planta. As próximas etapas objetivam: a caracterização dos "pólens-p"; a investigação da seqüência de processos citológicos na rota androgenética e a identificação de fatores químicos e físicos que estimulem o desenvolvimento androgenético. 3) Indução de embriogênese somática e obtenção de suspensões embriogênicas: culturas embriogênicas em suspensão têm-se mostrado o melhor alvo para a transformação de soja. Estas suspensões são obtidas a partir de embriões somáticos secundários, que em meio líquido mantém a capacidade de multiplicarem-se. Foi avaliada a resposta de 12 cultivares de soja à indução de embriogênese somática. Foi detectado efeito de pré-tratamento de frio. Foi obtido sucesso no estabelecimento de suspensões embriogênicas. Os objetivos das próximas etapas incluem: a detecção de genótipos com potencial máximo para a regeneração de plantas via embriogênese somática; obter dados conclusivos sobre o efeito de pré-tratamento de frio; ajustar os protocolos nas etapas de maturação e conversão de embriões a partir das suspensões; implantar métodos de transferência de genes via bombardeamento com microprojéteis e/ou sistema *Agrobacterium*.

## GENÉTICA, CULTURA DE TECIDOS E TRANSFERÊNCIA DE DNA EM CEVADA

Winge, H.<sup>1</sup>; Cavalli-Molina, S.<sup>1</sup>; Assmann, E.M.<sup>1</sup>; Nonohay, J.S. de<sup>1</sup>;  
Echart, C.L.<sup>1</sup>; Selbach, A.<sup>1</sup>; Mühlen, C.M. von<sup>1</sup>; Schütz, L.C.<sup>1</sup>

**CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES BRASILEIROS DE CEVADA POR MARCADORES MOLECULARES:** A identificação correta das cultivares da cevada brasileira, importante para o agricultor e para a indústria do malte devido à diferentes qualidades de uso e exigências de processamento, está sendo feita através de marcadores de DNA do tipo RAPD. Esta técnica permite a análise de um grande número de locos possibilitando que mesmo cultivares extremamente relacionadas possam ser distinguidas.

**VARIABILIDADE DE HORDEÍNAS NA CEVADA CULTIVADA E ESPÉCIES NATIVAS DO RS:** O polimorfismo das hordeínas, principal proteína de reserva do grão da cevada, será estudado na cevada cultivada e em duas espécies relacionadas nativas do RS, em dois níveis: análise das hordeínas por eletroforese horizontal em gel de amido e análise do gene B<sub>1</sub>, por PCR usando primers específicos e enzimas de restrição.

**CULTURA DE ANTERAS E OBTENÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES:** Este trabalho visa o estabelecimento de protocolos para a obtenção de plantas haplóides via cultura de anteras, das cultivares brasileiras de cevada, e assim auxiliar os melhoristas através da redução do número de gerações de seleção. Um total de mais de 27.000 anteras foi submetido a 27 tratamentos: 3 cultivares (MN-599, BR-2 e A-05), 3 pré-tratamentos (5°C durante 10, 20 ou 30 dias) e 3 meios de cultura para indução de androgênese. Resultados principais até agora obtidos: 1) as 3 cultivares formaram estruturas androgenéticas em todos os tratamentos, embora em frequência diferentes; 2) O pré-tratamento de 20 dias no frio parece ser o melhor; 3) as cultivares parecem responder diferentemente aos meios de indução; 4) os dados sugerem uma correlação inversa nas respostas à indução e à regeneração de plantas verdes, entre as cultivares.

<sup>1</sup> Departamento de Genética - IB - UFRGS

### AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DE ESPIGAS DE CULTIVARES BRASILEIRAS DE CEVADA:

Objetivos: a) avaliar o grau de variação nos estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen por antera, por flor e por espiga, em diferentes momentos de maturação das espigas, b) fornecer dados úteis às pesquisas sobre culturas de anteras. Primeira etapa: análise de 3 espiguetas/espiga que entrou na cultura de anteras (3 cultivares: MN-599, BR-2, A-05) quanto aos estádios e tamanhos dos grãos de pólen. Segunda etapa: análises detalhadas de todas as espiguetas/espiga com maturações diferentes.

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES EMBRIOGÊNICAS VISANDO TRANSFERÊNCIA DE GENES PARA CEVADA: Terá início no corrente ano e tem como objetivos: detectar genótipos com alto potencial de regenerar plantas, via embriogênese somática, e de multiplicação em suspensões embriogênicas que serão utilizadas como material-alvo para transferência de genes por bombardeio com microprojéteis.

## PROGRAMAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS DO CENTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE CLIMA TEMPERADO (CPACT/EMBRAPA)

Fortes, G.R. de L.<sup>1</sup>; Leite, D.L.<sup>1</sup>; Magalhães, A.<sup>1</sup>

O Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado cumpre algumas funções bem específicas, quais sejam: 1) Suporte à pesquisa desenvolvida no próprio centro. 2) Produção comercial - desde 1977 quando teve suas atividades iniciadas, o Laboratório tem produzido mudas matrizes através do processo de termoterapia e cultura de meristemas o que proporciona a obtenção de plantas isentas de vírus. Este material é fornecido principalmente aos viveiristas que vendem posteriormente, aos produtores. Entre as espécies trabalhadas constam: ameixeira, amoreira, framboeseira, macieira, morangueiro, pereira, alho, aspargo, batata, batata doce e outras. 3) Treinamento - Aqui incluem-se os estágios de estudantes de cursos médio e superior; treinamento à nível de mestrado e doutorado; treinamento de recursos humanos das áreas pública e privada. 4) Pesquisa - Ensaio foram conduzidos com novos clones de pereira e macieira na área de organogênese, objetivando-se a maximização de produção de brotos e raízes; estabeleceu-se alguns protocolos para a produção de material somático de kiwi. Testou-se o uso de amido de milho e mandioca como meio geleificante para a cultura da batata. Pelos resultados obtidos conclui-se que o ágar pode ser substituído por ambos amidos sem perda da qualidade de produção *in vitro*. Para o ciclo 1994/95 está se iniciando trabalhos: a) com variação somaclonal de porta-enxertos de macieira visando tolerância ao alumínio; b) Variação somaclonal em morango visando a tolerância a doenças; c) Variação somaclonal em batata visando obtenção de genótipos superiores ao de cultivares regionais; d) Conservação *in vitro* de hortaliças (alho, batata doce, aspargo).

<sup>1</sup> EMBRAPA/CPACT; Caixa Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS

CULTURA "IN VITRO" DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)<sup>1</sup>

Magalhães Jr., A.M. de<sup>2</sup>; Peters, J.A.<sup>3</sup>;  
Fortes, G.R. de L.<sup>2</sup>; Leite, D.L.<sup>2</sup>; Andrade, L.B.<sup>4</sup>

A cultura de tecidos vegetais, utilizando distintos processos de manipulação *in vitro*, abriu um novo horizonte como eficiente técnica de auxílio ao melhoramento genético convencional. A manipulação a nível celular em seus distintos aspectos é possível graças a totipotencialidade da célula vegetal o que significa que esta contém toda informação necessária para regenerar uma planta completa através de um processo de diferenciação, desde que a ela seja dado condições mínimas necessárias de forma a induzir o processo. No entanto, o feijão comum, assim como grande parte das leguminosas, é uma espécie recalcitrante à regeneração de plantas. Para que ocorra sucesso na obtenção de plântulas através do cultivo *in vitro*, além do genótipo, a composição do meio de cultura, o tipo de tecido utilizado como explante e as condições físicas na qual estes são submetidos são fatores que desempenham um importante papel. Neste sentido, busca-se estabelecer metodologia de cultivo *in vitro* capaz de regenerar plântulas de feijoeiro para posterior utilização em trabalhos de transformação e seleção a estresses ambientais. Até o presente momento, nenhum sucesso foi obtido, exceto casos esporádicos e não repetitivos. A calogênese melhor foi induzida utilizando-se nós cotiledonares em meio MS acrescido da 1 mg/l de BAP sob 4.000 lux de intensidade luminosa, bem como foi efetivo o uso de 4 CPA a 0,1 mg/l. Estuda-se meio CS-23 e explantes foliares (1 a 2 mm) em testes preliminares.

