



Transferência genômica Parcial

Pedro Canisio Binsfeld
Institut für Landwirtschaftliche Botanik
Universität Bonn - Alemanha
ulp50b@uni-bonn.de

Emprego no melhoramento de plantas

O melhoramento de plantas tem como propósito o desenvolvimento de novas cultivares que, adaptadas às condições de cultivo, sejam capazes de promover uma estável e elevada produtividade, assim como a qualidade desejada do produto. Visto sob o aspecto metodológico, o melhoramento de plantas é genética aplicada. A sistematização de programas de melhoramento genético de plantas teve início no começo do século, após a redescoberta dos trabalhos de Gregor Mendel, que elaborou as leis básicas da herança genética. Através da aplicação conseqüente dessas leis, foi possível, durante este século, duplicar, triplicar ou, em alguns casos, como por exemplo o do trigo, quadruplicar a produtividade média por hectare (Ordon & Fried, 1998). Evidentemente, o incremento na produtividade não está somente baseado no melhoramento, mas também na melhoria das condições de cultivo e no manejo adequado das culturas.

Até meados da década de 80, os métodos clássicos foram os grandes responsáveis pelo desenvolvimento das novas cultivares. Porém, nos últimos anos, o melhoramento clássico recebeu como ferramentas auxiliares diversas técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais e biologia molecular, que ampliaram os horizontes na busca da diversidade alélica necessária em um programa de melhoramento. Essas técnicas possibilitam ao melhorista transcender o pool gênico primário, utilizado no melhoramento clássico, permitindo a incorporação de novos alelos ao genoma que confirmam as características desejáveis à cultura.

Das estratégias biotecnológicas disponíveis para transferência gênica entre espécies, a transformação genética é vantajosa quando se trata da transferência de caracteres monogênicos, isto é, características gênicas controladas por um único gene. E quando esse gene de interesse está disponí-



Figura 1. Diagrama esquemático mostrando as etapas básicas da hibridação somática assimétrica, por meio do uso de micronúcleos para a transferência genômica parcial

vel e clonado em um vetor (normalmente plasmídeo), que se encarregará de transferi-lo ao genoma da planta. Entretanto, até o momento, somente um limitado número de monogênicos identificados e clonados estão disponíveis para ser transferidos. Porém, a grande maioria dos caracteres de interesse econômico (produtividade, diversas resistências a pragas e moléstias, tolerância a stresses) são características controladas por poligenes ou genes que tenham mecanismos moleculares desconhecidos. E esses genes controlados por poligenes não podem ser transferidos por meio da técnica da transformação. Nesse caso, a estratégia da hibridação somática apresenta-se como uma alternativa apropriada.

Hibridação somática

Entende-se por hibridação somática simétrica a fusão completa de dois protoplastos com os dois genomas, incluindo o citoplasma e as organelas celulares. O uso dessa tecnologia requer que sejam atendidas 2 condições básicas: primeiro, o isolamento de protoplastos deve ser em quantidade suficiente para se estabelecer um cultivo, e segundo, os protoplastos devem ser totipotentes, isto é, deverão ter a capacidade de proliferar e regenerar uma nova planta. Essas condições básicas já estão estabelecidas para mais de 320 espécies (Binsfeld, 1998). Nas espécies em que mais se utiliza essa técnica são as das famílias solanaceae e brassicaceae. Entretanto, mais recentemente, em muitas outras espécies tem sido empregada com êxito no melhoramento, incluindo espécies recalcitrantes. Entre essas, encontram-se vários membros das famílias da Poaceae, Fabaceae, Rosaceae, além de várias espécies florestais, incluindo frutíferas e essências florestais (Bajaj, 1996).

Por meio da hibridação somática, oferece-se também a possibilidade de gerar variabilidade pela: a) superação da incompatibilidade sexual entre plantas, b) produção de amfidiplóides, c) transferência de DNA citoplasmático, e d) transferência genômica parcial (fragmentação do núcleo da célula doadora).

A hibridação somática comparada à transformação genética não é específica em relação ao resultado buscado, pois a introgressão ou a transferência gênica não são precisamente controladas, o que, na seqüência, envolve um processo de seleção. Porém, em muitas espécies de plantas, assim como na transformação genética, a fusão de protoplastos possibilitou a superação da incompatibilidade sexual. Ao contrário dos genes introduzidos por meio das técnicas de DNA recombinante, essa técnica torna possível a transferência de características gênicas controladas principalmente por poligenes.

