

MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS CULTIVADAS POR MEIO DE HAPLODIPLOIDIZAÇÃO

Marcos Dhein¹; Chrislaine Yonara Schoenhals Ritter¹; Fabiana Raquel Mühl²; Neuri Antonio Feldmann³

Palavras-chave: gimnogênese, androgênese, biotecnologia.

Há muito tempo já são conhecidas plantas haploides, os quais apresentam apenas uma cópia de cada cromossomo característico da espécie, no entanto, a ciência não dispunha de maneiras para propaga-las. Estes organismos apresentam pureza genética diferenciada dos indivíduos diploides, pois se tornam di-haploides com a duplicação de seus cromossomos (BORÉM; MIRANDA, 2009).

O progresso no desenvolvimento de áreas de biologia molecular e celular tem favorecido avanços interessantes no melhoramento genético de espécies cultivadas, auxiliando principalmente na redução do tempo necessário para que as características desejadas nas plantas sejam inseridas, o que traz auxílio aos métodos mais tradicionais de desenvolvimento de espécies agrícolas (MORAES-FERNANDES, 2002a).

A técnica de melhoramento através da haplodiploidização favorece a obtenção de uma nova linhagem em apenas uma ou duas gerações, encurtando o período em relação ao melhoramento convencional que pode levar cerca de cinco a oito anos para estabelecer uma população homogênea, o que depende da fixação e expressão dos genes de interesse. Neste sistema, as plantas são originadas *in vitro* através dos gametas, apresentando um genoma apenas que serão duplicados artificialmente, tornando-se duplo-haploides, sendo assim, já são linhagens inteiramente homozigotas (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998; MORAES-FERNANDES, 2002b; BORÉM; MIRANDA, 2009).

O desenvolvimento de plantas através da técnica do uso de anteras foi relato por Guha e Mahashwari em 1964, em trabalhos com *Datura inoxia*, quando observaram a regeneração de calos embrionários oriundos de pólen imaturo, os quais se desenvolveram e formaram plântulas

¹ Acadêmicos do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI, Itapiranga, SC. E-mail: marcos.dhein@hotmail.com.

² Bióloga, Doutora em Agronomia, Professora do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

³ Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, Coordenador e professor do curso de Agronomia do Centro Universitário FAI.

que posteriormente foram confirmadas como haploides (GUHA; MAHASHWARI, 1967 apud MILANI; CARVALHO, 2005).

De maneira geral, a cultura de anteras é realizada com a própria antera, o micrósporo ou grão de pólen, desde que estes se apresentem aptos e os genótipos com potencial genético para regenerar novas plantas, sendo estabelecido em placas de Petri com solução nutritiva, contendo basicamente minerais, vitaminas e fitorreguladores, o que favorece a divisão do grão de pólen, formando estruturas denominadas de calos embrionários (MAZZOCATO, 2005; MILANI; CARVALHO, 2005).

O momento mais apropriado para a coleta de anteras, em relação a temperatura, deve ser a mesma condição para o ótimo desenvolvimento da planta, sendo que, neste momento os grãos de pólen estarão mais aptos a desenvolverem embriões, obtendo assim, melhores resultados. Outro ponto a ser observado, é a fase de desenvolvimento do micrósporo que preferencialmente, deve estar na fase uninucleada onde promoverá maior sucesso no surgimento de calos vegetativos, esta metodologia é aplicável a maioria das espécies (PETERS et al., 1999 apud MILANI; CARVALHO, 2005).

Vasil e Nitsch (1975) citados por Peters, Bobrowski e Rosinha (1998) e posteriormente por Milani e Carvalho (2005) relatam o período que precede a mitose do micrósporo ao término desta divisão como o momento crítico para a indução da rota androgenética, devido que nesta fase há maiores níveis de rRNA e tDNA sendo sintetizados, e é neste momento que a coleta dos grãos de pólen aparentemente se tornam mais aptos para a utilização nos meios de cultivo. Apesar destes cuidados, apenas 0,5 a 5,0% dos micrósporos irão se desenvolver e formar plântulas.

Após a coleta e desinfecção das anteras é realizado pré-tratamento a baixas temperaturas, que antecede a deposição em meio de cultura, este processo favorece o desenvolvimento dos micrósporos e é efetivo em poáceas. Este tratamento a frio retarda o desenvolvimento do micrósporo, resultando em posteriores divisões mitóticas simultâneas, influenciando ainda, na consistência da membrana tornando-a um pouco mais resistente e favorece a presença de aminoácidos livres (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1998; MILANI; CARVALHO, 2005).