<sup>1</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais CPACT/EMBRAPA

<sup>2</sup> Pesquisador EMBRAPA/CPACT

<sup>3</sup> Professor Titular do Depto. de Botânica (UFPeI)

<sup>4</sup> Estudante de Biologia (UFPeI)

**OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLÓIDES DE ARROZ IRRIGADO  
(*Oryza sativa* L.) ATRAVÉS DA CULTURA DE ANTERAS<sup>1</sup>**

Magalhães Jr., A.M. de<sup>2</sup>; Peters, J.A.<sup>3</sup>;  
Fortes, G.R. de L.<sup>2</sup>; Leite, D.L.<sup>2</sup>; Avozani, O.A.<sup>4</sup>

Em arroz, linhas homozigotas podem ser produzidas a partir de cruzamentos segregantes por meio de dobramento cromossômico do pólen haplóide e regeneração de plantas através de técnica que se denomina cultura de anteras. Contudo, a implementação desta técnica como ferramenta rotineira de trabalho tem sido lenta, principalmente porque a resposta é bastante dependente do genótipo utilizado. O arroz do tipo japonico tem uma maior resposta que o tipo indica bastante utilizado no Programa de Melhoramento do CPACT/EMBRAPA. Como técnica de apoio ao melhoramento clássico convencional, a cultura de anteras em arroz, para regiões temperadas, permite a diminuição drástica do tempo necessário para o desenvolvimento de linhas puras, eliminando a complexidade do estado heterozigoto, bem como reduz gastos e problemas aleatórios encontrados a campo. Assim sendo, é possível uma redução de cerca de 6 anos no tempo necessário para lançamento de novas cultivares. O CPACT/EMBRAPA vem investigando em como melhorar a técnica de cultivo *in vitro* de anteras de arroz irrigado associada ao programa de melhoramento genético. Tem-se, atualmente uma eficiência média de 1,5% entre o número de anteras inoculadas e o número de plantas verdes aclimatadas. Destas, cerca de 60% são auto-diplóides. Tem-se ainda, uma elevada taxa de plantas albinas. Neste sentido, o CPACT/EMBRAPA vem estudando os possíveis fatores que afetam a resposta androgenética dos genótipos amplamente utilizados na região sul do Brasil. O estudo está centralizado em identificar componentes no meio de

<sup>1</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais CPACT/EMBRAPA

<sup>2</sup> Pesquisador EMBRAPA/CPACT

<sup>3</sup> Professor Titular do Depto. de Botânica (UFPEl)

<sup>4</sup> Estudando de Mestrado (UFPEl/CPACT)

cultivo, principalmente fontes de nitrogênio, de forma a melhorar a eficiência da técnica. Recomenda-se uma redução pela metade na concentração do sulfato de amônia do meio N6. Estuda-se também, fatores que afetam o estado fisiológico das plantas doadoras de anteras, onde melhores respostas são obtidas quando eleva-se a adubação nitrogenada das mesmas. Para contornar a diversidade de respostas, busca-se utilizar nos cruzamentos orientados genótipos que melhor respondem à cultura *in vitro* de tecidos. Atualmente, as plantas produzidas por cultura de anteras são utilizadas no programa de melhoramento para desenvolver plantas tolerantes ao frio, produtivas, tolerantes às principais doenças e pragas, resistentes a toxidez de ferro e a salinidade, com elevada qualidade de grãos e menos exigentes em insumos agrícolas (precocidade e vigor). O programa já desenvolveu inúmeras linhagens, muitas em fase de avaliação final.

## MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES HORTÍCOLAS

Kämpf, A.N.<sup>1</sup>; Cunha, G.G.<sup>2</sup>; Grolli, P.R.<sup>3</sup>

O Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS tem por objetivo estabelecer protocolos para a micropropagação de espécies hortícolas de interesse econômico.

O grupo de trabalho é composto por 3 pós-graduados, 2 bolsistas DTI (RHAE), 5 bolsistas de Iniciação Científica e 2 técnicos, sendo responsável pelo Laboratório a Prof<sup>a</sup> Atelene Normann Kämpf contando com a colaboração dos professores Otto C. Koller, Ingrid B. I. de Barros e Sergio F. Schwarz.

São desenvolvidos projetos com testes de técnicas de assepsia, micropropagação e aclimatização *ex vitro* visando o estabelecimento de protocolos para as seguintes espécies: abacate, abacaxi, alface, citros, crisântemo, eustoma, latifolia, lírio e marcela. Também está sendo implementado um projeto de estudo de sistemas de iluminação para a cultura *in vitro*.

Até o presente momento foram produzidas três dissertações de mestrado sob os títulos:

– “Estudo sobre a propagação de marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Compositae”. De Agda R. Y. Ikuta;

– “Micropropagação de abacateiro 'Ouro Verde' através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares”. De Luiz A. Biasi;

– “Propagação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv Pérola”. De Rosete Pescador.

Além do estabelecimento de protocolos o laboratório procura atender à necessidade de produtores, introduzir novas culturas e a formação de pessoal qualificado.

<sup>1</sup> Prof<sup>a</sup> Titular do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS

<sup>2</sup> Doutorado em Botânica - UFRGS

<sup>3</sup> Bolsista DTI (RHAE) - UFRGS

**INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES IMATUROS DE DIFERENTES CULTIVARES DE AVEIA (*Avena sativa* L.)**

Bered, F.<sup>1</sup>; Sereno-Tavares, M.J.<sup>2</sup>; Carvalho, F.I.F.<sup>2</sup>; Federizzi, L.C.<sup>2</sup>;  
Lange, C.E.<sup>3</sup>; Dornelles, A.L.C.<sup>4</sup>; Handel, C.L.<sup>1</sup>

A biotecnologia, de modo geral, vem sendo alvo de estudos por parte de pesquisadores de diversas áreas. Especificamente, a cultura de tecidos está sendo apontada como metodologia básica para posterior aplicação de muitas técnicas modernas de biotecnologia vegetal, as quais podem vir a ser usadas como ferramenta no melhoramento genético de plantas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a produção de calos com vista na regeneração de plantas de aveia, bem como identificar as diferenças entre os genótipos testados quanto ao caráter indução de calos. Foram utilizados nove genótipos de aveia: UFRGS 7, UFRGS 8, UFRGS 9, UFRGS 10, UFRGS 11, UFRGS 12, UPF 7, UPF 12 e GAF/PARK, dos quais foram retirados embriões imaturos no estágio de grão leitoso. O experimento foi realizado em duas etapas: A primeira testou protocolos constituídos de três meios cada. O meio utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes doses de hormônios de acordo com o protocolo, sendo inoculados dez embriões por placa de petri. Foram feitas oito placas em média de cada genótipo em cada protocolo. Após quatro meses de subcultivo foi determinada a porcentagem de formação de calos e realizada uma análise de variância usando meio, genótipo e placa como variáveis. Na segunda etapa do experimento foi utilizado somente um dos protocolos com os mesmos genótipos testados através da metodologia empregada na primeira etapa. Os resultados revelaram que houve formação de calos em todos os genótipos e detectaram diferenças estatísticas entre os meios testados. Os nove genótipos evidenciaram diferenças entre si quanto à característica indução de calos.

