

BIOMETRIA E O MELHORAMENTO DE PLANTAS NA ERA DA GENÔMICA

MAGNO ANTÔNIO PATTO RAMALHO¹; EDUARDO DE SOUZA LAMBERT²

¹Professor Titular, Depto de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP. 37200-000 Lavras. MG. E-mail: magnoapr@ufla.br (autor para correspondência)

²Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, Depto de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.2, p.228-249, 2004

RESUMO - O melhoramento genético começou com a domesticação de algumas espécies de plantas há mais de 10.000 anos e se intensificou para atender a demanda por alimentos com o crescimento populacional. Há pelo menos 85 anos, a Genética, o Melhoramento de Plantas e a Biometria estão intimamente associados. A união dessas áreas do conhecimento originou a Genética Quantitativa. Pode ser facilmente comprovado que essas ciências tiveram uma participação expressiva na produção de alimentos, madeira, fibras, etc., para atender as necessidades do homem no último século. Com o advento da técnica dos marcadores moleculares e do sequenciamento dos genomas, que iniciou a partir de 1974, vislumbrou-se a possibilidade de se realizar a seleção diretamente no genótipo (DNA). Várias técnicas de laboratório foram implementadas para se obterem os marcadores moleculares e os processos de sequenciamento do DNA tiveram um crescimento explosivo, criando o que se denominou de era da genômica. Desenvolveu-se a tecnologia do DNA recombinante, permitindo a transferência de genes entre as espécies, o que não era imaginado anteriormente. Alguns cientistas começaram a questionar a contribuição futura da Genética Quantitativa. O que se pretende mostrar com essa publicação é que todas as evidências disponíveis apontam que a sua importância, provavelmente, será ainda maior do que no passado. As pesquisas mostraram que, especialmente para caracteres quantitativos (QTL – *quantitative traits loci*), os marcadores devem estar associados a medidas do fenótipo e, para serem úteis, precisam ser obtidas informações em experimentos de campo com a maior precisão experimental possível. Até mesmo para os transgênicos, necessita-se de avaliações extensivas, com o objetivo de avaliar o efeito de genes exógenos no maior número de cultivares possível e em vários ambientes.

Palavras-chave: melhoramento, genética quantitativa, biotecnologia, marcadores moleculares.

BIOMETRICS AND PLANT BREEDING IN THE GENOMICS AGE

ABSTRACT - Genetic improvement started with the domestication of some plant species more than 10,000 years ago and has been intensified to meet the demands for foods with population growth. Genetics, Plant Breeding and Biometrics have been closely associated for at least 85 years. The union of these areas of knowledge originated Quantitative Genetics. It can be easily proved that these sciences played an important role in the production of foods, wood, fiber and so forth to meet men needs in the last century. The advent of molecular markers and genome sequencing techniques in 1974, opened up the possibility of a selection strategy directly on the genotype (DNA). Several laboratory

techniques were implemented to obtain molecular markers and the DNA sequencing processes boomed and created what is called the genome era. The recombinant DNA technology development, allowing the transfer of genes among species that were unimaginable previously, made some scientists begin to question the future contribution of Quantitative Genetics. The objective of this publication is to show that all the available evidence points to the fact that Quantitative Genetics will grow more and more important. Research has shown that, especially for quantitative traits (QTLs - *quantitative trait loci*), the markers should be better associated to measurements of the phenotype and, to be useful, data need to be obtained in field experiments with the greatest experimental accuracy. Even the GMO's require extensive assessments of the exogenous gene in the greatest number of cultivars and in the greatest number of environments.

Key words: breeding, quantitative genetics, biotechnology, molecular markers.

O Melhoramento Genético antes de Mendel e Fisher

Fehr (1987) definiu o melhoramento como sendo a arte e a ciência de promover o melhoramento genético das plantas. Contudo, antes das pesquisas de Mendel e Fisher, entre outras, o melhoramento foi realizado exclusivamente como arte, por meio da habilidade visual dos nossos ancestrais em escolher as plantas para os próximos plantios.

