



EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Levi de Moura Barros

Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas

Embrapa - Agroindústria Tropical

Fotos cedidas pelo autor

Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes

O MELHORAMENTO DE PLANTAS PERENES

A agricultura moderna encontra-se numa encruzilhada: ao mesmo tempo que tem o papel de suprir as necessidades alimentícias mínimas de bilhões de pessoas carentes e as exigências seletivas da parte da população de maior poder aquisitivo, em produtos alimentícios especiais, vestuário e habitação, vem-se tornando economicamente insustentável, por causa dos elevados custos dos insumos e dos serviços associados aos fatores de produção; e impopular, por ser mais agressiva ao meio ambiente, pela dependência cada vez maior de petroquímicos. Nessas circunstâncias, cabe ao melhoramento de plantas a importante tarefa de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos produtos, a mais baixo custo, sem agressão ao ambiente. Será isso possível por meio dos processos convencionais, desenvolvidos e aperfeiçoados ao longo da história agrícola do homem, ou serão necessários novos procedimentos?

O melhoramento de plantas, conceituado por muitos como a arte e a ciência de alterar geneticamente as plantas em benefício da humanidade, tem sido uma das ferramentas mais extraordinárias na luta pela melhoria da qualidade de vida do homem, notadamente contra a fome, ainda persistente em todos os continentes. A Revolução Verde é o maior exemplo da ação positiva do melhoramento genético de plantas no aumento da produtividade, tendo resultado, inclusive, no Prêmio Nobel da Paz para o Engenheiro Agrônomo Norman Ernest Borlaug, responsável pelo programa que possibilitou triplicar a produção de alimentos na década de 60.

A importância do melhoramento está

diretamente relacionada com a dependência que o homem tem das plantas para uso na alimentação, vestuário, habitação, saúde, educação e lazer, que torna a atividade agroindustrial a maior empregadora de mão-de-obra do planeta, não obstante somente cerca de 150 espécies serem largamente cultivadas entre as 10.000 plantas historicamente utilizadas pelo homem. Não apenas a produção dos principais cultivos tem aumentado extraordinariamente, mas

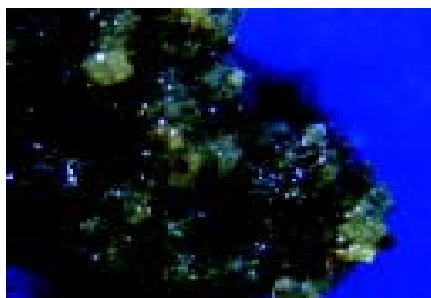


Figura 1 - Massa proembriônica

também a resistência a doenças e a adaptabilidade a ambientes adversos têm melhorado o desempenho de muitas espécies.

Como arte, o melhoramento vem sendo praticado desde os primórdios da civilização, quando os primitivos passaram do estágio de simples colhedores para o de semeadores das espécies e tipos de interesse, sendo possível a seleção dos melhores indivíduos graças à variação que é inerente aos seres vivos. A conceituação de melhoramento como arte deveu-se, então, à importância da habilidade do homem no processo que, inquestionavelmente, resultou em ganhos extraordinários, sendo as

plantas mais cultivadas hoje muito diferentes, sob diversas características, dos seus ancestrais primitivos.

Posteriormente, com o estabelecimento da genética e a incorporação de algumas ciências relacionadas, como estatística e experimentação, botânica, fisiologia, bioquímica, fitopatologia, solos e nutrição de plantas, entre outras, métodos e técnicas foram desenvolvidos, permitindo maior segurança na manipulação das características herdáveis das plantas, de forma que o melhoramento passou a ser ciência, fundamentada em princípios científicos que permitem a predição de ganhos e a avaliação precisa de resultados, superando o empirismo e a dependência exclusiva da habilidade do melhorista, que caracteriza o melhoramento praticado apenas como arte, no estabelecimento de novas cultivares.