<sup>1</sup> Alunas de mestrado

<sup>2</sup> Professores do Depto. de Plantas de Lavoura

<sup>3</sup> Mestre em fitotecnia

<sup>4</sup> Aluna de doutorado

Departamento de Plantas de Lavoura - Faculdade de Agronomia - UFRGS

## OBTENÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES DE AVEIA (*Avena sativa*) VIA CRUZAMENTOS INTERGENÉRICOS<sup>1</sup>

Suzin, M.<sup>2</sup>; Sereno-Tavares, M.J.<sup>3</sup>; Federizzi, L.C.<sup>3</sup>; Carvalho, F.<sup>3</sup>

A obtenção de haplóides em aveia é importante para estudos de genética básica e para obtenção de duplo haplóides para acelerar o processo de lançamento de cultivares em escala comercial. Com o objetivo de desenvolver uma metodologia adequada para obtenção de haplóides, foi realizado um experimento englobando 3 períodos no decorrer dos anos de 1992 e 1993. Neste experimento foram utilizados 4 genótipos de aveia como mãe (UFRGS-7, UPF-7, UFRGS-881969, CTC-82B477-2) e 2 genótipos de milho (AG-303, AG-223), 1 de milheto (cv. 'Comun') e 1 de milho doce (cv. 'Hawai-5') como fonte de pólen. As flores de aveia foram emasculadas e, 1 a 5 dias depois, polinizadas. No 1º e 2º dias após a polinização, as flores foram borrifadas com uma mistura de igual proporção de solução aquosa de 2,4D (100 mg/l) e GA3 (75 mg/l). Decorridos 8 a 14 dias da polinização, as panículas com flores emasculadas/polinizadas foram coletadas e levadas para o laboratório, onde fez-se a contagem de flores por panícula e das cariopses delas oriundas (Tabela 1). As cariopses foram desinfestadas e tiveram seus embriões resgatados. Estes, por sua vez, foram colocados em meio de cultura apropriado, onde 3 composições dos mesmos foram testadas. Nenhuma planta foi regenerada, mas é certo que podemos obter embriões haplóides de aveia por cruzamento intergenéricos. Contudo, as frequências ainda são muito baixas e mais estudos são necessários para aumentar a frequência e estabelecer um meio eficiente para resgate de embriões e regeneração de plantas.

<sup>1</sup> Parte do trabalho de dissertação em desenvolvimento no Depto. de Plantas de Lavoura da UFRGS

<sup>2</sup> Aluna de mestrado - Depto. de Plantas de Lavoura - UFRGS - Eng. Agrônoma

<sup>3</sup> Professores do Depto. de Plantas de Lavoura - UFRGS

## VII REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Tabela 1 - Frequência de cariopses e embriões obtidos nos cruzamentos intergenéricos (aveia x milho; aveia x milheto) em três períodos no decorrer dos anos 1992 e 1993.

Períodos	Nº de flores emasc/polín	Nº de cariopses obtidas	Nº de embriões
1º período (maio/92 - nov/93)	997	760 (76,23%)	5 (0,66%)
2º período (dez/92 - março/93)	791	713 (90,14%)	23 (3,23%)
3º período (maio/93 - nov/93)	2443	2193 (89,77%)	13 (0,59%)
Total	4231	3666 (86,65%)	41 (1,12%)

## GENÉTICA DA REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*)

Dornelles, A.L.C.<sup>1</sup>; Carvalho, F.I.F.<sup>2</sup>; Federizzi, L.C.<sup>2</sup>; Lange, C.E.<sup>3</sup>;  
Handel, C.L.<sup>4</sup>; Bered, F.<sup>4</sup>; Mittelmman, A.<sup>5</sup>

Cinco genótipos de trigo com diferentes comportamentos de regeneração de plantas, foram cruzados em delineamento semidialélico. Pais e F1's foram submetidos a cultura e regenerados em três períodos diferentes (com 1, 2 e 3 passagens por meio de manutenção de calos). A análise de médias e capacidades combinatórias para o número de plantas regeneradas por calo no primeiro período, evidenciaram a superioridade dos efeitos aditivos (dois terços da variância genética), no segundo e terceiro período os efeitos não aditivos foram mais importantes que no primeiro mas mesmo assim a aditividade respondeu por mais da metade do efeito genético total. A expressão da regeneração de plantas teve um decréscimo expressivo no 2º e 3º período, demonstrando que o protocolo para manutenção de calo em uso, ainda não está adequado. A heterose, em todos os períodos de regeneração foi alta, mostrando que sua ocorrência foi devida a efeitos aditivos, sendo assim de grande aplicação em Melhoramento de Plantas, principalmente em se tratando de ciclos curtos de cultura de tecidos.

<sup>1</sup> MS. parte da tese de Doutorado, Faculdade de Agronomia/UFRGS

<sup>2</sup> Professores do Depto. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia/UFRGS

<sup>3</sup> MS., Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> da FUNDACEP, Cruz Alta (RS)

<sup>4</sup> Estudante de Pós-Graduação a nível de Mestrado, Faculdade de Agronomia/UFRGS

<sup>5</sup> Estudante de Graduação. Bolsista de Iniciação Científica-CNPq, Faculdade de Agronomia/UFRGS

## USO DE FILTRADOS TÓXICOS PARA AVALIAR A RESISTÊNCIA AO FUNGO *Helminthosporium sativum* EM TRIGOS HEXAPLÓIDES "IN VITRO"

Cristaldo, R.M.L.O.<sup>1</sup>; Carvalho, F.I.F.<sup>2</sup>; Kohli, M.M.<sup>3</sup>; Federizzi, L.C.<sup>2</sup>; Matsumura, A.T.S.<sup>4</sup>; Pierobom, C.<sup>5</sup>; Barbieri, R.L.<sup>6</sup>

Calos de doze genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) com diferentes manifestações em relação a resistência ou susceptibilidade à moléstia causada pelo fungo *Helminthosporium sativum* (*Bipolaris sorokiniana*) foram utilizados sob cultura *in vitro* com filtrados tóxicos como agentes de seleção. Dois filtrados, provenientes dos isolados fúngicos dos trigos BR35 e IAC5 foram adicionados ao meio de cultura em duas diluições, 1:16 e 1:8. Os calos procedentes de culturas desenvolvidas pelo período de 4, 8, 12 e 16 semanas foram testados sob o efeito dos filtrados. Calos oriundos do período de quatro semanas de crescimento submetidos à diluição da toxina de 1:16 proporcionaram o surgimento de quatro classes bem definidas: resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente susceptíveis e susceptíveis. A toxina do isolado BR35 foi mais virulenta do que a do IAC5, entretanto não foi possível detectar a presença de raças distintas do patógeno. A partir da segunda sub-cultura (8 semanas) foram verificadas diferenças entre calos dentro dos genótipos testados, sendo esta variabilidade mais intensa entre calos com maior tempo de sub-cultura em alguns genótipos, evidenciando, desta forma, uma possível presença de variação somaclonal. O uso de calos jovens em uma diluição da toxina de 1:16 poderia ser uma metodologia adequada para identificar e selecionar genótipos resistentes à helmintosporiose e, também, ser utilizado como mecanismo de rotina em laboratórios dos programas de melhoramento e nos trabalhos de entendimento da relação hospedeiro-patógeno.