Na hibridação somática simétrica (fusão de dois protoplastos completos), normalmente o número de cromossomos do híbrido é a soma dos cromossomos dos genótipos envolvidos na fusão, além das organelas de ambos os parceiros. Durante a primeira divisão da célula híbrida, será definida a composição cromossômica, bem como das organelas que irão compor as células nas próximas gerações. Híbridos somáticos simétricos, pela sua complexa combinação genômica, necessitam de sucessivas gerações de retrocruzamentos com o genótipo desejado no sentido de introduzir somente a característica desejada. Isso, por sua vez, limita seu uso direto em programas de melhoramento, dada a elevada demanda de tempo e disponibilidade de recursos necessários (Ramulu et al., 1995). Por isso, cresce o interesse por métodos de hibridação somática que limitem a transferência genômica durante o processo da fusão, surgindo o que se denomina *transferência genômica parcial* por meio de hibridação somática assimétrica.

Hibridação somática assimétrica

Consiste na transferência parcial do genoma da célula doadora para uma célula somática receptora. Isso pode ocorrer de variadas formas. Primeiro, a eliminação do genoma doador pode ser induzida mediante o uso da radiação antes da fusão de protoplastos. Outras formas de transferência genômica parcial podem ser por meio de microinjeção ou ainda pela fusão de microprotoplastos contendo micronúcleos com um ou poucos cromossomos do genoma doador. Em geral, o tratamento com radiação reduz a quantidade de DNA transferido, porém, é muito variável e instável. Além disso, a eliminação dos cromossomos é aleatória, de modo que não é possível prever qual será a parte do genoma que será transferido pela fusão assimétrica (Waara & Glimelius, 1995).

Uma maneira de contornar esse problema consiste na identificação de marcadores genéticos que estejam ligados aos genes de interesse agrônomico nos respectivos cromossomos. Por meio dos marcadores genéticos e o uso das técnicas de citometria de fluxo e micromanipulação, consegue-se selecionar os cromossomos ou micronúcleos portadores desses genes, e desta forma pode-se controlar o processo da transferência genômica parcial usando microprotoplastos.

Uso de microprotoplastos como estratégia de transferência genômica parcial

Uma técnica desenvolvida recentemente,

que vem despertando o interesse dos melhoristas é a fusão com microprotoplastos. Microprotoplastos são micronúcleos contendo uma fina camada de citoplasma e envoltos por uma membrana plasmática. Já os micronúcleos são cromossomos condensados de forma isolada no interior da célula e são envoltos por uma membrana nuclear. Essa técnica permite transferir, de forma controlada, um limitado número de cromossomos de uma célula doadora para uma célula receptora, por meio da fusão com microprotoplastos contendo um micronúcleo com um ou poucos cromossomos, ou, ainda, permite a transferência direta dos micronúcleos através de microinjeção. O diagrama esquemático da Figura 1 mostra as principais etapas desse processo de

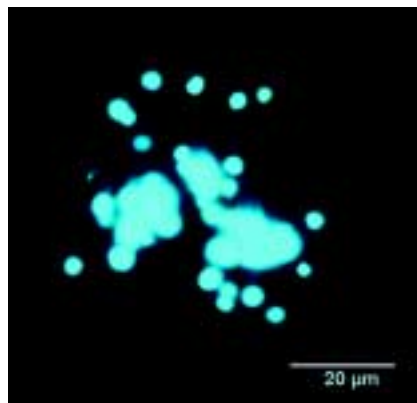


Figura 2. Célula com diversos micronúcleos corados com DAPI e visualizado sob luz ultravioleta em um microscópio de fluorescência

micronucleação e transferência genômica parcial por meio de fusão ou microinjeção.

Entre as etapas mais importantes da transferência genômica parcial por meio de microprotoplastos ou microinjeção, tem-se: 1) o desenvolvimento de uma cultura celular de crescimento ativo; 2) a indução de micronúcleos pelo uso de antimitóticos; 3) o isolamento e seleção de micronúcleos ou microprotoplastos pequenos; 4) a transferência de micronúcleo ou microprotoplasto para a célula receptora; 5) a regeneração e seleção dos híbridos parciais.

A primeira etapa consiste no desenvolvimento de uma suspensão de células que serão usadas como doadoras dos micronúcleos ou microprotoplastos. É condição fundamental que haja desenvolvimento de uma cultura celular em ativo crescimento, de forma sincronizada, de tal maneira que se tenha uma elevada percentagem de células que entrarão em divisão ao mesmo tempo, ou

seja, que estejam em metáfase, para então aplicar os agentes antimitóticos.

