

# Hibridação Somática em PLANTAS

## A IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES SELVAGENS COMO FONTE DE GENES

**E**m meados deste século, a produção por hectare de culturas como o trigo, soja e arroz cresceu cerca de 100% (tabela 1). Parte destes incrementos se deve à melhoria das condições de cultivo, porém o avanço maior foi decorrente do aprimoramento dos métodos de seleção que permitiram um melhor aproveitamento da variabilidade genética presente nestas espécies.

Por outro lado, a contribuição do

e, recentemente, a engenharia genética (através da tecnologia do DNA recombinante e das metodologias de transformação de plantas) e a hibridação somática.

A hibridação interespecífica tem sido extensivamente utilizada, e o sucesso deste método depende das relações filogenéticas entre as espécies envolvi-

*Incrementos na produtividade de várias culturas nos EUA entre 1930 e 1975, segundo Prescott-Allen (1988)*

Cultura	Incrementos em Produtividade
	(%)
Algodão	188
Amendoim	295
Arroz	117
Batata	311
Cana-de-açúcar	141
Milho	320
Soja	112
Trigo	115

germoplasma selvagem para esses avanços foi pequena, embora caracteres do tipo vigor e resistência a doenças, adquiridos de espécies não-domesticadas, tenham tido um grande impacto na produção da cana-de-açúcar. Outras culturas, como o algodão e particularmente o tomate, provavelmente não estariam sendo cultivadas em tão larga escala, não fosse a introdução de genes oriundos de espécies selvagens. A batata, por exemplo, está entre as primeiras culturas que se beneficiaram do germoplasma exótico.

As estratégias que têm sido aplicadas para expandir a variabilidade genética a partir da exploração do germoplasma selvagem são a hibridação sexual (interespecífica ou intergenérica)



Figura 1. Planta de maracujá *in vitro*.

das no cruzamento. Esta afinidade vai determinar a fertilidade dos híbridos e conseqüentemente o seu potencial para utilização em programas de melhoramento genético. Sucessivas gerações de retrocruzamento com o parental cultivado são conduzidas no sentido de introgridir a característica selvagem no parental recorrente e recuperar a performance da espécie comercial. Entretanto, esse método é limitado em certas espécies por barreiras de incompatibilidade: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto, porém ele é abortivo. Uma alternativa usada para contornar esse problema implica a excisão do embrião imaturo e