<sup>1</sup> Doutora em Fitotecnia; <sup>2</sup> Professores do Depto de Plantas de Lavoura - Fac. Agronomia - UFRGS; <sup>3</sup> Doutor em Melhoramento de Plantas; <sup>4</sup> Professora do Depto. de Fitossanidade - Fac. Agronomia - UFRGS; <sup>5</sup> Doutor em Fitopatologia; <sup>6</sup> Aluna de Mestrado em Genética e Biologia Molecular - UFRGS

## HERANÇA DA RESISTÊNCIA A FILTRADOS TÓXICOS DE *Helminthosporium sativum* EM CULTURAS "IN VITRO" DE TRIGO HEXAPLÓIDE

Barbieri, R.L.<sup>1</sup>; Carvalho, F.I.F.<sup>2</sup>; Matsumura, A.T.S.<sup>3</sup>; Cristaldo, R.M.O.<sup>4</sup>

O fungo *Helminthosporium sativum* Pam. King & Bakke é um patógeno de trigo responsável por consideráveis reduções na produção em regiões de clima quente e úmido. Apresenta alta variabilidade e é controlado em parte com o uso de fungicidas.

Nos últimos anos, através de programas de melhoramento genético, vem sendo desenvolvidas cultivares que apresentam certa resistência à ação do patógeno. Não há evidências, no entanto, de quais são os mecanismos genéticos que controlam esta resistência.

Este trabalho está sendo desenvolvido com o objetivo de analisar a herança da resistência do trigo hexaplóide à ação de *H. sativum*, o que tornará possível uma maior eficiência nos programas de seleção. Estão sendo utilizados seis genótipos de trigo cuja resistência ou susceptibilidade ao fungo já é conhecida (CRISTALDO *et al.*, 1993) e as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> obtidas. É realizado o cultivo *in vitro* de embriões imaturos em meio de indução de calo MS 2.0. Após 4 semanas, os calos são cortados em porções de 2 mm e transferidos para o meio de manutenção e crescimento de calo MS 0.5 contendo 1/16 de filtrado tóxico do fungo. O filtrado foi obtido a partir de um isolado de sementes de trigo da cultivar BR35. O uso do filtrado procura reduzir a variabilidade do patógeno, padronizar a quantidade de toxina a que os tecidos são expostos e eliminar a possível competição entre calo e fungo pelos componentes do meio de cultura. Ao final de 4 semanas os calos são medidos para testar sua taxa de crescimento durante o período, em relação ao controle.

<sup>1</sup> Aluna de Mestrado em Genética e Biologia Molecular

<sup>2</sup> Professor do Depto. de Plantas de Lavoura

<sup>3</sup> Professor do Depto. de Fitossanidade

<sup>4</sup> Doutora em Fitotecnia

Faculdade de Agronomia - UFRGS

## EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ASPARGO

Gomez, A.S.<sup>1</sup>; Peters, J.A.<sup>1</sup>; Augustin, E.<sup>2</sup>; Kerbauy, G.<sup>3</sup>

A embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões, a partir de células somáticas. Podem ocorrer dois tipos de desenvolvimento de embriões somáticos, tais como: a) embriogênese direta, na qual os embriões se originam diretamente de tecidos; b) embriogênese indireta, na qual o calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões. A embriogênese pode ser utilizada para a produção de grande número de embriões que ao serem individualizados se desenvolvem diretamente em plantas, o que reduziria o preço relativamente elevado por planta que se obtém por micropropagação. Desta forma, permitindo a obtenção de sementes sintéticas. A embriogênese possibilitaria a clonagem de grande número de espécies, em pequena área de laboratório e num menor espaço de tempo do que o requerido normalmente. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia que permita produzir embriões somáticos de cultivares e híbridos de aspargo, que possam ser utilizados no melhoramento da espécie; visando a viabilidade das técnicas para a obtenção futura de semente sintética.

A embriogênese somática e formação de plântulas de aspargo a partir de híbridos do CPACT (EMBRAPA), foram obtidas de três tipos de explantes; calos da região apical e sub-apical do turião e calos de anteras. Os calos foram obtidos no meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), (MS), suplementado com ANA (ácido naftalenoacético), K (cinetina) e 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) em diferentes concentrações e combinações. A indução de embriões de turião foi obtida com ANA (1,0 mg/l) e K (1,0 mg/l); 2,4-D (3,0 mg/l) e K (1,0 mg/l); e ANA (1,5 mg/l) e K (0,1 mg/l). Para a multiplicação adicionou-se ao meio MS, 1000 mg/l de KNO<sub>3</sub>. O desenvolvimento foi obtido no meio MS sem reguladores de crescimento. A obtenção da embriogênese a partir de anteras foi no meio MS suplementado com ANA (2,0 mg/l) e K (0,5 mg/l) e o desenvolvimento no meio MS sem reguladores de crescimento.

<sup>1</sup> UFPEL, Depto. de Botânica; <sup>2</sup>CPACT/EMBRAPA; <sup>3</sup>USP, Instituto de Biociências.

## CULTURA DE ANTERAS EM ARROZ E ASPARGO

Bobrowski, V.L.<sup>1</sup>; Peters, J.A.<sup>2</sup>; Augustin, E.<sup>3</sup>; Magalhães Jr., A.M.<sup>4</sup>;  
Sartoretto, L.<sup>5</sup>; Rosinha, G.M.S.<sup>4</sup>; Artuzi, J.P.<sup>5</sup>

A cultura de anteras e/ou micrósoros possibilita a obtenção de plantas homozigotas em uma única etapa, permitindo a seleção de recombinantes genéticos desejáveis. Linhagens homozigotas, em espécies autógamas, podem ser estabelecidas através da duplicação espontânea de cromossomos, durante os primeiros estágios da cultura ou através da utilização de colchicina. Como as linhagens homozigotas estão disponíveis rapidamente, pode ocorrer uma diminuição de 30 a 50% no tempo necessário e, conseqüentemente nos custos para produzir uma nova variedade. Em plantas de polinização cruzada, altamente heterozigotas, a produção *in vitro* de haplóides, possibilita a obtenção de linhagens puras, que podem ser utilizadas como progenitores no desenvolvimento de híbridos ou como em aspargo, na produção de sementes que formaram plantas masculinas. Esta tecnologia vem sendo desenvolvida no Lab. de Cultura de Tecidos da UFPel, desde 1984, inicialmente para arroz e posteriormente para aspargo. São utilizadas anteras contendo grãos de pólen no estágio uninucleado de híbridos de aspargo e plantas F1 de arroz. As anteras são inicialmente colocadas em meios de indução de calos, MS para o aspargo e N<sub>6</sub> para o arroz. Os calos formados são transferidos para meios de regeneração MS com alto teor de citocininas. As taxas de formação de calos e gemas, tanto em aspargo como em arroz, variaram conforme o genótipo e o meio utilizado. Em aspargo, o melhor meio de indução foi o meio MS com 2 mg/l ANA + 0,5 mg/l Kin + 30 g/l sacarose, com resultados constantes e obtendo-se até 68,1% quando meio líquido e 41,6% em semi-sólido. Para o arroz, o melhor meio de indução foi o N<sub>6</sub> + 2,0

<sup>1</sup> UFPel, Depto. de Zoologia e Genética

<sup>2</sup> UFPel, Depto. de Botânica

<sup>3</sup> CPACT/EMBRAPA

<sup>4</sup> Pós-graduanda em Agronomia, UFPel

<sup>5</sup> Bolsista de Iniciação Científica, UFPel

mg/l ANA + 0,5 mg/l Kin com até 90,0% de indução de calos. Com relação a regeneração de gemas em aspargo o melhor meio foi o MS + 1,2 mg/l BAP e dependendo do genótipo utilizado a adição de glutamina demonstrou bons resultados. No arroz, o percentual de formação de gemas atinge até 53,0%, dependendo do genótipo em meio MS + 4 mg/l Kin + 1 mg/l ANA.

## MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS

Mello-Farias, P.C.<sup>1</sup>; Peters, J.A.<sup>1</sup>; Nakasu, B.H.<sup>2</sup>; Winkler, L.<sup>1</sup>; Wendt, S.<sup>1</sup>

A pêra é uma fruta de clima temperado de grande importância nacional, tendo em vista seu alto consumo. Através do uso de micropropagação pode-se obter uma grande quantidade de mudas livres de doenças, em um espaço mais curto de tempo, em comparação com o método tradicionalmente utilizado na propagação da pereira. No entanto o uso da cultura de tecidos de pereira tem apresentado baixos rendimentos quanto às taxas de multiplicação e enraizamento. Foram utilizadas brotações de porta-enxertos de pereira *Pyrus calleryana* D-6, *P. calleryana* D-12 e "Old Home" x "Farmingdale" 9, em diversos meios de cultura nas fases de multiplicação e enraizamento. A melhor taxa de multiplicação foi obtida com meio MS + 2,0 mg/l de BAP, nos três genótipos utilizados. Quanto ao enraizamento, os genótipos comportaram-se distintamente em relação aos tipos e concentrações de auxinas utilizadas. As maiores taxas de enraizamento foram obtidas em solução de imersão com ANA nas concentrações de 100 a 200 mg/l.

A roseira (*Rosa* sp.) é uma cultura ornamental de importância mundial, e atualmente no Brasil está espalhada em todos os quadrantes do território nacional. O experimento tem o objetivo de determinar técnicas para a micropropagação da roseira, que possibilitem a obtenção de grande número de plantas saudáveis e uniformes e possível floração *in vitro* através de meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de BAP, ANA e AG3. O melhor meio para multiplicação de brotos foi o MS + BAP (0,9 mg/l) inclusive obtendo-se pequenos botões florais.

O eucalipto (*Eucalyptus* sp.) é uma espécie florestal de grande importância econômica na região sul do Brasil por ser considerada de uso múltiplo. Com relação a Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*), as sementes têm baixa germinabilidade com uma pequena percentagem de

<sup>1</sup> UFFEL, Depto. de Botânica

<sup>2</sup> CPACT/EMBRAPA

plantas obtidas, ocorrendo um déficit de mudas para o estabelecimento de novas áreas. Estão sendo feitos ensaios preliminares de estabelecimento inicial destas culturas *in vitro* com meio WPM com diferentes concentrações de BAP e AIA.

## TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

Peters, J.A.<sup>1</sup>; Campos, M.A.<sup>2</sup>; Rosinha, G.M.<sup>2</sup>;  
Monte-Neshich, D.C.<sup>3</sup>; Pierobom, C.R.<sup>4</sup>

As técnicas de engenharia genética possibilitam a transferência de genes úteis à cultivares comerciais, permitindo a incorporação de características herdáveis sem a necessidade de destruição de genótipos valiosos, que se tem obtido como resultado de muitos anos de cruzamentos e seleções. O uso destas técnicas, para a introdução de resistências a enfermidades, insetos e estresses ambientais em plantas, está sendo explorado à nível mundial. É possível introduzir genes específicos em plantas através da transferência direta por bombardeamento ou mediados por *Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes*. Em função da importância econômica das culturas da batata e do arroz, para o Sul do Brasil, iniciou-se, primeiramente, o trabalho para introduzir genes de resistência ao PVY e PVRL em batata cv. Baronesa. Atualmente, estamos desenvolvendo uma metodologia adequada para regeneração direta de brotos a partir de internós de plantas cultivadas *in vitro*. Os resultados obtidos são promissores, obtendo-se taxa de regeneração superior a 40%. Simultaneamente, estão sendo realizados testes de desenvolvimento de plantas *in vitro* à diferentes antibióticos. Por outro lado, em arroz, aproveitando o sistema de regeneração de brotos desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFPEL, busca-se a introdução do gene *rolA*, que reduz o crescimento de plantas, visando principalmente o estabelecimento de um protocolo eficiente para a transformação direta, através do método biolístico.

<sup>1</sup> UFPEL, Depto. de Botânica

<sup>2</sup> Alunas de Pós-Graduação em Agronomia

<sup>3</sup> CENARGEN-EMBRAPA

<sup>4</sup> UFPEL, Depto. de Fitossanidade

## PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS DA EMBRAPA-CNPUV

Oliveira, P.R.D. de<sup>1</sup>; Kuhn, G.B.<sup>2</sup>;  
Scanagatta, V.<sup>3</sup> e Milani, M.L.<sup>4</sup>

O Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da EMBRAPA iniciou suas atividades em 1980. Desde sua criação, a ênfase dos trabalhos foi direcionada à micropropagação de videira, objetivando a multiplicação de germoplasma com identidade varietal e livre de vírus, destinado à formação de viveiros e à difusão de novas cultivares. Nesta mesma linha inserem-se, também, a conservação *in vitro* de germoplasma e a produção de plantas para testes fitopatológicos. No processo de micropropagação são utilizados explantes obtidos de segmentos caulinares, constituídos por uma gema, os quais são cultivados em tubos de ensaio utilizando o meio de Galzy, sob fotoperíodo de 16/8h e temperatura 24±2°C. São realizadas repicagens após o período médio de 50 dias. O Laboratório liberou, nas safras de 1992 e 1993, cerca de 7.000 mudas da cv. Alwood destinada à produção de suco. Na safra de 1994, para atender a uma demanda da iniciativa privada, foram obtidas ao redor de 2.000 matrizes certificadas da cv. Flora. O resgate de embriões imaturos é uma linha de pesquisa mais recente e resultou de cooperação com o Instituto Agrônômico de Campinas. Esta atividade já está no segundo ano e busca aumentar a eficiência na obtenção de progênie apirênicas dentro do programa de melhoramento genético de uvas de mesa. No ciclo 1992/93 foram realizados dezoito cruzamentos, obtendo-se regeneração de plantas em 50% deles. No ciclo atual, está sendo conduzido um ensaio direcionado à melhoria desta técnica, através do teste de alternativas de meios de cultura na fase de pós-germinação

<sup>1</sup> Eng. Agr., Dr., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV), Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS

<sup>2</sup> Eng. Agr., MS, EMBRAPA-CNPUV

<sup>3</sup> Assistente de Pesquisa II, EMBRAPA-CNPUV

<sup>4</sup> Bolsista ITI RHAE/CNPq

dos embriões resgatados, com a finalidade de acelerar a formação de plantas normais. Prevê-se para o futuro: a realização de pesquisas buscando a melhoria na multiplicação de algumas cultivares de videira; a rotinização do resgate de embriões; e a implementação de outras técnicas que possam produzir resultados aplicáveis para a viticultura.

