

PRODUÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES ATRAVÉS DA GIMNOGÊNESE

Fabiana Raquel Mühl¹, Neuri Antônio Feldmann², Anderson Clayton Rhoden³, Marciano Balbinot⁴

Palavras-chave: cruzamentos, colchicina, trigo.

As primeiras descrições de ocorrência natural de plantas haplóides datam do início da década de vinte do século passado por Bergner (1997) em *Datura stramonium*. Rapidamente foram surgindo relatos para diversas espécies como fumo e trigo. No entanto, somente entre o final da década de sessenta e início da de setenta, surgiram os primeiros protocolos para indução de haploidia *in vivo* e de duplicação cromossômica. Atualmente, os duplos-haplóides já são citados em mais de 200 espécies de plantas e o interesse pela técnica tem aumentado devido às tecnologias inovadoras e maiores entendimentos dos processos de indução de haplóides (BORDES et al., 2006).

Em um programa de melhoramento genético de plantas autógamas cujo objetivo principal é conseguir genótipos com alto rendimento e estabilidade de produção, o sucesso depende, principalmente, da escolha dos genitores com capacidade para produzir genótipos superiores, da adoção de um programa de melhoramento capaz de proporcionar recombinações genéticas de interesse e da capacidade do melhorista em selecionar os indivíduos superiores nas gerações segregantes (ALLARD, 1971).

Em um processo convencional de melhoramento de trigo, após o cruzamento varietal, são necessárias de sete a nove gerações para se obter a estabilidade fenotípica e, conseqüentemente, alto grau de homozigose. Visando aumentar a eficiência na obtenção de cultivares de trigo, algumas técnicas são incorporadas aos programas de melhoramento genético, entre elas a obtenção de plantas diaplóides em gerações F₁ ou F₂, o que permite desenvolver uma planta *in vitro* a partir de embriões híbridos imaturos, resultantes da

¹ Bióloga. Doutora em Agronomia. Professora do Curso de Agronomia da Faculdade de Itapiranga – FAI. E-mail: fabimuhl@hotmail.com.

² Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia. Professor do Curso de Agronomia da Faculdade de Itapiranga – FAI.

³ Engenheiro Agrônomo. Mestre em Ciência do Solo. Coordenador e Professor do Curso de Agronomia da Faculdade de Itapiranga – FAI.

⁴ Mestre em Agronomia. Professor do Curso de Agronomia da Faculdade de Itapiranga – FAI.

eliminação de cromossomos somáticos provocados por cruzamentos interespecíficos (CAMARGO et al., 1999; MORAES-FERNANDES, 2002).

Com a obtenção de linhas homozigotas a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens em caracteres quantitativos podem ser maiores, uma vez que a seleção é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasias (SNAPE et al., 1986; MORAES-FERNANDES, 2002; SILVA et al., 2002).

A utilização dos haplóides no melhoramento de plantas é pouco relatada na literatura e exemplos de esquemas de seleção utilizando essa técnica são raros. Entretanto, as empresas produtoras de sementes têm demonstrado grande interesse pela técnica e algumas já a introduziram em seus programas de melhoramento (FORSTER et al., 2007).

Duplo-haplóides são especialmente úteis nas análises genéticas da resistência às doenças nas plantas cultivadas, principalmente para as características de herança complexa como foi suposto ser o caso da resistência de planta adulta durável à ferrugem da folha do trigo. Neste aspecto, as linhagens duplo-haplóides (DH), por causa da homozigose perfeita, são valiosas para análises genéticas e para pesquisas com marcadores moleculares que visam o mapeamento de genes (BRAMMER et al., 1997; DARVEY, 1998).

A técnica de haplodiploidização via gimnogênese permite desenvolver uma planta *in vitro* a partir de embriões híbridos imaturos, resultantes da eliminação de cromossomos somáticos provocados por cruzamentos interespecíficos. Para a produção de plantas haplóides de trigo, é empregado o método da gimnogênese, via polinização de trigo com milho, que resulta na eliminação do genoma de milho nas primeiras divisões mitóticas do embrião (MORAES-FERNANDES et al., 2002).