Diversos métodos e técnicas são utilizados no melhoramento genético de plantas, todos dependendo basicamente do ciclo de vida - anual ou perene - e do modo de reprodução da espécie, se de autofecundação ou de fecundação cruzada. Especificamente com plantas perenes, o emprego das técnicas convencionais de melhoramento é dificultado por diversos fatores, destacando-se o longo período da fase juvenil, a demora para a estabilização da produção, a alta heterozigosidade dos melhores indivíduos, a falta de informações genéticas sobre as características hortícolas de interesse e a ineficiência das técnicas de melhoramento em suplantarem o mascaramento imposto pelas influências do ambiente. Some-se a isso o tempo e a área necessários para a obtenção de variedades melhoradas, com as decorrentes implicações de custos no processo.

A incorporação de genes/complexos gênicos, tanto nas variedades comerciais

em cultivo como nas novas obtenções, também é dificultada por causas naturais diversas na etapa de hibridação entre espécies e, em muitos casos, pela necessidade de enfoques diferenciados para a copa e porta-enxerto. Em decorrência, não obstante o consenso de que as técnicas convencionais sejam indispensáveis, fica claro que novos procedimentos necessitam ser incorporados como complemento para que os avanços ocorram mais rapidamente, a menor custo e com maior eficiência, razão pela qual devem-se concentrar esforços na aplicação de técnicas alternativas no melhoramento genético das plantas perenes.

TÉCNICAS AUXILIARES DO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Apesar da extraordinária contribuição dos métodos convencionais no melhoramento de plantas, atualmente já é consenso que não se pode mais esperar ganhos significativos de seleção nos principais cultivos utilizando-se esses processos, em razão por que novos enfoques são necessários para que aumentem as chances de ocorrência de nova revolução verde.

Nesse contexto, a aplicação de técnicas de biotecnologia em auxílio dos métodos convencionais de melhoramento, pode contribuir para a sustentabilidade da agricultura pela produção de cultivos melhorados e mais compatíveis com o ambiente, especialmente em países não desenvolvidos, onde há necessidade de tecnologias para problemas específicos em cultivos tropicais (Thorpe, 1994). Como exemplo, cita-se a uniformidade dos cultivos, resultante do melhoramento continuado que aumenta a vulnerabilidade dos cultivos a insetos e patógenos, com o decorrente acréscimo da dependência de produtos químicos e suas implicações. Reduz-se, então, a uma máxima do melhoramento: “as exigências do mercado levam à uniformidade dos cultivos. E a uniformidade leva ao risco de desastre, pela vulnerabilidade genética”.

Especificamente com plantas perenes, a maior dificuldade na aplicação das técnicas convencionais de melhoramento reside no desconhecimento do controle genético das características de interesse, resultante do menor esforço de pesquisa com esse grupo de plantas.

A partir do desenvolvimento de técnicas para aproveitamento de marcadores moleculares, ampliou-se o potencial de identificação dos marcadores genéticos e, conseqüentemente, as possibilidades de sucesso com o melhoramento de plantas perenes. Com as modernas técnicas de biologia molecular, foram incorporados novos conhecimentos sobre a estrutura

genética dos indivíduos, notadamente no que se refere aos marcadores moleculares, alargando-se os horizontes para os ganhos de seleção em todos os níveis.

Diversos procedimentos relacionados

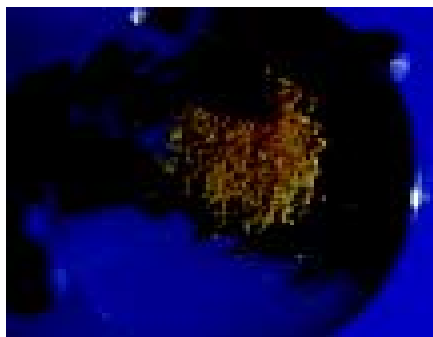


Figura 2 - Calos embriogênicos em meio líquido

com a biotecnologia têm sido adotados, com maior ou menor grau de sucesso, no melhoramento de diversas espécies de interesse econômico. Entre esses relacionam-se: 1) a micropropagação; 2) a regeneração de híbridos somáticos, tanto intergenéricos como interespecíficos, pela fusão de protoplastos; 3) a obtenção de haplóides; 4) a seleção *in vitro* de variantes somaclonais; e 5) a transformação (Litz, 1994; Mehlenbacher, 1995; Mourão Filho &