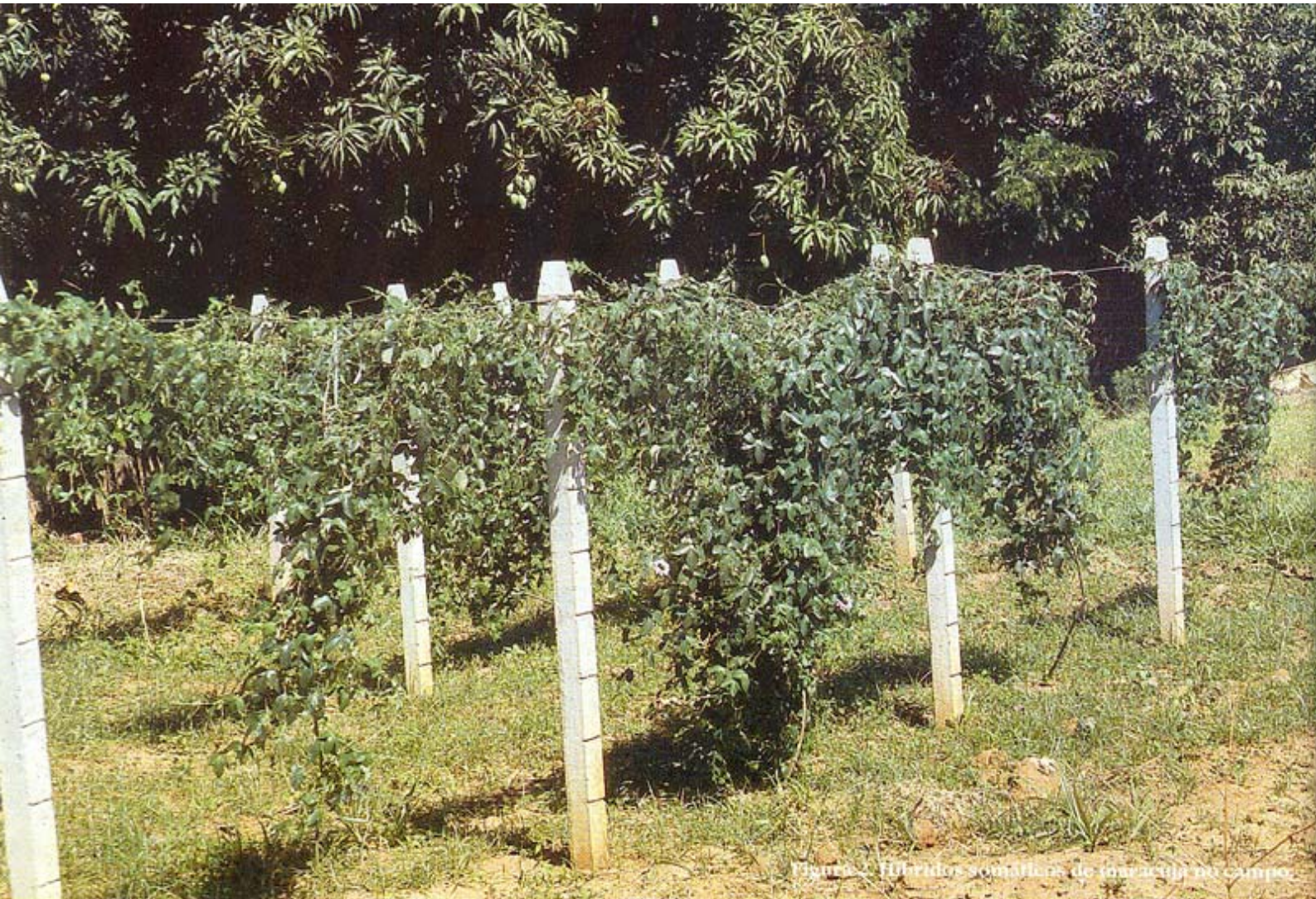


Figura 2. Híbridos somáticos de maracujá no campo.

o seu posterior desenvolvimento *in vitro*. Esse resgate tem facilitado, por exemplo, a incorporação de genes exóticos na cultura da batata. As duas outras estratégias incluem procedimentos biotecnológicos. A transformação genética de plantas tem sido vantajosa quando se dispõe das seqüências de DNA a serem transferidas, isto é, quando os genes de interesse foram identificados e clonados em um vetor, permitindo a produção de plantas transgênicas. Entretanto, ainda são poucos os genes que se têm disponíveis, e muitos deles, embora já seqüenciados e mapeados, correspondem a DNAs de tamanho grande, o que dificulta a sua clonagem e transferência.

Por outro lado, avanços recentes em pesquisa sobre cultura de tecidos vegetais, especialmente sobre a regeneração de plantas a partir de protoplastos, têm possibilitado a introgressão de genes a partir da fusão de células somáticas. Como resultado dessas pesquisas, um amplo espectro de híbridos com respeito à sua constituição nuclear tem sido produzido. A hibridação somática oferece também a oportunidade de se combinar citoplasmas diferentes na mesma célula. Essas combinações não podem ser produzidas por hibridação sexual, pois o

citoplasma materno é preferencialmente herdado. Além disso, avanços na tecnologia de fusão, incluindo-se a fusão assimétrica de protoplastos (o núcleo da espécie selvagem é fragmentado antes da fusão), têm contribuído para

uma aplicação mais imediata desta tecnologia no melhoramento.

#### *Isolamento e cultura de protoplastos vegetais*

Protoplastos são células desprovidas da parede celular. A remoção da parede se faz mediante tratamento enzimático que, em geral, reúne uma mistura de enzimas capazes de degradar individualmente a celulose, a pectina, a hemicelulose ou outros polissacarídeos componentes da parede celular. Alguns procedimentos são necessários para se obter protoplastos viáveis e em grandes quantidades (veja revisão de Fungaro & Vieira, 1989).