Na segunda etapa, induz-se a micronucleação. A micronucleação em plantas pode ser induzida pela exposição prolongada de células mitóticas a agentes que inibem a polimerização dos microtúbulos que formam as fibras dos fusos. Esses agentes se ligam diretamente aos monômeros da tubulina. A colchicina ou os herbicidas Amiprofós metil (APM), Oryzalin ou Cremat são potentes agentes antimitóticos em células de plantas. Na presença dos agentes antimitóticos, durante a metáfase celular, os cromossomos separam-se e distribuem-se de forma isolada ou em pequenos grupos, pela célula. Pela disfunção das fibras do fuso, os cromossomos metafásicos não se separam em duas cromátides irmãs. Após algumas horas, esses são envoltos pela membrana nuclear, resultando na formação de vários pequenos núcleos denominados de micronúcleos (Figura 2).

Na terceira etapa, 24 h após a aplicação dos antimitóticos, adiciona-se Citochalasina-B (CB) que, além de estabilizar os micronúcleos formados, tem por finalidade tornar o processo da micronucleação mais eficaz

Na quarta etapa, faz-se o isolamento dos micronúcleos ou microprotoplastos. Para tornar o isolamento eficaz, é fundamental que se remova a parede celular das células micronucleadas por meio da digestão enzimática. Após a remoção da parede celular, as células são incubadas por 4 h sob refrigeração (4°C), na presença de spermidina. Esta tem por finalidade proteger o complexo membranário das células micronucleadas.

A quinta etapa consiste na separação dos micronúcleos ou microprotoplastos da célula. Nessa etapa, já deverá estar definido o procedimento metodológico que será usado para transferir o genoma parcial para a célula receptora, o qual pode ser pela fusão química ou pela microinjeção. No primeiro caso, isolam-se os microprotoplastos por meio de ultracentrifugação (120.000 g por 2 h) em um gradiente isosmótico de Percoll. Após, separam-se as bandas formadas com peneiras de nylon de decrescentes tamanhos de poros (20, 15, 10, 5 e 3 µm). No segundo caso, faz-se a lise das células micronucleadas em solução hipotônica, onde a célula se romperá, liberando os micronúcleos: estes serão coletados mediante uma leve centrifugação para separar fragmentos celulares dos micronúcleos, seguindo-se uma filtração seqüencial, conforme descrito para o primeiro caso.

A sexta etapa, é a etapa da fusão ou da transferência por microinjeção. Os microprotoplastos coletados, conforme descrito

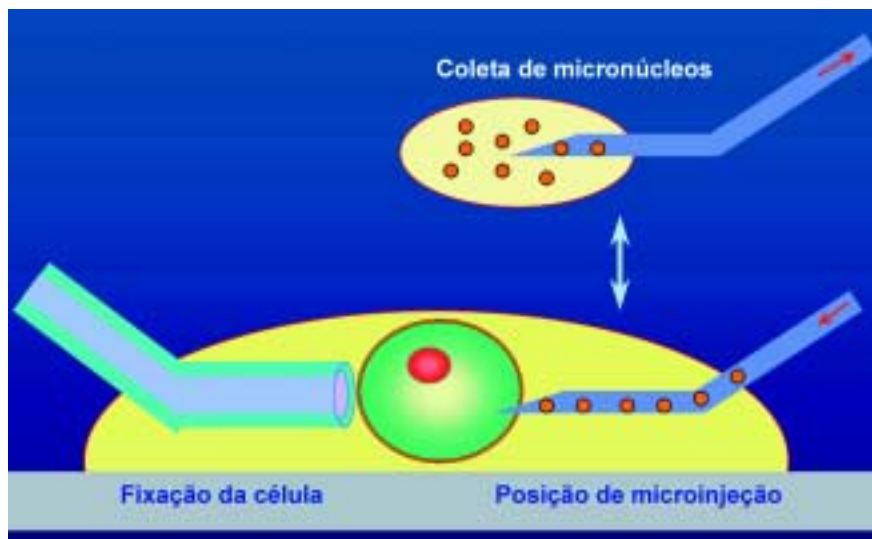


Figura 3. Representação esquemática do processo da microinjeção. Acima está representado a primeira etapa que corresponde a coleta dos micronúcleos e abaixo está representado o posicionamento da célula (protoplasto) para a microinjeção

acima, poderão ser fusionados com protoplastos receptores, mediada por um agente químico, como, por exemplo, o polietileno glicol (PEG). Nesse caso, o protoplasto receptor e o microprotoplasto serão colocados em contato por poucos minutos, na presença de PEG, em uma solução rica em íons de cálcio. Após a fusão, as células são lavadas para remover o PEG, que, em exposição prolongada, se torna tóxico às células. No caso do uso da microinjeção, o procedimento consiste no carregamento da micropipeta do manipulador com micronúcleos, seguindo-se a injeção dos micronúcleos nas células, como mostra na Figura 3. A vantagem da microinjeção em relação à fusão com PEG é o fato desta ser um evento dirigido, isto é, tem-se o controle sobre a quantidade de micronúcleos injetados por célula. Enquanto que no procedimento da fusão química, poderá ocorrer a fusão de um ou mais micronúcleos por célula.