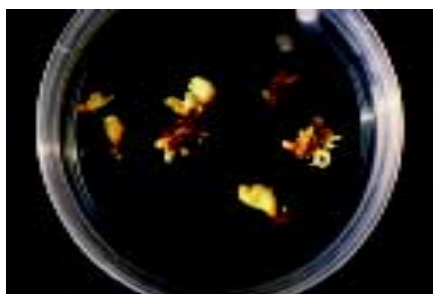


Figura 3 - Embriões somáticos

Grosser, 1992; Pearl et al., 1996; Thorpe, 1994). Entretanto, o uso da biotecnologia no melhoramento genético das plantas depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos, incluindo a embriogênese somática (Litz & Gray, 1992).

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

1 - Aspectos gerais - Entre os processos de regeneração, a embriogênese somática, que é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos (não sexuais) se desenvolvem até a formação completa de uma planta através de uma série de estágios, característicos do desenvolvimento

de embriões zigóticos (aqueles obtidos pelo processo de fusão de gametas) (Wann, 1988), é, *teoricamente*, a melhor opção para a propagação *in vitro* de fruteiras (Merkle, 1995), por apresentar algumas vantagens, como: 1) alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; 2) escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, o que elimina a dependência de períodos específicos de disponibilidade de material propagativo, permitindo estabelecer o período desejado para as obtenções; 3) plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além da planta ser geneticamente igual à planta mãe, sem as influências do porta-enxerto, como acontece com as plantas obtidas por métodos de propagação vegetativa convencionais; e, mais importante para o melhoramento *per se*; 4) possibilita a transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento das plantas (Zimmerman, 1993), propagação clonal e melhoramento, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética.

Diversas angiospermas, incluindo algumas espécies frutíferas lenhosas, têm a capacidade de produzir naturalmente embriões adventícios a partir de tecidos do óvulo, sendo mais comum na forma de poliembrião nucelar, embora se registre a ocorrência, também, de monoembrião (Litz et al., 1984; Litz, 1984). A regeneração pela embriogênese somática também ocorre sob condições controladas, podendo ser explorada tanto para a propagação em massa de indivíduos desejáveis, como para o melhoramento, na obtenção de plantas transgênicas. Entre as frutíferas tropicais, a manga, planta da família anacardiácea, tem sido contemplada, no emprego de técnicas de biotecnologia, com protocolos para a regeneração através da embriogênese somática (DeWald, 1989 a e b) e transformação (Subramanian, 1995). A indução *in vitro* de embriões somáticos na manga dá-se a partir de tecido nucelar, tecido que garante a identidade genética desejada, e é possível, tanto em cultivares poliembriônicas como em monoembriônicas, com a resposta sendo genótipo dependente (Litz & Lavi, 1997), ou seja, varia com a variedade utilizada, razão pela qual o protocolo empregado em uma variedade nem sempre funciona em outra, não obstante os componentes básicos serem os mesmos. É difícil, porém, a obtenção de plantas em cultivo, por dificuldades no processo de aclimação, que é a etapa de adaptação das plantas em campo.

A importância do estabelecimento de protocolos para a regeneração de plantas a partir de embriogênese somática é enfatizada pelo interesse em incrementar a participação do Brasil como exportador no mercado internacional de frutas tropicais, atividade geradora de emprego e de renda, e alternativa de peso na recomposição da economia de diversas regiões do País.

2 - A técnica - Nesta oportunidade são relatados os procedimentos, com métodos e técnicas aplicadas na regeneração de plantas de mangueira por embriogênese somática, no Tropical Research and Education Center - Universidade da Flórida, em Homestead, Flórida. O protocolo utilizado foi o descrito por Litz et al. (1982) e modificado por DeWald et al. (1989 a).