A fonte utilizada para o isolamento de protoplastos é variável e tem influência na sua obtenção e também no processo de regeneração da parede e na freqüência das divisões celulares que se sucedem. Protoplastos podem ser isolados de tecidos vegetais como o mesófilo foliar, de tecido cotiledonar, hipocotiledonar, de raízes e também de calos e suspensões celulares. A escolha dessa fonte baseia-se na capacidade de regeneração destes tecidos, em geral avaliada em experimentos preliminares. A condição fisiológica da planta doado-

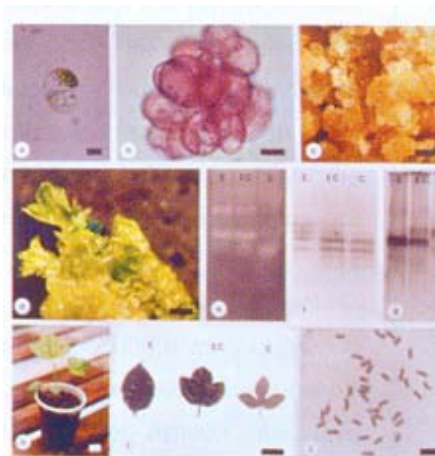


Figura 3. Processo de obtenção de um híbrido somático: fusão, colônia de células, calo, regeneração de brotos, eletroforeses de isoenzimas para seleção de híbridos verdadeiros, planta aclimatada, característica da folha híbrida intermediária aos pais e metáfase mitótica do híbrido de maracujá com 36 cromossomos.

ra é também importante. É conveniente manter uma coleção de plantas in vitro como fonte de tecidos para protoplastização.

Antes do isolamento, o tecido vegetal é cortado em fatias e plasmolisado em solução salina. Esta solução, assim como a mistura enzimática, deve ser preparada contendo um estabilizador osmótico. Este estabilizador (à base de açúcares, como o manitol e a sacarose) impede o rompimento da membrana plasmática ou, inversamente, a saída excessiva de água da célula. Após o tratamento enzimático, a mistura sofre lavagens sucessivas na mesma solução salina, seguidas de centrifugações brandas. Após o isolamento, procede-se à contagem e à avaliação da viabilidade dos protoplastos usando-se corantes vitais fluorescentes, como o diacetato de fluoresceína (veja Power & Chapman, 1995).

O cultivo de protoplastos se faz em meio de cultura rico em componentes orgânicos e inorgânicos, suplementado com fitorreguladores e concentrações adequadas de polissacarídeos que funcionam como estabilizadores osmóticos. Este cultivo é feito em placa de Petri, diretamente em meio líquido ou embebe-se a mistura protoplastos-meio de cultura em agarose ou outro agente gelificante. As densidades de cultivo devem ser definidas experimentalmente. Protoplastos embebidos em agarose suportam densidades maiores, pois estão imobilizados, o que não ocorre em meio líquido, onde as células tendem a se agregar, formando um precipitado. Culturas em agarose tendem a se desenvolver melhor e mais rapidamente.

Após a regeneração da parede celular, que deve ocorrer nas primeiras 24h de cultura, as células entram em divisão. As primeiras divisões são observadas em frequências que variam dependendo do genótipo e da espécie que se está trabalhando. As condições de cultivo são igualmente importantes. A osmolaridade da cultura é, então, progressivamente diminuída por adição ou substituição de parte do meio líquido por um meio de cultivo celular.

Na medida em que se sucedem as divisões celulares, pequenas colônias vão se formando. Estas são originárias

de uma única célula. A capacidade de sustentar divisões em cultura é medida por um parâmetro chamado plating efficiency (PE), que é dado pela relação entre o número de colônias formadas e o número inicial de células que entraram