Estudos realizados Falk e Kasha (1981), demonstraram que o resultado dos cruzamentos entre *Hordeum bulbosum* com o trigo são altamente influenciáveis por, pelo menos, três pares de alelos, *Kr1*, *Kr2* e *Kr3*, localizados nos cromossomos 5A, 5B e 5D, respectivamente. Assim, o uso do milho como genitor masculino em cruzamentos interespecíficos, visando à produção de plantas haplóides, tornou-se promissor, uma vez que esse cereal não sofre a ação dos alelos *Kr* que agem sobre a parede do pólen impedindo o desenvolvimento do tubo polínico comprometendo, assim, a realização da fecundação (O'DONOUGHUE; BENNETT, 1994).

Quando o pólen do milho é utilizado para polinizar trigo, o genoma do milho é completamente eliminado durante as três primeiras divisões mitóticas, após a fecundação. Não há indícios de retenção de cromossomos do milho, como ocorre em outros cruzamentos,

por exemplo, quando se usa o pólen de milho, o que tornou o primeiro um forte candidato para substituir *H. bulbosum* nos cruzamentos interespecíficos (LAURIE; BENNETT, 1989).

Além da influência genética da espécie materna, vários fatores podem influenciar a formação de embriões em cruzamentos trigo x milho, entre os quais, a concentração da solução de 2,4-D aplicada após a polinização e o efeito genotípico do milho. Devido a instabilidade existente entre os genomas não há formação do endosperma, e o embrião haplóide geralmente tem um período de vida *in situ* de cerca de 15 dias. Dessa forma, o sucesso depende do resgate e cultivo *in vitro* do embrião imaturo através de um meio de cultura quimicamente definido que substitui o endosperma, suprimindo as necessidades nutricionais do embrião até sua germinação e formação de uma plântula (LAURIE; BENNETT, 1989; COMEAU, 1992; ZHANG et al., 1996).

De acordo com Sager e Kitchin (1975), existem dois processos capazes de inibir a manifestação de um código genético, na presença de um homólogo ativo, nos organismos eucariontes. O primeiro deles é a eliminação ou diminuição irreversível das moléculas de DNA ou mesmo dos cromossomos enquanto o outro, é a inativação por condensação cromossômica ou *heterocromatinização* (JENSEN, 1977).

Nos vegetais, a eliminação pode ocorrer em muitos tecidos, sendo mais eficiente nas áreas de intensas divisões celulares, como as regiões meristemáticas, endosperma e embriões. Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar o fenômeno da eliminação cromossômica nos organismos eucarióticos. Entre elas, as mais importantes são: 1) Assincronia no tempo do ciclo celular mitótico devido as diferenças genéticas entre as espécies cruzadas; 2) Anormalidades no fuso, centrômeros e centríolos e 3) Reconhecimento do DNA estranho e inativação (JENSEN, 1977).

Laurie e Bennett (1989), sugerem que a eliminação do genoma do milho, quando cruzado com trigo, seja devida à incompatibilidade de tamanho do centrômero do milho com relação as fibras do fuso que são construídas pelo genoma materno, do trigo. É válido salientar que a eliminação cromossômica completa do genitor masculino é um processo crítico nos cruzamentos interespecíficos que visam a produção de plantas haplóides, já que não deve haver a retenção do material genético da espécie polinizadora, para que a identidade genética do embrião seja mantida e, conseqüentemente, se obtenha a homozigose perfeita, após a duplicação dos genomas. Esta é uma das limitações para a utilização deste método na aveia, por exemplo, uma vez que essa espécie não elimina completamente os cromossomos do genitor masculino nos cruzamentos com milho, produzindo assim, embriões híbridos ao invés de haplóides.