2. 1 - Materiais utilizados como explantes - Foram utilizadas sementes de frutos imaturos de diferentes tamanhos (estimados em 30 a 60 dias após a floração), das cultivares Keitt, que é monoembriônica, e Hindi que é poliembriônica, da coleção de germoplasma do Tropical Research and Education Center - Universidade da Flórida, em Homestead, Flórida. Como fonte de explante, ou material propagativo, utilizou-se tecido nucelar, que tem a mesma constituição genética da planta mãe, ou seja, as novas plantas que se originam a partir desse tecido constituem um clone da mesma forma que na propagação vegetativa convencional.

2. 2 - Meios de cultura - Foram utilizados meios de cultura para indução, manutenção, crescimento e maturação dos embriões somáticos obtidos. O meio de indução foi uma composição do meio B5* de Gamborg (Gamborg et al., 1968) com a adição de micronutrientes e substâncias orgânicas (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com L-Glutamina, 2,4 - D, sacarose, e adição final do agente gelificante Gel-Gro. Os demais meios de cultura foram variantes do meio de indução, com retirada ou alteração na concentração de alguns componentes.

2. 3 - Tratamento pré-cultivo e preparação do explante - Os frutos foram desinfetados superficialmente por lavagem em água corrente, por 15 minutos, seguida de imersão por 20 minutos numa solução de hipoclorito comercial a 20%, com 5,25% de cloro ativo, três gotas do espalhante Tween 20 e, finalmente, em condições assépticas, três lavagens em água destilada e esterilizada.

As sementes foram retiradas intactas dos frutos e seccionadas longitudinalmente dando origem a duas metades. Essas metades, após retirado o embrião zigótico, foram cultivadas em placas de Petri (100mm x 15mm), contendo meio de indução. As placas foram seladas com fita Parafilm para

prevenir contaminações e armazenadas a temperatura controlada entre 23° e 25°C, na ausência de luz. Também os frascos Erlenmeyer, nas fases em que se utilizou meio líquido, foram selados com fita Parafilm.

2. 4 - Condução - Os explantes foram subcultivados para outros pontos da placa já no terceiro dia, quando surgiram os primeiros sinais de compostos fenólicos no meio. Seguiram-se subcultivos, para outros pontos da placa em uso ou para outra placa, sempre que necessário.

Observada a presença de massa proembriônica nos explantes, foi feita a separação por meio de uma malha de 1000 µm. A parte retida na malha foi transferida para o meio de manutenção para a proliferação de novos calos. A parte menor foi transferida para o meio de multiplicação para a formação de embriões. Na cultivar



Figura 4 - Embriões somáticos em germinação

monoembriônica (Hindi) verificou-se a presença de calos aos 31 dias e na poliembriônica aos 28 dias após o cultivo. (Figura 1); aos 40 dias observou-se a presença de calos em 38% das placas cultivadas com 'Hindi', o que reflete a sua capacidade natural de formação de embriões e, aos 50 dias, em apenas 4% da cultivar Keitt (Figura 2). A transferência da massa pré-embriônica para meio de manutenção iniciou-se aos 70 dias.

As culturas em meio líquido foram mantidas em mesa agitadora ("shaker") a 125 rpm. à temperatura e luz ambientes (aproximadamente 23° a 25°C, sem luz suplementar) e os subcultivos para meio fresco foram efetuados em intervalos regulares de cinco dias.

Os embriões formados, tanto em meio líquido como em meio sólido (dependendo da variedade), foram transferidos para placas de Petri de 100mm x 20mm contendo o meio de maturação I (MMI), onde permaneceram até a germinação e formação de raízes, sendo transferidos depois para o tubos de cultura com o meio de

maturação II (MMII).

No meio de maturação I (MMI), os embriões foram preservados nas mesmas condições em que eram mantidos no meio de crescimento: na ausência de luz e a temperatura ambiente. No meio de maturação II, as plantas foram conservadas em câmara de crescimento, com temperatura e luz controladas.