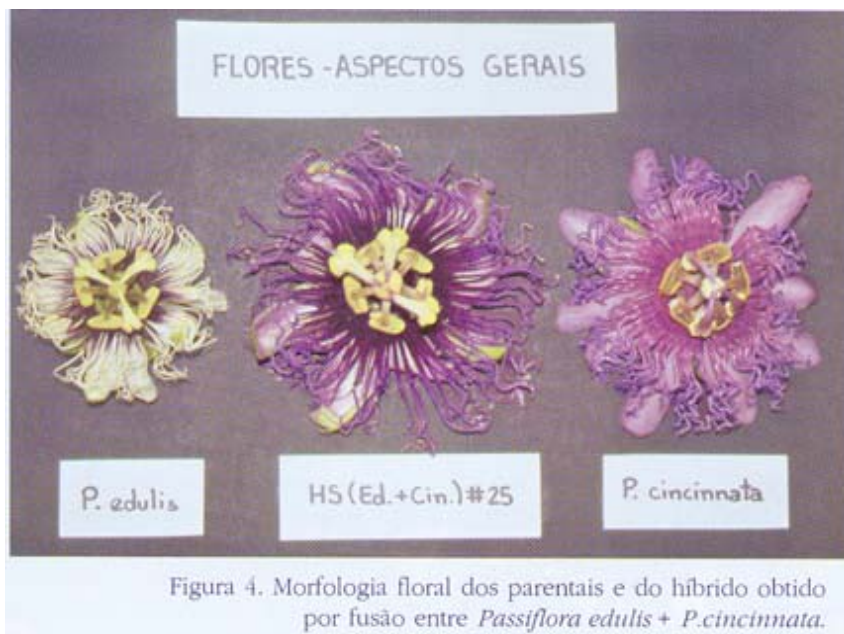
ques de corrente elétrica (eletrofusão). Na fusão mediada por PEG, protoplastos de espécies diferentes são colocados em contato, durante alguns minutos, na presença deste agente que é preparado em uma solução rica em íons Ca. Em seguida, procede-se à lavagem do PEG, que é tóxico à célula. A partir daí, para o cultivo dos produtos de fusão, adotam-se os procedimentos usuais da cultura de protoplastos.

A fusão elétrica ocorre em duas etapas. Primeiramente, as células são submetidas a uma corrente do tipo alternada, gerando um campo elétrico de alta força e fazendo com que os protoplastos se polarizem, dirigindo-se para o pólo de maior força (fenômeno conhecido como dieletroforese). A proximidade das membranas facilita a fusão que é provocada logo em seguida à aglutinação por

choques de corrente contínua. Estes choques provocam a abertura reversível de poros na membrana plasmática. Os rearranjos das membranas eletroporadas provocam a fusão de células adjacentes.

A fusão não é um evento dirigido. Ela pode ocorrer entre protoplastos de uma mesma espécie, formando homocários, ou entre espécies diferentes, dando origem aos heterocários. Técnicas sofisticadas de micromanipulação ou de citometria de fluxo podem ser adotadas para a seleção de heterocários. Para isso, é necessário utilizar marcadores morfológicos que permitam a identificação dos protoplastos oriundos das espécies envolvidas na fusão. Protoplastos verdes podem ser obtidos a partir de tecidos clorofilados, e protoplastos incolores, a partir de suspensões celulares. Este é o marcador mais usado, e que também permite o cálculo das taxas de fusão nos diversos experimentos.

Os produtos de fusão são cultivados até a fase de calo e em seguida colocados em meio de regeneração de brotos. Nos experimentos onde não houve seleção prévia de heterocários, a seleção pode ser feita na fase de calo ou de broto. A natureza híbrida do broto pode ser identificada por análises morfológicas ou cromossômicas. Na fase de calo, pode-se proceder à seleção pela análise de padrões eletroforéticos de proteínas totais e de isoenzimas. Nas análises eletroforéticas, o padrão de bandas das espécies parentais é caracterizado, procurando-se identificar bandas tí-



em divisão. A visualização das culturas é feita ao microscópio óptico invertido.