Além disso, ampliação da escala de uso desta técnica nos programas de melhoramento depende do ajuste adequado de inúmeros fatores abióticos como, intensidade luminosa, temperatura, umidade relativa do ar, meios de cultura e de fatores bióticos, entre os quais, a sanidade da planta e o genótipo dos genitores utilizados nos cruzamentos (CAMPBELL et al., 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, existe uma transição do cultivo de embriões imaturos e de anteras para a cultura de micrósporos. Existem várias explicações para este acontecimento. Na antera existem muitos tecidos como, por exemplo, o tecido conectivo que une a antera ao filete e, em geral, as condições de cultivo não favorecem a proliferação desses tecidos. Além disso, mesmo não se proliferando *in vitro* eles podem ter um efeito inibitório ou seletivo sobre a embriogênese dos micrósporos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 381p. 1971.

BERGER, R. D.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Lesion expansion as an epidemic component. **Phytopathology** v. 87, p. 1005-1013. 1997.

BORDES, J.; CHARMET, G.; VAULEX, R. D. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1063-1072. 2006.

BRAMMER, S. P., MORAES-FERNANDES, M. I. B. de., BARCELLOS, A. L. Haplodiploidization as a tool for speeding up genetic mapping in wheat. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Programas e resumos...** Gramado:, REBBIO Sub-região Brasil, p. 227, 1997.

CAMARGO, C.E.O., RAMOS, L.C.S., FERREIRA FILHO, A.W.P., FELÍCIO, J.C., PETTINELLI JR., A., CASTRO, J.L., YOKOO, E.Y. Linhagens diaplóides de trigo: produção de grãos, características agronômicas e tolerância à toxicidade de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.58, p.235-246, 1999.

CAMPBELL, A. W.; GRIFFIN, W. B.; CONNER, A. J.; ROWARTH, J. S.; BURRITT, D. J. The effects of temperature and light intensity on embryo numbers in wheat doubled haploid production through wheat x maize crosses. **Annals of Botany**, v. 82, p. 29 – 33. 1998.

- COMEAU, A.; NADEAU, P.; PLOURDE, A.; SIMARD, R.; MAËS, O.; KELLY, S.; HARPER, L.; LETTRE, J.; LANDRY, B.; St-PIRRE, C. A. Media for the in ovulo culture of proembryos of wheat and wheat-derived interspecific hybrids or haploids. **Plant Science**. v. 81, n. 1, p. 117 – 125, 1992.
- DARVEY, N. L. Doubled haploid technology: an interactive model for germplasm enhancement. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoon, Saskatchewan. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan, v.1, p.148-151. 1998.
- FORSTER, B. P.; HEBERLE-BROS, E.; KASHA, J.; TOURAEV, A. The resurgence of haploid in higher plants. *Trends in Plant Science*, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.
- JENSEN, C. J. Monoploid production by chromosome elimination. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y. P. S. **Plant cell, tissue and organ culture**. New York: Springer-Verlag. p. 299 – 340. 1977.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. **Genome**, Ottawa, v.32, n. 6, p. 953 – 961. 1989.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B., STIVAL, A.L., BRAMMER, S.P. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v. 2, p. 569-612. 2002.
- O'DONOUGHUE, L. S.; BENNETT, M. D. Comparative responses of tetraploid wheats pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L.. *Theoretical and Applied Genetics*, Nova York, v. 87, n. 6, p. 673 – 680. 1994.
- SAGER, R.; KITCHIN, R. Selective silencing of eukaryotic DNA. **Science**, v. 189, n. 4201, p. 426 – 433, Agosto. 1975.
- SILVA, J. A. G. da., CARVALHO, F. I. F. de., SILVA, S. A., BARBIERI, R. L., MARCHIORO, V. S., LORENCETTI, C., BENIN, G. Temperatura e seus efeitos na polinização para a obtenção de embriões haplóides em cruzamento intergenérico. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 8, n. 2, p. 97-102, mai-ago, 2002.
- SNAPE, J. W.; CHAPMAN, V.; MOSS, J.; BLANCHARD, C. E.; MILLER, T. E. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. **Heredity**, Edimburg, v. 42, n. 3, p. 291 – 298, 1986.
- ZHANG, J., FRIEBE, B., RAUPP, W. J., HARRISON, S. A., GILL, B. S. Wheat embryogenesis and haploid production in wheat x maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 90, p. 315 – 324, 1996.