Com relação ao desenvolvimento dos calos no meio de manutenção e no meio de multiplicação, verificou-se que a cultivar Hindi se comporta bem tanto em meio líquido como em meio sólido, enquanto a cultivar Keitt não suporta o meio líquido, com a morte dos calos. Entretanto, a opção, nos genótipos em que seja possível, deve ser pelo meio líquido, onde a proliferação da massa proembriônica é muito mais acelerada. Essa capacidade de proliferação contínua da massa proembriônica, com formação de proembriões somáticos secundários a partir da protoderme, deve-se à presença do 2,4-D no meio de cultura (Litz et al., 1995), residindo aí o potencial da técnica para uso como método de propagação vegetativa de mais baixo custo que a micropropagação.

2. 5 - Maturação dos embriões somáticos

Os proembriões somáticos que se individualizaram da massa proembriônica inicial na fase de manutenção, separados pela malha de 1000 µm, foram transferidos para o meio de crescimento (MC), onde se observou a formação de embriões já ao fim de 20 dias (Figura 3) e de cotilédones diferenciados e radículas visíveis aos 50 dias. A diferenciação dos cotilédones em embriões somáticos formados a partir dos proembriões depende do genótipo e varia, normalmente, entre 30 e 60 dias (Litz et al., 1993). Os embriões, quando atingiram cerca de 1 cm, foram cultivados no meio de maturação (MMI), onde o crescimento foi bastante rápido, com alguns embriões atingido até 5 cm já aos 15 dias após a transferência (Figura 4).

2. 6 - Germinação - Pela dificuldade de observação visual do estágio de alongação do hipocótilo, que caracteriza a germinação, utilizou-se a formação da radícula como o estágio para a transferência dos embriões para o meio de maturação II (MMII), na presença de luz (60 µmol/m²/s¹). É importante salientar que os embriões, em geral, só germinam quando completamente maduros (Litz & Lavi, 1997). Nem todos os embriões somáticos desenvolveram rebentos, talvez devido às raízes terem se partido durante as transferências para o meio fresco. A fragilidade das raízes dos embriões de manga é um problema dessa fase. Após 30 dias em meio MMII, as plantas já se encontravam bem desenvolvidas (Figura 5) e próximas da fase de

aclimação, ressaltando o sucesso na obtenção e germinação de embriões somáticos com o protocolo utilizado.

3 - Problemas com a técnica - Nem sempre a formação de calos resultou na obtenção de plantas. Na maioria das placas os calos foram perdidos ou por contaminação ou simplesmente por morte. Além disso, outros problemas ocorreram nas fases de germinação e crescimento dos embriões.

3. 1 - Contaminação - Além das perdas por contaminação endógena, tanto por fungos como por bactérias, houve o problema, sempre presente, das contaminações exógenas. Estas são, teoricamente, de mais fácil controle por serem decorrentes da execução do processo.

3. 2 - Vitrificação - É comum a hiper-hidricidade ou vitrificação de embriões de manga na fase de maturação. Esse fenômeno foi bem estudado por Monsalud et al., (1995), que verificaram a viabilidade de reversão por meio da secagem parcial dos embriões somáticos quando se encontram com 2-3 mm de comprimento, sob umidade relativa elevada (100%) durante 24 horas ou por meio da cultura dos embriões em meio solidificado com 6 g/l de GelGro.

3. 3 - Outros - Observou-se também a ocorrência de fasciação e fusão de embriões, anomalias que podem aparecer quando as divisões das células em áreas meristemáticas acontecem antes da diferenciação da gema apical e dos cotilédones (Litz & Gray, 1992). Essas anomalias não são inerentes aos embriões somáticos, ocorrendo também em embriões zigóticos imaturos cultivados *in vitro*.

PERSPECTIVAS DE APROVEITAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA PROPAGAÇÃO E MELHORAMENTO DE OUTRAS ESPÉCIES

A extraordinária quantidade de embriões obtidos de cada explante na experiência realizada demonstra o potencial da técnica, sobretudo para uso como método de propagação, além de possibilitar o emprego de técnicas não convencionais de melhoramento, enfatizando a possibilidade de uso em outras espécies, principalmente as mais relacionadas. Como exemplo prático, cita-se a necessidade de obtenção de clones de cajueiro, planta da família Anacardiaceae como a mangueira, adaptados tanto para as condições agroecológicas do cerrado, para onde o cajueiro vem-se expandindo rapidamente como cultivo comercial, como para o semi-árido, onde vivem cerca de 15 milhões de pessoas e onde as alternativas econômicas são limitadas.