#### Regeneração de brotos

Geralmente, após 28 dias em cultura, as microcolônias podem ser vistas a olho nu. Nessa etapa, devem ser transferidas para meio sólido, onde darão origem a calos. A composição desse meio é baseada em formulações usuais que incluem sais e vitaminas, além de uma fonte de C e de fitorreguladores, principalmente auxinas. Em geral, a regeneração de brotos ocorre posteriormente à formação de calos, sob condições de luz e em meio cuja composição varia muito entre grupos de plantas, tais como mono e dicotiledôneas, gramíneas e leguminosas, e não há como generalizá-la. Esse processo de regeneração pode ocorrer pela via organogênica ou por embriogênese somática. Uma regeneração abundante de brotos é desejada, o que irá facilitar estudos posteriores ou a aplicação do sistema em experimentos de manipulação genética de transformação de protoplastos ou hibridação somática.

#### Fusão de protoplastos

A obtenção de híbridos somáticos depende fundamentalmente de mecanismos eficientes que promovam a fusão celular. Em plantas, a fusão pode ser mediada por um agente químico, como o polietileno glicol (PEG) ou por cho-

picas. A mistura física das amostras revela um padrão que corresponde à soma das bandas parentais que serve como controle para a identificação dos híbridos somáticos verdadeiros. Este é um sistema eficiente para a confirmação da natureza híbrida e que pode ser usado também na fase de broto.

#### *Aproveitamento comercial de híbridos somáticos*

A caracterização morfológica e o estudo do comportamento meiótico de híbridos somáticos, assim como avaliações de natureza agrônômica, vão delinear o seu potencial de aproveitamento em programas de melhoramento genético. Revisões sobre este assunto têm sido publicadas (Waara & Glimelius, 1995; Dornelas & Vieira, 1996), enfatizando o aproveitamento de híbridos somáticos no melhoramento de leguminosas, gramíneas e solanáceas, particularmente *Nicotiana* e *Solanum*.

A fusão de protoplastos tornou-se uma técnica bastante promissora para a introgressão de genes de interesse em espécies comerciais de *Brassica* e *Citrus*. Em brássicas, a maior parte dos trabalhos tem relatado a transferência de caracteres de herança citoplasmática, como a macho-esterilidade e resistência a herbicidas, e, mais recentemente, foram obtidos híbridos somáticos intertribais entre *Brassica napus*, a colza e *Thlaspi perfoliatum*, visando o incremento no teor de ácido nervônico no óleo de *B.napus*. Amostras de óleo extraído de 15 híbridos somáticos foram analisadas e uma quantidade significativamente maior de ácido nervônico foi encontrada (Fahleson et al., 1994).

Plantações de comerciais de *Citrus* freqüentemente são formadas por plantas com copa e sistema radicular de genótipos diferentes. Utilizam-se porta-enxertos mais bem adaptados a um determinado ambiente ou tolerantes a uma doença de solo, o que se reflete em uma melhor produção da variedade-copa. Segundo os especialistas, este sistema oferece a vantagem de se poder empregar métodos biotecnológicos, como a hibridação somática, em programas de melhoramento das variedades porta-enxerto, uma vez que a introgressão de genes de espécies selvagens não interfere nas características comerciais da variedade-copa. Segundo Grosser et al. (1990) a tangerina Cleópatra (*Citrus reticulata*) é um porta-enxerto de grande importância na Flórida, pois é tolerante à tristeza, exocorte, xiloporiose e ao estresse causado pelo frio e solos salinos. Entretanto, fatores como a susceptibilidade a nematóides e à podridão do colo limitam o seu uso. Visando obter um porta-

enxerto com características complementares, estes autores regeneraram híbridos somáticos a partir de produtos de fusão entre protoplastos isolados de *C.reticulata* e de *Citropsis gilletiana*, uma espécie resistente à podridão do colo e ao nematóide *Radopholus citrophilus*.

As principais características incorporadas via fusão de protoplastos em batata incluem resistência a nematóides, a vírus, a *Erwinia* e também ao frio, esta oriunda de *Solanum brevidens*, uma espécie diplóide sexualmente incompatível com *S.tuberosum*. Da mesma forma, em tabaco, foram incorporados, via fusão de protoplastos, genes de resistência a doenças fúngicas e a vírus.