As células receptoras, ou seja, os produtos da fusão e da microinjeção, são cultivados até a fase do desenvolvimento de calo. Os calos formados são transferidos para um meio de diferenciação e regeneração de brotos e raízes, obtendo-se, assim, um híbrido parcial.

A natureza híbrida parcial da planta pode ser identificada pelos caracteres morfológicos, citológicos ou moleculares. Caso haja marcadores moleculares, a análise da natureza híbrida já poderá ser feita durante a fase de calo, o que se mostra como grande vantagem, pois evita todo o

processo de regeneração, que, muitas vezes, é dispendioso, tanto pelo aspecto de tempo como de trabalho.

Aplicação da técnica de micronúcleos no melhoramento de plantas

A tecnologia da hibridação somática assimétrica pelo uso dos micronúcleos encontra inúmeras aplicações em programas de melhoramento de plantas, bem como em estudos das interações genômicas a nível somático. O uso dessa técnica permite:

1) transferência de caracteres desejáveis entre espécies sexualmente incompatíveis. A incompatibilidade sexual entre espécies cultivadas e suas formas silvestres é, assim, superada. Dessa forma, as espécies silvestres podem ser usadas em programas de melhoramento buscando transferir genes de resistência a pragas e moléstias ou tolerância a estresses ambientais ao genótipo cultivado;

2) transferência de caracteres controlados por poligenes ou mesmo de caracteres controlados por genes desconhecidos. Características importantes como resistência a doenças, estresses ambientais ou caracteres ligados à produção são controladas por um variado número de genes que interagem entre si. Estes se encontram com frequência em blocos dentro do genoma. Sendo assim, a transferência de um ou de poucos cromossomos é capaz de transferir um grupo de genes em um único passo;

3) produção de linhas monossômicas e dissômicas em uma única etapa. Isso economiza tempo e um prolongado processo de retrocruzamento necessário para obter tais linhas via método sexual. A partir de linhas monossômicas ou dissômicas, é possível obter substituição ou recombinação entre cromossomos (translocação in-

tergenômica);

4) análise eficiente de genes doados aos híbridos parciais intergenéricos ou interespecíficos, assim como, propicia o estudo básico sobre genes introduzidos (alterações estruturais, deleção, inativação ou co-supressão);

5) estudos sobre a localização dos genes nos cromossomos. Genes podem ser precisamente localizados se for produzida uma população suficientemente grande de linhas monossômicas. Pode ser igualmente empregado no mapeamento de genes específicos aos cromossomos.

6) construção de bibliotecas de cromossomos, tendo por finalidade a análise genômica em trabalhos de melhoramento de plantas a nível molecular. Pode facilitar a clonagem direta de segmentos de DNA nos cromossomos via micro-manipulação (laser), recortando segmentos cromossômicos e os substituindo por segmentos selecionados.

A questão fundamental da técnica aqui apresentada é, em primeiro lugar, a possibilidade da transferência genômica parcial e, associada a esta, a transferência de caracteres poligênicos e segundo, por meio de um refinamento técnico, nos possibilita seccionar segmentos cromossômicos que permitam a transferência de complexos gênicos, resultando assim numa transferência controlada de grupos gênicos. A decisão do uso desta técnica no melhoramento de plantas depende do objetivo e das características genéticas que se deseja transferir.

Bibliografia

Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 27, Somatic Hybridization in crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1994.

Binsfeld, P.C. *Transferência genômica parcial entre espécies sexualmente incompatíveis por meio de hibridação somática assimétrica*. Tese de Doutorado, UFPel, Pelotas, 1998. 130 p.

Binsfeld, P.C.; Wingender, R.; Schnabl, H. *A protoplast growth procedure for sunflower species (*Helianthus* ssp.) in liquid culture*. *Helia*, (in press).

Orton F. & Friedt W. *Von Mendel zum Gentransfer*. Mann-Verlag, 1998. 101 p.

Ramulu, K.S.; Dijkhuis, P.; Rutgers, E.; Blass, J.; Verbeek, W.H.J.; Verhoeven, H.A.; Colijn-Hooymans, C.M. *Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species*. *Euphytica*, 85: 255-268, 1995.

Waara S. & Glimenius, K. *The potential of somatic hybridization in crop breeding*. *Euphytica*, 85: 217-233, 1995. 🌱