A existência de diversas espécies de *Anacardium* nativas do cerrado (Barros, 1995) induz, de imediato, a expectativas de seu aproveitamento em programas de melhoramento para adaptatividade, tanto às condições do cerrado, especialmente tolerância ao alumínio, como às do semi-árido, caracterizado pela escassez e irregularidade na distribuição das chuvas. Entretanto, as espécies relacionadas constituem, no momento, apenas uma grande fonte de germoplasma inexplorado. Além das barreiras naturais à obtenção de híbridos interespecíficos por meio de cruzamentos convencionais, há o problema da adaptação das espécies de cerrado às condições edafoclimáticas do litoral e transições com outros



Figura 5 - Plantas de mangueira oriundas de embriões somáticos

ecossistemas do Nordeste, dificultando a sua conservação em banco de germoplasma e, conseqüentemente, o seu emprego nos programas de melhoramento genético. Fica claro que novos procedimentos necessitam ser incorporados como complemento para que os avanços ocorram mais rapidamente, a menor custo e com maior eficiência, razão pela qual se devem concentrar esforços na aplicação de algumas das técnicas pertinentes à biotecnologia no melhoramento genético do cajueiro.

Uma experiência inicial realizada também no TREC/Universidade da Flórida, para avaliação de: 1) efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no meio de

indução descrito por DeWald (1989 a) para a mangueira, em ovários de flores hermafroditas, em frutos de diferentes idades do genótipo CCP 76 de cajueiro anão-precoce; e 2) efeito, direto ou em combinação, de diferentes auxinas e citocininas em diferentes genótipos de cajueiro anão precoce na indução de calos de diferentes materiais genéticos do cajueiro, demonstrou que o comportamento da cultura foi surpreendentemente diferente do observado na mangueira, com baixa intensidade de compostos fenólicos no meio de cultura, o que fez com que o primeiro subcultivo ocorresse aos sete dias, porém em apenas 10% das placas cultivadas. As demais apenas tiveram o primeiro subcultivo aos 21 dias.

Em abacate, Witjaksono (1997) apresentou um protocolo para isolamento, cultura e regeneração de embriões somáticos a partir de protoplastos, que poderá ser útil no melhoramento da espécie por hibridização somática, pela transferência de genes entre espécies, técnica que vem sendo utilizada no melhoramento genético de citros (Grosser & Gmitter Jr., 1990).

É necessário chamar a atenção, no entanto, para o fato de, apesar do potencial teórico, o número de exemplos de sucesso com a embriogênese somática em plantas lenhosas ainda é muito baixo quando comparado com as plantas herbáceas (Wann, 1988; Litz, 1994; Merkle, 1995). As principais limitações da embriogênese somática em plantas perenes, especialmente frutíferas tropicais são: 1) o baixo número de plantas efetivamente desenvolvidas e em condições de campo, não obstante ser possível o processo de embriogênese, e, conseqüentemente, a obtenção de embriões somáticos, em diversas espécies; 2) dificuldades de obtenção de embriões a partir de partes maduras/adultas das plantas, com a maioria dos exemplos conhecidos sendo com tecidos da semente ou de seedlings. Em alguns casos, tem sido possível a clonagem de embriões, ou embriogênese repetitiva. Entretanto, a fonte para a obtenção das cópias são embriões zigóticos, o que quase sempre não é desejável por ser desconhecido o valor genético desses indivíduos. Há necessidade de esforços de pesquisa que viabilizem protocolos para a regeneração de plantas através de embriogênese somática, o que possibilitará o emprego de algumas técnicas de biotecnologia na obtenção de novas cultivares especialmente adaptadas a condições específicas de ambiente, bem como a multiplicação das plantas obtidas a menor custo e maior confiabilidade. 🌱