Existem mais de 350.000 espécies de plantas descritas e, dentre elas, o homem utiliza ou utilizou como alimento menos de 3000, sendo cultivadas atualmente aproximadamente 300. Ressalta-se, ainda, o fato de que apenas 15 espécies contribuem com mais de 90% dos alimentos consumidos no mundo, sendo elas o arroz, trigo, milho, soja, sorgo, cevada, cana-de-açúcar, beterraba açucareira, feijão, amendoim, batata inglesa, batata-doce, mandioca, coco e banana (Paterniani, 2000).

Um questionamento que poderia ser feito é qual a razão de terem sido domesticadas certas espécies de plantas e outras não. Um bom exemplo é o caso do trigo. A domesticação dessa espécie, juntamente com outros cereais de inverno, como a cevada, o centeio e a aveia, ocorreu na região denominada de Crescente Fértil, atual

região que compreende a Jordânia, Israel, Líbano, Síria, Turquia, Iraque e Irã. Nessa região, o inverno é ligeiramente úmido e o verão, quente e seco. Essa condição climática deve ter favorecido a domesticação das plantas de trigo (Allard, 1999). Isso porque os grãos grandes dos ancestrais selvagens do trigo, quando comparados às sementes de outras espécies, provavelmente propiciavam germinação e emergência mais vigorosa, superando em crescimento inicial as plantas competidoras. Além disso, como nessa região a primavera é seca e coincidia com o momento do florescimento, plantas com flores cleistogâmicas também foram selecionadas. Essas flores, permanecendo fechadas durante grande parte do florescimento, diminuía a dessecação das anteras e estigmas, possibilitando maior vingamento floral, o que contribuía para uma maior produtividade de grãos. Deve-se considerar, ainda, que a menor variabilidade devido à autofecundação era favorável aos primitivos agricultores que, como nos dias atuais, almejavam maior uniformidade nos seus plantios.

A domesticação do trigo ocorreu aproximadamente há 9500 anos (Evans, 1998). Já os primeiros relatos da chegada do trigo na França só ocorreram durante o século XI. Inicialmente, os franceses utilizavam para fabricação de pão, o

centeio, que era uma espécie já bem adaptada e com boa produtividade. Entretanto, a aristocracia francesa preferia o pão de trigo e exigia dos camponeses a produção dessa gramínea, mesmo não estando bem adaptada às condições da França. Como o interesse dos camponeses pelo pão de trigo também aumentou, houve uma enorme pressão para se incrementar a área cultivada. Isso estimulou o processo seletivo, que contribuiu para o aumento da adaptação. Fato semelhante foi observado em outros países, inclusive em regiões tropicais. Dessa forma, o trigo se adaptou às mais diferentes regiões ecológicas, por meio da habilidade visual dos agricultores para a seleção.

O caso do milho é um outro bom exemplo. Estudos indicam que ele se originou no México e, embora haja algumas controvérsias sobre sua origem evolutiva, sabe-se que ele tem como parente silvestre mais próximo o teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). O teosinte é uma planta com muitas ramificações laterais que saem de sua haste central e terminam em uma inflorescência masculina. Cada ramificação também possui uma inflorescência feminina, que dá origem a uma espiga pequena. O milho, por sua vez, não perfilha e tem espigas maiores. Foi demonstrado que essa diferença no perfilhamento é devido apenas a um gene, o *tb1*, que contribui para o incremento acentuado na dominância apical e, com isso, ocorre a concentração dos fotoassimilados no caule central da planta e a supressão dos ramos axilares. Doebley *et al.* (1997) isolaram o gene e mostraram que o alelo *tb1*, presente no milho, se expressa duas vezes mais nesta espécie do que no teosinte. Esse fato sugere que alterações no sistema regulatório do gene foram responsáveis pela divergência tão acentuada entre as duas espécies.