CULTURA "IN VITRO" DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)<sup>1</sup>Ferreira, A.G.<sup>2</sup>; Cassol, B.<sup>2</sup>; Leal, C.M.<sup>3</sup>; Silveira, T.S.<sup>3</sup>; Thomé, G.H.<sup>4</sup>

O objetivo dessa linha de pesquisa é a obtenção de plântulas e, conseqüentemente, mudas de erva-mate, através da cultura *in vitro* de embriões zigóticos, embriogênese somática e organogênese direta e indireta. A técnica da cultura de embriões zigóticos *in vitro* tem sido utilizada no desenvolvimento dos embriões rudimentares e como um meio potencialmente eficaz para a propagação da erva num curto período de tempo. Tem sido observado que as respostas das plantas são individuais, variando de ano para ano. As plântulas obtidas através desta técnica apresentam enraizamento e vigor críticos, e para superar estas dificuldades estão sendo testadas algumas variáveis nas diferentes fases do protocolo. Para a embriogênese somática, estão sendo usados como explantes, cotilédones e hipocótilos de plântulas desenvolvidas *in vitro*. Para a obtenção de calos os explantes estão sendo cultivados em meio MS suplementado com glutamina e diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, na luz e no escuro. Os calos obtidos serão repicados em meio MS contendo diferentes balanços hormonais (2,4-D/BAP) e suplementação de KNO<sub>3</sub>. A organogênese está sendo testada utilizando-se como explante hipocótilos de plântulas desenvolvidas *in vitro*, sendo os mesmos submetidos à luz e escuro e diferentes balanços hormonais NAA/BAP, para a obtenção de organogênese direta e/ou indireta, conforme o tratamento aplicado.

---

<sup>1</sup> Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, UFRGS - Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Bolsista CNPq

<sup>3</sup> Bolsista CNPq-RHAE

<sup>4</sup> Bolsista FAPERGS

## CULTURA "IN VITRO" DE LEGUMINOSAS

Santarém, E.R.<sup>1</sup>; Silveira, T.S.<sup>2</sup>; Silva, A.A.<sup>2</sup>; Aquila, M.E.A.<sup>3</sup>; Ferreira, A.G.<sup>4</sup>

Sucesso tem sido obtido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Depto. de Botânica da UFRGS na propagação *in vitro* de leguminosas. Em soja, tanto embriogênese somática (Santarém, 1992) como organogênese (Thomé, 1993) já foram obtidas em algumas cultivares brasileiros. Em *Senna macranthera* não há relatos sobre a regeneração de plantas pelas técnicas de cultura de tecidos.

O protocolo de organogênese proposto para regeneração de plantas de soja foi aplicado em nós cotiledonares de sementes germinadas de *S. macranthera*, visando a indução de gemas adventícias. A cultura foi desenvolvida em 3 etapas. A fase de indução de gemas (fase 1), os explantes foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de 30 g/l de sacarose, BA (2,5 mg/l) e NAA (0,04 mg/l). Após 2 semanas neste meio, a gema principal foi retirada e descartada. Na fase de multiplicação (fase 2), os agregados de gemas adventícias foram transferidas para meio com concentração reduzida de BA (0,38 mg/l) e o NAA foi substituído por IBA (0,005 mg/l). As gemas que se desenvolveram foram transferidas para fase enraizamento (fase 3), na qual o meio de cultura era composto de sais de MS (metade da concentração), 20 g/l de sacarose, 2 g/l de carvão ativado. Como regulador de crescimento nesta fase foi utilizado IBA adicionado ao meio na concentração de 1 mg/l ou em pulsos (200 mg/l) por 1, 2, 5 e 10 min. Os agregados com as gemas restantes foram mantidos na fase 2. Os resultados indicam que é possível manter a proliferação de gemas adventícias normais por mais de 7 meses. Os

<sup>1</sup> Bolsista CAPES

<sup>2</sup> Bolsista RHAE-CNPq

<sup>3</sup> Professora Assistente - UFRGS

<sup>4</sup> Professor Titular - UFRGS, bolsista CNPq  
Subvenção: CNPq

tratamentos de pulsos com IBA por 1, 2 e 5 min. promoveram a formação de raízes em, aproximadamente, 50% das gemas após 20 dias. Sem estes tratamentos, o enraizamento foi inferior a 20% e ultrapassou os 40 dias.

Em soja, utilizando o protocolo de embriogênese somática previamente descrito, está sendo realizado o dessecamento dos embriões obtidos, objetivando o aumento de vigor das plantas regeneradas.

#### Bibliografia

SANTARÉM, E.R. 1992. diss. Botânica. UFRGS.

THOMÉ, G.C.H. 1993. diss. Botânica. UFRGS.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. *Physiol. Pl.*, 15:473-497

## CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM AVEIA, BATATA, TOMATE E MORANGO NA FACULDADE DE AGRONOMIA DA UPF

Grando, M.F.<sup>1</sup>; Calvete, E.O.<sup>2</sup>; Eichler, L.<sup>3</sup>; Santos, C.M. dos<sup>4</sup>; Vivian, L.R.<sup>4</sup>; Hekcler, J.P.<sup>4</sup>; Silva, C.<sup>4</sup>; Fontaneli, R.S.<sup>4</sup>; Tomazini, S.V.<sup>4</sup>; Negrão, N.<sup>4</sup>; Missel, P.C.<sup>4</sup>

O Laboratório de Cultura de Tecidos da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo iniciou suas atividades no ano de 1990, com o apoio do Grupo Integrado de Biotecnologia Vegetal do Rio Grande do Sul, FINEP, FAPERGS e CNPq.

Atualmente, estão sendo estudadas as seguintes espécies vegetais, Aveia (*Avena sativa*), Batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicum esculentum*) e morango (*Fragaria x ananassa*) em diferentes técnicas.

Para indução de variabilidade genética em aveia e tomate, está sendo utilizada a técnica de variação somaclonal. Foram estabelecidos os meios de cultura na indução de calo e regeneração de plantas. Calos estão sendo induzidos em diferentes genótipos de aveia. Após 3 gerações de avaliações de somaclones de aveia a nível de campo, foram selecionados materiais com características agrônômicas superiores como precocidade, rendimento e estatura entre outras. Em tomate, estão sendo colhidos frutos R<sub>1</sub> para posterior avaliação em ambientes protegidos com o objetivo principal de selecionar plantas tolerantes ao frio.

Cruzamentos intergenéricos entre aveia x milho e aveia x milho estão sendo empregados para obtenção de plantas haplóides em aveia. Esta técnica visa acelerar o processo de melhoramento genético. Foram testados diferentes genótipos de aveia bem como polinizadores (milho, milho, sorgo e teosinto) reguladores de crescimento e métodos de aplicação dos mesmos. Foram obtidas 4

<sup>1</sup> Bióloga MS, Professora da Universidade de Passo Fundo, Cx Postal 566, CEP 99001/970, Passo Fundo-RS

<sup>2</sup> Eng. Agr. MS, Profesora da Universidade de Passo Fundo

<sup>3</sup> Eng. Arg., Professora da Universidade de Passo Fundo

<sup>4</sup> Acadêmicos de Agronomia e Ciências Biológicas

plantas a partir de 72 embriões haplóides resgatados *in vitro*, em 1993.

A micropropagação e limpeza clonal estão sendo aplicados nas culturas da batata e morango. Para obtenção de batata-semente livre de vírus, meristemas foram cultivados, plantas indexadas e multiplicadas *in vitro*. Em 1993/94 foram plantadas 1600 mudas em telado e colhidos até o momento 320 kg de batata pré-básica. Foram colhidos 3.840 kg de básica I e pretende-se obter no ano de 1994, 42.000 kg de básica II. Este projeto faz parte do Pólo Tecnológico em Alimentos com o apoio do CONDEPRO e Secretaria de Ciência e Tecnologia. Na cultura do morango está sendo desenvolvida a técnica de cultura de meristemas e micropropagação.