#### *Hibridação somática em Passiflora, o gênero dos maracujazeiros*

O Brasil é o principal produtor de maracujá, com uma área de plantio, atualmente, de 30.000ha, constituída basicamente de uma única espécie, o maracujá amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. A monocultura, entretanto, favoreceu o desenvolvimento de doenças, afetando consideravelmente a sua produção. Os plantios comerciais de maracujá têm sido alvo da incidência de doenças do sistema radicular e da parte aérea, sendo as mais severas a bacteriose causada por *Xanthomonas*, a murcha do *Fusarium*, e outra de etiologia desconhecida, o definhamento precoce. Em consequência, os pomares adquiriram, ao longo das últimas décadas, um caráter nômade, prejudicial à expansão da cultura, principalmente no Estado de São Paulo, onde grande parte dos monocultivos teve início. Hoje é cultivada principalmente no Nordeste. Além disso, a cultura exige espaldeiramento de tal forma que a manutenção do plantio por mais anos, em um mesmo local, é essencial ao produtor. Em vista disso, é considerada uma cultura de alto risco, com elevado custo de produção, principalmente no que diz respeito ao uso de defensivos químicos, uma vez que as formas cultivadas do maracujazeiro domesticado são susceptíveis.

A necessidade de se buscar no germoplasma selvagem alternativas de controle às doenças do maracujazeiro tornou pioneiro o trabalho desenvolvido por pesquisadores da Unesp/Jaboticabal, que identificaram fontes de resistência em *P.giberti*, *P.macrocarpa*, *Passiflora* sp (maracujá-de-cobra), *P.nitida* e *P.quadrangularis*. Os programas de melhoramento, via hibridação interespecífica, visando a introgressão de genes de resistência a partir dessas espécies, foram iniciados na década de 80 na Unesp. Entretanto, os híbridos interespecíficos obtidos apresentaram

baixa fertilidade, mostrando níveis variáveis de esterilidade do pólen. Devido a dificuldades metodológicas (os maracujazeiros são auto-incompatíveis), os avanços foram limitados nos programas de retrocruzamento.

No caso específico do maracujazeiro, a hibridação somática, via fusão de protoplastos, representa uma alternativa de transferência de genes do germoplasma selvagem para a espécie cultivada. Assim, preliminarmente, protocolos de regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos e de protoplastos de várias espécies de *Passiflora* foram estabelecidos no Departamento de Genética da ESALQ/USP1. Ensaio de fusão de protoplastos foram conduzidos e quatro híbridos somáticos foram obtidos, a saber, *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.amethystina*; *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.alata*; *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.cinnata* e *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.giberti*. Uma vez aclimatadas em casa de vegetação, as mudas foram levadas a campo, onde se desenvolveram. As plantas têm-se mostrado vigorosas, com características morfológicas intermediárias aos pais, florescimento abundante e viabilidade polínica acima de 70%. Análises da meiose dos híbridos *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.amethystina* e *P.edulis* f. *flavicarpa* (+) *P.cinnata* mostraram que ocorre a formação de multivalentes. Este tipo de pareamento, dito homoeólogo (entre cromossomos oriundos de espécies diferentes), permite a ocorrência de recombinação, via crossing-over, o que é essencial para que haja introgressão de genes para a espécie domesticada, a partir do parental selvagem. Plantas híbridas que formem preferencialmente bivalentes na meiose I tendem a ser mais férteis, porém podem ser eliminadas dos programas de retrocruzamento, uma vez que a possibilidade de haver introgressão, via crossing-over, é baixa; por outro lado, aquelas nas quais a freqüência de multivalentes é alta tendem a ser incorporadas, embora possam mostrar fertilidades mais baixas (veja Barbosa & Vieira, 1997).

Os híbridos somáticos produzidos na ESALQ/USP são únicos no Brasil. A obtenção destes híbridos é laboriosa, e é evidente a necessidade de avaliar o seu valor agrônômico em programas de melhoramento do maracujazeiro, visando resistência a doenças. O seu comportamento vegetativo e reprodutivo está sob estudo, assim como o seu potencial de aproveitamento está sendo avaliado. Devido a sua natureza tetraplóide, prestam-se, em princípio, como porta-enxertos, pois mostram caules mais vigorosos que o parental selvagem resistente.

*1 Projetos financiados pela FAPESP e CNPq*