O fato de apresentar menor número de perfilhos e espigas maiores foi provavelmente

uma das razões da escolha do milho para a domesticação. Evidências indicam que tribos indígenas existentes no México iniciaram a domesticação e obtiveram algumas variedades que se disseminaram para outras regiões da América. Tanto foi assim, que quando Cristóvão Colombo chegou à América, em 1492, já existiam centenas de variedades de milho e ele levou algumas amostras de milho para a Europa na ocasião do seu retorno, após o descobrimento.

Duvick (1996) faz um interessante relato do que ocorreu desde aquela época até o retorno do milho, já melhorado, para os Estados Unidos. Após esse acontecimento, houve aumento em produtividade no século XIX, por meio da seleção nas variedades de polinização aberta, visando maior adaptação às condições de cultivo. Posteriormente, até por volta de 1930, não houve modificações expressivas na produtividade, que se situava em torno de 2700 kg ha⁻¹. A partir da década de 30, o milho híbrido passou a ser cultivado, o que proporcionou uma verdadeira revolução na agricultura, não só americana, bem como na de todo o mundo.

A utilização dos híbridos tornou-se possível após ter sido descoberta a possibilidade de perpetuar a heterose por meio do cruzamento das linhagens, genótipo altamente endogâmico. Embora a heterose tenha sido uma das principais contribuições da ciência, quase um século se passou desde o seu descobrimento e ainda há controvérsias a respeito das bases genéticas de sua ocorrência (Crow, 1999).

Assim como ocorrera com o trigo, o melhoramento como “arte” propiciou que o milho fosse cultivado em praticamente todas as condições ambientais em que é realizada a agricultura no planeta, evidenciando novamente a eficiência da seleção. Esse mesmo fato ocorreu com grande parte das plantas cultivadas.

A origem da Genética Quantitativa

Mendel, um monge agostiniano, ficou na história por ter sido o primeiro a fornecer as bases do controle genético dos caracteres. A publicação do seu trabalho ocorreu em 1865 e ficou praticamente no anonimato até 1900, quando três cientistas, Correns, De Vries e Tschermak, independentemente, mostraram que a teoria de Mendel era correta. Assim, 1900 é considerado o ano do nascimento da Genética.

Como Mendel trabalhou com caracteres qualitativos, isto é, aqueles que se expressam em classes distintas, no início do século passado imaginava-se que a teoria não podia ser extrapolada para os caracteres quantitativos. Essa idéia errônea foi gradativamente eliminada a partir de alguns trabalhos como o de Yule, Nilsson-Ehle e East, dentre outros. Já em 1903, um pesquisador dinamarquês, Wilhelm Johanssen, mostrou que o fenótipo de um caráter quantitativo era devido à ação conjunta do genótipo mais o efeito do ambiente. Foi esse pesquisador que atribuiu o termo gene aos fatores Mendelianos.

Também no início do século XX, começaram os trabalhos que mudariam a história da pesquisa agrícola, sendo Sir Ronald Fisher o principal responsável. As pessoas que o conheceram afirmam que ele era um excelente matemático, com profundo senso prático. Fisher começou seus trabalhos na Estação Experimental de Rothamsted, na Inglaterra, dando origem à Estatística Experimental. Ele conciliou a Genética Mendeliana e a Biometria em 1918, dando origem à Genética Quantitativa, em um artigo publicado na *Transactions of the Royal Society of Edinburg*. Ressalta-se que essa publicação, de fundamental importância para a ciência, não tinha sido aceita antes pela *Royal Society of London*.

A publicação de Fisher (1918) enfocava a covariância e a correlação genética entre indivíduos aparentados. Com isso, foi possível decompor a variância genética em variância aditiva, devido aos efeitos médios dos genes, a variância de dominância, devido aos efeitos das interações intralélicas e a variância epistática, devido às interações interalélicas. Após esse trabalho, surgiram muitos outros, como o de Wright (1927), Cockerham (1954, 1956), Kempthorne, (1954) e Schnell (1963).