O meio de cultura para indução de anteras é preferencialmente semissólido, meios líquidos apresentam problemas com falta de oxigênio e geram maior número de plântulas albinas, também observado em condições de temperatura muito altas. De maneira geral, as temperaturas ótimas, para as diferentes culturas, se situa em torno de 22 a 28 °C. A luz tem influência sobre algumas espécies e a ausência dela é benéfica para espécies que formam calos

e, depois dos calos formados, estes devem ser expostos à luz progressivamente. Em diferentes espécies se tem observado bom desenvolvimento de embriões com a presença de 2% de CO₂ (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1998).

Mazzocato (2005) em trabalho realizado com cevada, relatou cinco tipos de estruturas regenerativas em anteras, onde houve estruturas indiferenciadas ou amorfas, brotos albinos, brotos verdes, plântulas albinas e plântulas verdes, onde as plântulas verdes foram utilizadas para serem cultivadas em meio nutritivo para desenvolverem raízes e folhas. Nas gramíneas geralmente, acontecem muitos casos de plântulas albinas. O autor ainda cita a composição do meio de cultura, o pré-tratamento e o genótipo como os principais fatores que se relacionam com a maior regeneração de plantas verdes.

O grão de pólen é uma célula haploide e quando este é cultivado *in vitro*, gera plantas haploides, que terão seus cromossomos duplicados com o uso de colchicina, um composto alcaloide extraído do açafrão, o qual atua na inibição do fuso mitótico, desse modo são geradas células com dois conjuntos cromossômicos, tornando a planta dupla-haploide, análogo a sua condição natural de planta diploide, porém com homozigose em todos os locos gênicos (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

Na natureza é possível que ocorra a polinização entre espécies diferentes ocorrendo a formação do zigoto, porém, o embrião desenvolvido neste caso é abortado devido ao endosperma não prosseguir seu desenvolvimento, resultado das barreiras pós-zigóticas. Em decorrência disso, caso esse embrião seja retirado e cultivado em meio de cultura é possível que desenvolva uma nova planta, que neste caso, pode ser de cruzamentos interespecíficos, intraespecíficos, intergenéticos e também entre espécies de famílias diferentes. Esta possibilidade se dá pela nutrição do embrião artificialmente, substituindo a função do endosperma (CANÇADO et al., 2009).

Especialmente em trigo, se realiza a fertilização do estigma com pólen proveniente de milho para obtenção de plantas haploides via gimnogênese. Neste processo o embrião híbrido imaturo é cultivado *in vitro*, onde os cromossomos somáticos são eliminados o que resulta na perda do genoma do milho logo após as primeiras mitoses do embrião (MORAES-FERNANDES et al., 2002a; BORÉM; MIRANDA, 2009).

No Brasil, os trabalhos de melhoramento genético via gimnogênese se deu logo no início da década de 90 com resultados não tão animadores, pouco tempo depois, com maior conhecimento referente as condições de plantas e desenvolvimento de milho para a produção de pólen fora de época, esta técnica se mostrou muito promissora e ganhou espaço nas linhas de pesquisa (MORAES-FERNANDES et al., 2002a).

Em casa de vegetação ou em telados, variedades de milho e linhagens de trigo, que podem ser oriundas a partir de F1, selecionadas da segregação de cruzamentos e mesmo cultivares de interesse, são cultivados em vasos, com condições de iluminação e temperatura favoráveis (SHEEREN et al., 1999).

Moraes-Fernandes et al. (2002a) descrevem o processo de gimnogênese no trigo. Primeiramente, é realizado a emasculação das espigas antes que o pólen amadureça, evitando que ocorra a autopolinização. Após alguns dias, quando o ovário estiver receptivo, se realiza a polinização do estigma do trigo com pólen de milho viável. Deste momento, decorrido 24 e 48 horas, se aplica logo abaixo da espiga, uma dose de 1 mL de 2,4-D a 10%, provendo auxílio para o desenvolvimento do embrião. Transcorridos cerca de duas semanas, as espigas são coletadas e retirados os grãos que foram formados, destes são excisados, de forma asséptica, os embriões para serem colocados em meio de cultura.

As espigas devem ser coletadas, bem como os embriões devem ser retirados dos grãos para que não morram em razão da decomposição do endosperma, o qual não se desenvolve, por motivo da instabilidade entre os genomas. O grão vai emurhecendo e ficando com coloração escura, com início do ápice para a base, sendo este, um bom momento para a retirada dos embriões, especificamente quando um terço do grão já esteja murcho. O tempo que o embrião haploide consegue permanecer é efêmero, não ultrapassando mais do que duas semanas (ANGRA et al., 1999; MICHEL, 2003).