## PROTOPLASTOS DE MAÇÃ

Viégas, J.<sup>1,2</sup>; DelPonte, E.<sup>1,2</sup>; Girardi, C.L.<sup>3</sup>; Gnoatto, S.C.<sup>4</sup>; Eckert, M.I.<sup>5</sup>; Rodrigues, A.C.<sup>6</sup>; Passianoto, C.<sup>1,2</sup>; Soares, L.A.S.<sup>4</sup>; Silva, J.B.da<sup>7</sup>

Com a finalidade de adequar técnicas de isolamento de protoplastos de maçã para utilização dos mesmos em seleção *in vitro*, fusão somática, variação protoclonal e fisiologia pós-colheita, foram processados mesófilo foliar dos enxertos "Gala Vermelha", "Gala SM" e "Braeburn" e dos porta-enxertos Maruba e M-26, assim como polpa de fruto da cv. "Golden Delicious".

A utilização de Pectolyase Y-23 0,1 a 0,5% Cellulase Y-C 0,75 a 1,0% dissolvidas em MS (diluído 10x) acrescido de solução antioxidante e sacarose 0,3 M, leva a boa produção de protoplastos, após 6 a 8 horas de incubação do mesófilo foliar dos porta-enxertos. Para os enxertos "Gala Vermelha" e "Gala SM" a combinação Pectolyase Y-23 0,5% e Cellulase Y-C 1,5%, diluída no mesmo meio acima citado, foi efetiva em cerca de 6 a 7h, mas para cultivar Braeburn causou rompimento dos protoplastos após 4,5 horas.

A técnica de obtenção de protoplastos de mesófilo foliar de maçã continua sendo adequada para possibilitar melhores condições de purificação de material, assim como cultivo e regeneração do mesmo.

Para o isolamento de protoplastos de polpa de maçã, foi estimada a molaridade do meio de digestão a partir do conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) de várias concentrações de sorbitol comparadas com o °Brix das polpas de maçãs nos estádios verdes, verde estocado, pré-climatérico, pós-climatérico e senescente. Os estádios de maturação dos frutos foram

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular, CFACT/UFPEL

<sup>2</sup> Departamento de Zoologia e Genética IB/UFPEL

<sup>3</sup> Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, IQG/UFPEL

<sup>5</sup> Departamento de Botânica, IB/UFPEL

<sup>6</sup> Curso de Pós-Graduação em Agronomia, UFPEL

<sup>7</sup> Departamento de Matemática e Estatística, IFM/UFPEL

Apoio Financeiro: CNPq, FAPERGS, RHAÉ, CAPES

determinados pelos testes de °Brix, textura e teor de amido. A solução de digestão mais efetiva foi a com 100mM de CaCl<sub>2</sub>, 10mM MES-NaOH, Caylase 0,5%, Pectolyase Y-23 0,01% e manitol (0,7 M para frutos verdes e verdes estocados e 0,8 M para pré e pós-climatéricos e senescentes). Os protoplastos de polpa de maçã apresentam vacúolos que ocupam cerca de 80% da área celular e possuem uma alta viabilidade até 4 horas pós-isolamento, podendo, portanto, ser utilizados em estudos de fisiologia pós-colheita durante este período.

## PROTOPLASTOS DE OLERÍCOLAS

Viégas, J.<sup>1,2</sup>; Chaves, M.F.B.<sup>1</sup>; Cruz, R.P.<sup>1,2</sup>; Gomes-Oliveira, I.V.<sup>2</sup>; Scur, L.<sup>3</sup>; Azevedo, C.S.S.<sup>1</sup>; Barraz, A.N.<sup>1,2</sup>; Chalá, C.<sup>1,2</sup>; Mauch, C.R.<sup>1</sup>; Salamoni, A.<sup>1,2</sup>; Augustin, E.<sup>4</sup>; Costa, D.M.<sup>4</sup>; Peters, J.A.<sup>5</sup>; Silva, J.B.da<sup>6</sup>

Com o objetivo de adequar as técnicas de isolamento de protoplastos de aspargo e batata que possibilitem a utilização dos mesmos para seleção *in vitro*, fusão somática, assim como aproveitamento da variação protoclonal que ocorrer, foram processados explantes de vários tecidos; de plantas de várias origens; com a utilização das enzimas Pectolyase Y-23 e Cellulase Y-C.

Foram analisados os genótipos G27 (fêmea), M14 (macho) e os híbridos G27 x 14, G27 x 22-8 e 47 x 22-8 de aspargo (*Asparagus officinalis* L.), dos quais foram obtidos protoplastos a partir de cladódios e turhões de plantas crescidas em câmara de crescimento, e de calos e gemas *in vitro*. Os protoplastos obtidos são viáveis, sendo que cladódios apresentam produção superior ( $\alpha=0,01$ ) aos demais explantes. Utilizou-se Pectolyase Y-23 0,5% e Cellulase Y-C 1% dissolvidas em sais CPW (sem CaCl<sub>2</sub>), acrescido de manitol (0,4 M para turhões e 0,9 M para os demais explantes). Após 40 dias em MS modificado, foram formadas microcolônias .

Protoplastos de calos de turhão do clone M14 e do híbrido 47 x 22-8 foram submetidos a 6 concentrações de filtrado de cultura de *Fusarium* spp. (100%, 50%, 20%, 10%, 5% e 0%), verificou-se que 47 x 22-8 é mais tolerante que o clone M14.

Os genótipos de batata, *Solanum tuberosum* cultivada (cv. Baronesa, Baronesa Branca, Baronesa Pinta Rosa, Santo Amor, Santa Silvana, Macaca, Trapeira, Monte Bonito e Piratini) e *S. commersonii*

<sup>1</sup> LB,CPACT/UFPel

<sup>2</sup> DZG,IB/UFPel

<sup>3</sup> DB,CCBS/UCS

<sup>4</sup> CPACT/EMBRAPA;

<sup>5</sup> DB,IB//UFPel

<sup>6</sup> DME,IFM/UFPel

Apoio Financeiro: FAPERGS, CNPq/RHAE, CAPES

spp. *commersonii* (clones 34, 35, 39, 40, 77, 92, 97, 133 e 134) produziram protoplastos após digestão da parede celular com Cellulase Y-C 0,75% e Pectolyase Y-23 0,1% dissolvidas em MS modificado. Ocorreram diferenças significativas entre cultivares comerciais, entre clones silvestres, assim como entre comerciais e silvestres, sejam cultivados em câmara de crescimento ou telado. Em telado, a silvestre mais produtiva foi o clone 133 e a cultivada foi Trapeira. Já em câmara de crescimento, Trapeira foi uma das menos produtivas. As plantas crescidas em câmara de crescimento produzem um número de protoplastos/ml significativamente maior que as cultivadas em telado.

Protoplastos, de cores rosa claro a lilás forte, foram isolados de brotos de tubérculo e, de cores amarelo claro a marrom amarelado, de casca de tubérculo, utilizando Pectolyase Y-23 0,4% e Cellulase Y-C 3,0% em MS modificado acrescido de solução antioxidante.

O aspargo possui genótipos recalcitrantes à regeneração de protoplastos e o material isolado de batata apresenta alto grau de contaminação, quando a planta doadora é cultivada em câmara de crescimento ou telado. Está sendo processado, atualmente, material de cultura *in vitro*, tanto calos como gemas, e sendo realizadas modificações nos meios de isolamento e cultivo.

## CITOLOGIA DE PLANTAS CULTIVADAS "IN VITRO"

Viégas, J.<sup>1,2</sup>; Bobrowski, V.L.<sup>2</sup>; Eckert, M.I.<sup>3</sup>; Scur, L.<sup>4</sup>; Avozani, O.A.<sup>5</sup>; Azevedo, C.S.S.<sup>1</sup>; Barraz, A.N.<sup>2</sup>; Galli, L.<sup>5</sup>; Karnopp, L.M.<sup>1</sup>; Mendes, M.S.<sup>6</sup>; Augustin, E.<sup>7</sup>; Costa, D.M.<sup>7</sup>; Magalhães Jr., A.<sup>7</sup>; Peters, J.A.<sup>3</sup>; Roth, M.G.M.<sup>2</sup>

Objetivando estudar, a nível citológico, as variações ocorridas durante o processo de cultivo *in vitro*, estão sendo verificados os cromossomos mitóticos de calos e plantinhas *in vitro* e a meiose e o pólen dos regenerantes obtidos, sendo as plantas doadoras usadas como controle.