Comentando sobre os genes envolvidos no controle dos caracteres quantitativos, Mather (1949), de maneira semelhante a Fisher, dizia que deveria estar envolvido um grande número de genes de pequeno efeito, os genes menores ou modificadores, denominados de poligenes. Dessa maneira, os poligenes, que não podem ter seus efeitos isolados, quando associados, produzem alterações quantitativas que podem ser mensuradas.

A teoria da Genética Quantitativa possibilitou que fosse adicionado ao melhoramento como arte, a ciência, como preconizado por Fehr (1987). No caso das plantas autógamas, os principais métodos de melhoramento já eram conhecidos antes do advento da Genética Quantitativa (Jensen, 1988). Contudo, os conhecimentos dessa ciência permitiram avaliar os aspectos positivos e as deficiências de cada método e, assim, propor alternativas para melhorar a sua eficiência e criar novos métodos. No caso das plantas alógamas, ficou evidenciado porque a seleção massal não estava sendo mais eficiente. Demonstrou-se a importância da seleção recorrente, sobretudo após ter sido verificada a predominância da variância aditiva no controle dos caracteres. Ainda, tornou-se claro que só por meio da seleção recorrente poder-se-ia ter aumento da frequência dos alelos favoráveis e, por conseguinte,

incremento na expressão média do caráter sob seleção. Muitas outras informações importantes puderam ser obtidas e são relatadas em algumas publicações (Hallauer & Miranda Filho, 1982; Falconer & Mackay, 1996; Wricke & Weber, 1996; Kearsey & Pooni 1998).

O Melhoramento Genético convencional após o advento da Genética Quantitativa

Durante o século XX, a população do planeta passou de 1,5 bilhão de habitantes para 6,2 bilhões. Esse espetacular incremento exerceu uma forte pressão sobre a necessidade de aumentar a produtividade das principais espécies cultivadas. Efetivamente, esse fato ocorreu e foi uma das maiores contribuições da ciência para a sociedade. O aumento em produtividade deveu-se, em parte, à melhoria do manejo, envolvendo o intensivo emprego de fertilizantes, especialmente nitrogenados; melhor controle de pragas, doenças e plantas daninhas (Cardwell, 1982). Mas, sem dúvida, o emprego de cultivares melhoradas teve uma expressiva participação.

São inúmeros os trabalhos que mostram o progresso genético obtido em várias espécies, dentre eles nos EUA (Wilcox, 2001), na Europa (Berzonsky & Lafever, 1993) e no Brasil (Vencovsky & Ramalho, 2000). Esse progresso foi devido à utilização da heterose, no caso das alógamias, e também aos contínuos ciclos seletivos a que essas espécies cultivadas foram submetidas. Embora alguns pesquisadores insistam em afirmar que, atualmente, a produtividade das principais espécies cultivadas atingiu um limite e não está ocorrendo ganho adicional, os dados disponíveis apontam exatamente em direção contrária (Wilcox, 2001). Inclusive, tem sido mostrado que existem alternativas para gerar variabilidade que antes eram desconhecidas (Rasmusson & Phillips, 1997). É certo que, devido

ao nível de produtividade atingido, as diferenças a serem detectadas exigem que os experimentos sejam cada vez mais precisos, ou seja, é necessário realizar o melhoramento com mais ciência do que arte.

O Melhoramento na Era da Genômica

A natureza química do material genético começou a ser elucidada por meio do trabalho de R. Griffith, em 1928, quando ele mencionou a existência do que foi denominado de princípio transformante. Mais tarde, em 1944, três pesquisadores, Avery, MacLeod e McCarty demonstraram que a substância responsável pela transmissão da informação entre indivíduos e células era o DNA. A estrutura da molécula foi estabelecida em 1953, por Watson e Crick, em um trabalho que foi a base de todo o desenvolvimento da Biologia Molecular.