A desinfestação mais comum realizada nos embriões envolve o uso de hipoclorito de sódio e etanol, estes promovem melhores resultados, umectantes e detergentes podem ser incrementados promovendo melhoria na desinfecção. Para a excisão dos embriões, a realização desta tarefa deve ser em câmara asséptica com auxílio de microscópio estereoscópico, possibilitando visualizar o embrião. O corte para retirada do embrião é geralmente localizado na região da micrópila e pode se espremer levemente o endosperma para que seja liberado. É imprescindível que na retirada do embrião tenha se o cuidado de manter o suspensor pois este apresenta função nutricional e sintetiza substâncias de crescimento e desenvolvimento inicial (HU; FERREIRA, 1998).

Os embriões são inoculados em meio de cultivo Batata 2. Dependendo da fase de desenvolvimento do embrião, suas necessidades nutritivas se alteram, quanto o mesmo está formado praticamente não necessita muita nutrição e quanto mais imaturo maior as necessidades de suplementação. Já na fase denominada de torpedo e fases anteriores, há a necessidade de suprir com sacarose, vitaminas e sais minerais, em estádios anteriores se faz ainda o uso de hormônios. Para o desenvolvimento, estes permanecem três dias em local com

ausência de luz e posteriormente vão para câmaras de crescimento, cerca de trinta dias. As plantas originadas dos embriões são transferidas para substrato nutritivo contendo vermiculita, onde irão se desenvolver (HU; FERREIRA, 1998; SHEEREN et al., 1999; MORAES-FERNANDES et al., 2002a).

Após estabelecida a planta haploide, precisa-se estabelecer a diploidia, neste caso, um duplo-haploide, semelhante aos indivíduos oriundos de micrósporos. Este processo pode ocorrer naturalmente, no entanto, na maioria dos casos é induzido com o uso da colchicina que tem ação na divisão mitótica, impedindo a polimerização das fibras do fuso se ligando as tubolinas, inibindo a migração polar dos cromossomos (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1998; NITSCH, 1983 apud CANÇADO et al., 2009).

Em plantas duplo-haploides, o momento de aclimatação é tão fundamental quanto os processos de cultivo *in vitro* e dos cuidados com as anteras e embriões, devido que estas plantas desenvolveram todo o processo inicial de crescimento em condições de assepsia, umidade e temperatura controladas, nutrientes disponíveis de forma balanceada, e então, necessitam alterar sua fisiologia para sobreviver em ambiente com umidade em situações discrepantes, sofrerão ataque de microrganismos podendo ser acometidas por moléstias, deverão desenvolver seu sistema radicular para buscar nutrientes, além de se adaptar as variações luminosas e iniciar o processo fotossintético (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990 apud ANGRA et al., 1999).

Cançado et al. (2009) comenta as observações de Peters, Bobrowski e Rosinha (1999) onde ressaltam a cultura de anteras com maior utilização em relação a de ovários, principalmente pelo fato das anteras poderem ser precursoras de maior número de novas plantas por possuírem elevado número de grãos de pólen que podem se desenvolver, em relação a um único óvulo, que, além disso, apresenta respostas inferiores em meio de cultura em relação aos micrósporos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento genético através da técnica de haplodiploidização tem favorecido a formação de novas cultivares em menor período de tempo se comparado ao melhoramento tradicional, principalmente por promover indivíduos homocigotos. Esta técnica é de grande importância para a agricultura, em especial para a formação de variedades de plantas perenes, que dependem de maior período de tempo para chegar a uma cultivar.

REFERÊNCIAS

ANGRA, D.C. et al. Cultivo de embriões em retrocruzamentos entre *Triticum aestivum* Thell. e *Agropyron elongatum* Host. & Beauv. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**: Brasília, v. 34, n. 2, p. 209-215, 1999.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.D. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFLA, 2009.

CANÇADO, G.M.A. et al. **Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 74-64, nov./dez. 2009.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) Culturas de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. **Cultura de embriões**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) Culturas de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998.

MAZZOCATO, A. C. **Cultura de anteras e embriogênese de genótipos selecionados de cevada (*Hordeum vulgare* L. spp. *vulgare*)**. 2005. 232 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MILANI, M.; CARVALHO, J.M.F.C. **Utilização de cultura de anteras no melhoramento de plantas**. Embrapa Algodão: Campina Grande, 2005.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. et al. **Haplodiploidização via gimnogenese no melhoramento de trigo na Embrapa Trigo**. In: BRAMMER, S.P.; IORCZESKI, E.J. (Org.) Atualizações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. et al. **Produção de linhagens duplo-haplóides e lançamento da cultivar trigo BR 43 na Embrapa Trigo, através da seleção simultânea para capacidade androgenética e caracteres agronômicos**. In: BRAMMER, S.P.; IORCZESKI, E.J. (Org.) Atualizações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. **Produção de haploides e duplo haploides**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) Culturas de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2004.

SHEEREN, P.L. et al. Melhoramento genético de trigo via linhagens duplo-haplóides, na Embrapa Trigo, no período 1995-1998. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo, n. 18, 1999, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. v. 1, p. 198-203.