Em aspargo, as metáfases de ponta de raiz e a ponta de turião das plantas doadoras mostraram possuir  $2n=20$ , enquanto que calos de turião apresentaram células com vários níveis de ploidia, chegando a ultrapassar 100 cromossomos. O grande número de cromossomos, nas células com ploidias elevadas, dificulta o espalhamento e conseqüente contagem cromossômica. O pré-tratamento para os três tipos de tecidos foi realizado com água destilada 0°C por 15 a 17,5 horas. A análise miótica de regenerantes de cultura de anteras de aspargo, estabelecidos a campo desde 1989, mostrou aumento do nível de ploidia e irregularidades como cromossomos retardatários, pontes e tétrades com células de tamanhos diferentes e diminuição ou aumento de micrósporos. Os grãos de pólen apresentaram tamanhos diferentes e viabilidade média.

A técnica para obtenção de placas metafásicas em ponta de raiz de batata, originada de tubérculo ou de semente, está em fase final de adequação. Os melhores resultados obtidos, até o momento, foram com pré-tratamento de 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 0,002 M a 18-20°C por 5 horas, que parece diminuir as aderências entre os

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular CPACT/UFPel

<sup>2</sup> Dep. Zoologia e Genética, IB/UFPel

<sup>3</sup> Dep. Botânica, IB/UFPel

<sup>4</sup> Dep. Biologia, CCBS/UCS

<sup>5</sup> Curso de Pós-Graduação em Agronomia, UFPel

<sup>6</sup> FZVA/PUC-Urugualana

<sup>7</sup> Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado/EMBRAPA

cromossomos. A análise do pólen de plantas doadoras (4 cultivares de *Solanum tuberosum*, *S. commersonii* ssp. *commersonii* e *S. commersonii* ssp. *malmeanum*) mostrou que apenas 9 a 24% das tétrades são normais. A viabilidade do pólen dos genótipos silvestres é significativamente maior ( $\alpha=0,05$ ) que a dos comerciais. As baixíssimas taxas de viabilidade ou a ausência de germinação *in vitro* do pólen dos cultivares de *S. tuberosum* indicam esterilidade masculina, não as recomendando como polinizadoras. O teste de coloração do pólen superestima a viabilidade do pólen, mas seus resultados podem ser correlacionados com os do teste de germinação *in vitro*. O tamanho maior do pólen dos genótipos cultivados e o menor dos genótipos silvestres são compatíveis com os níveis de ploidia 4x e 2x, respectivamente.

Os cromossomos de ponta de raiz de plantinhas *in vitro*, regeneradas de cultura de anteras de 7 genótipos de arroz híbrido, mostraram que 5 possuíam  $2n=24$  (mesmo número das plantas controle) e apenas 2 eram  $n=12$ . O pré-tratamento utilizado foi com 8-HQ 0,002 M por 2,5 a 3 horas, a temperatura de 18-20°C.

PRODUÇÃO DE DEMETOXITABERNULOSINA EM CULTURA DE CÉLULAS DE *Rauwolfia sellowii* Müll Agr.<sup>1</sup>

Batista, C.V.F.; Rech, S.B.; Santos, A. L.; Villetti, D.S.; Schripsema, J.; Henriques, A.T.

Frente a necessidade de buscar rotas alternativas para a produção de fármacos com moléculas complexas, de difícil obtenção via síntese orgânica, bem como forma de preservação ambiental frente a extração desenfreada de matéria prima vegetal, a biotecnologia vegetal surge como uma nova e promissora rota de obtenção de princípios ativos vegetais biologicamente ativos.

A *Rauwolfia sellowii* é uma planta nativa do sul e sudeste brasileiro. O extrato alcaloidífero das cascas das raízes é comercializado no Brasil como antihipertensivo, tendo sido comprovada cientificamente sua ação hipotensora como um todo e em subfrações do extrato. Estudos químicos desenvolvidos em diferentes centros de pesquisa tem identificado diversos alcalóides como potenciais agentes hipotensores. Dentre estes se destacam a reserpina (medicamento essencial listado pela Organização Mundial de Saúde), serpentina e reserpilina. Cita-se também a presença de ajmalicina um notável ativador da circulação cerebral.

Na obtenção de culturas celulares a partir de folhas, usou-se o meio de Gamborg B5-15 para indução de calos. Estes foram repicados até a obtenção de uma linhagem celular estável, com os quais obteve-se cultura de células em suspensão. As culturas líquidas foram sucessivamente transferidos de meio em intervalos regulares de três semanas, determinado por uma estabilização na curva de desassimilação, obtidas por diferença gravimétrica por perda de CO<sub>2</sub>. O fotoperíodo aplicado foi 12 horas de luz e 12 horas no escuro, otimizado por experimentação.

Utilizando-se o método clássico de Stass-Otto para extração dos alcalóides, obtivemos extratos alcaloidíferos total das folhas, calos,

<sup>1</sup> CPG Ciências Farmacêuticas - UFRGS

células em suspensão e meio de cultura. Todos os extratos, das diferentes matérias-primas, foram analisados por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), revelando produções significativas de demetoxitabernulosina nos extratos de culturas vegetais. Outros alcalóides indólicos como 19,20-epoxiakuamicina, picrinina e vomilenina também foram caracterizados.

QUANTIFICAÇÃO DE PILOCARPINA EM CULTURAS DE CÉLULAS DE *Pilocarpus pennatifolius*<sup>1</sup>

Rech, S.B.; Reginatto, F.; Lopes, S.; Henriques, A.

*Pilocarpus pennatifolius*, Rutaceae, constitui fonte única de obtenção industrial de pilocarpina. Este alcalóide imidazólico, de grande importância econômica, é utilizado na terapêutica do tratamento do glaucoma, sob a forma farmacêutica de colírio.

As vendas de pilocarpina nos Estados Unidos em 1989 foram estimadas em vinte e oito milhões de dólares e o kg de folhas secas de *Pilocarpus* custou, no mesmo ano, vinte e oito centavos de dólar, para a indústria americana (Elisabetsky, 1991). Colírios contendo 1% de pilocarpina são vendidos no Brasil por US\$ 4,0/10 ml.

A produção de pilocarpina *in vitro* é promissora, pois ao contrário do cultivo da planta, pode-se obter um produto de alta qualidade em quantidades previsíveis.

No presente trabalho foram estabelecidas as condições ideais para o desenvolvimento de calos friáveis e de crescimento rápido, iniciadas as culturas de células em suspensão e verificada a presença de pilocarpina na espécie em estudo e a sua obtenção nos tecidos vegetais cultivados *in vitro*.

O meio MS (Murashige e Skoog) mostrou-se o mais adequado para o cultivo *in vitro* de *Pilocarpus pennatifolius*. Variando-se a concentração de hormônios do meio de cultura os calos desenvolveram-se melhor em altas concentrações de auxina (5µM NAA) e na ausência de citocininas.

A produção de pilocarpina é mantida quando as folhas são cultivadas *in vitro*.

<sup>1</sup> CPG Ciências Farmacêuticas - UFRGS  
CNPq/FAPERGS/PROPESP/UFRGS