A descoberta das enzimas de restrição, que cortam o DNA em pontos específicos, foi feita por Arber, em 1968. Esse foi um marco importante na transformação genética, sendo que logo depois, em 1973, Stanley, Cohen e Brown combinaram uma enzima de restrição com o plasmídeo de *Agrobacterium*, para isolar um gene e introduzi-lo em outro organismo. A manipulação do material genético começou efetivamente em 1972, na Universidade Stanford, nos Estados Unidos, quando o Dr. Paul Berg conseguiu unir a sequência do DNA de *Escherichia coli* à do vírus *Simian papiloma*. Esse feito pode ser considerado o marco zero da denominada “era da genômica”. Todas essas técnicas e muitas outras não comentadas têm levado a um melhor conhecimento da ação gênica. Atualmente, já são conhecidos mais detalhes da atuação dos genes em relação ao que se dispunha há cinquenta anos, quando a estrutura do DNA foi estabelecida. Sabe-se, hoje, por exemplo, que o gene depende

de regiões reguladoras situadas em várias posições nos cromossomos. Além disso, possui um sítio promotor, que é uma região do DNA próxima ao gene propriamente dito, onde se prende a RNA polimerase, enzima responsável pela transcrição da informação. O gene estrutural, por sua vez, pode ser dividido em duas partes, os íntrons e éxons. A função dos íntrons ainda não está bem elucidada, porém acredita-se que os mesmos tenham papel na regulação gênica. Já os éxons possuem a informação genética que dará origem ao RNA mensageiro. Esses comentários são indispensáveis no contexto dos marcadores moleculares, porque os diferentes alelos de um gene podem surgir por alterações em qualquer uma de suas partes constituintes e não apenas no seu exon. Glazier *et al.* (2002) discutem esses aspectos para vários genes em plantas e animais e apresentam uma relação de mutantes em vários casos. Comentam, por exemplo, que em um dos genes para o tamanho dos frutos em tomate, o OFRX, ocorre uma alteração no sítio promotor. Já na mesma espécie, a variação no conteúdo de açúcar de frutos, resulta de uma alteração nos íntrons do gene Lin 5. Em arroz, a sensibilidade ao fotoperíodo é devido à substituição de uma das bases na posição 91 do gene CK2 α , no códon que codifica a lisina, dando origem a um ponto final. Resta comentar, também, que apenas uma ínfima percentagem do total de bases que compõem o DNA de uma determinada espécie é efetivamente transcrita.

Entre as várias ferramentas de manipulação do DNA que foram desenvolvidas, a dos marcadores moleculares foi uma das que mais chamou atenção no melhoramento de plantas, sobretudo em função da possibilidade de identificar-se os indivíduos superiores diretamente pelo seu DNA. Nesta publicação não serão relatadas as diferentes técnicas moleculares existentes, que estão disponíveis em várias literaturas (Lander

& Botstein, 1989; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Kumar, 1999; Lanza *et al.*, 2000). Também não serão comentadas todas as possibilidades do emprego de marcadores, que são encontradas em várias publicações (Paterson *et al.* 1991; Stuber, 1992; Lee, 1995). O que se deseja comentar é a contribuição da Biologia Molecular nos últimos trinta anos no melhoramento genético de caracteres quantitativos.

Marcadores Moleculares

1- Escolha de Genitores

Em qualquer espécie cultivada, o germoplasma disponível possui milhares de linhagens e/ou cultivares. Em plantas autógamas, por exemplo, as possibilidades de combinação desse germoplasma por hibridação são infinitas. Por isso, a escolha dos genitores a serem cruzados para obtenção da população segregante, para ser submetida à seleção, tem despertado a atenção dos geneticistas há muito tempo. Segundo Baezinger & Peterson (1991), as metodologias disponíveis podem ser agrupadas em duas categoriais: aquelas que consideram o comportamento dos genitores *per se* e aquelas que envolvem o desempenho de suas progênes. Entre as que utilizam o comportamento *per se* dos genitores, estão as que envolvem a média e medidas de divergência genética, tais como, coeficiente de parentesco, análise multivariada e os marcadores moleculares. Quanto ao comportamento das progênes, os métodos que têm sido mais utilizados são os cruzamentos dialélicos, as estimativas das médias das n linhagens na geração F_{∞} ($m + a$) e a probabilidade de se obter linhagens que superem um determinado padrão na geração F_{∞} (Jinks & Pooni, 1976). Na literatura, há inúmeros relatos do emprego de todas essas metodologias (Abreu, 1997; Souza Sobrinho, 2001; Santos, 2000; Mendonça, 2001; Carneiro, 2002).

Uma boa população para o melhoramento é aquela que associa média alta e a maior variabilidade possível para o caráter em questão. Os que advogam o emprego de medidas de divergência, especialmente a partir de marcadores moleculares, têm como princípio que, quanto maior a variabilidade, maior a probabilidade de encontrar um genótipo com bom desempenho. Entretanto, os melhoristas convencionais não desejam muita variabilidade. O seguinte exemplo ilustra o que se pretende evidenciar. Supondo que se deseje combinar em uma linhagem, 26 locos com alelos favoráveis, sendo estes representados pelas letras maiúsculas. A finalidade é, portanto, obter-se uma linhagem que possua a constituição AABB ... ZZ. Em uma primeira situação, pode-se considerar dois genitores que se complementam em todos os locos da maneira mostrada abaixo:

L_1	L_2
AA bb CC DD ... zz	aa BB cc dd ... ZZ

Em todos os locos em que a L_1 tem alelos favoráveis, a L_2 possui alelos desfavoráveis e vice-versa. Desse modo, na geração F_1 tem-se: Aa Bb Cc Dd ... Zz. Na geração F_2 , a segregação é máxima e o indivíduo com todos alelos favoráveis ocorre na frequência de $(\frac{1}{4})^{26}$. Na, F_∞ que é a geração de interesse, a possibilidade de se obter a linhagem AA BB CC DD ... ZZ, será de $(\frac{1}{2})^{26}$, isto é, uma em 67.108.864 linhagens.

Seja agora as linhagens L_3 e L_4 , que estejam segregando para apenas 13 locos, uma vez que elas são linhagens elites e têm 13 dos 26 locos já fixados com alelos favoráveis:

L_3	L_4
AA bb CC DD ... zz	AA BB CC dd ZZ

A F_1 terá a constituição AA Bb CC Dd... ZZ, segregando em 13 locos. A probabilidade de se obter na a linhagem desejada, nesse caso, será

de $(\frac{1}{2})^{13}$. Uma probabilidade muito superior à anterior. É por essa razão que os melhoristas com maior experiência têm como prática sempre cruzar “bom x bom” (Rasmusson & Phillips, 1997; Dudley, 1997), sem se preocupar com variabilidade em excesso. O princípio para isso é que o melhoramento deve ser uma acumulação de vantagens.

Pelo exposto, é difícil decidir qual genitor cruzar, utilizando apenas a medida de diversidade. Quando se deseja a produtividade de grãos, mas se escolhem os pais por meio de marcadores moleculares, é utilizada toda a divergência existente. Os pais podem divergir para vários caracteres e não apenas para a produtividade. É principalmente por essa razão que, nas várias situações em que se utilizaram marcadores moleculares para a escolha dos pais, os resultados não foram tão promissores (Machado 2000; Mendonça, 2001). No futuro, quando estiverem disponíveis marcadores moleculares específicos para o caráter sob seleção, a medida de divergência poderá ser útil, se associada a dados de desempenho médio dos pais.

2- Teste de identidade genética para a proteção de cultivares

Com a lei de proteção de cultivares, ficou estabelecido que essas devem ser distintas, homogêneas e estáveis. Por isso, é exigida uma descrição detalhada, provando que a nova cultivar é distinta das pré-existentes. É fácil entender que, para a maioria das espécies em que se dispõe de alguns programas de melhoramento, com o tempo, os descritores serão insuficientes para discriminar as novas cultivares. Uma alternativa é o emprego de marcadores moleculares com essa finalidade, o que se denomina de impressão digital do DNA (“DNA fingerprint”). Entre algumas das vantagens dessas metodologias, Ferreira

(2003) cita: a) independência da interação genótipos x ambientes, o que não ocorre com os marcadores morfológicos; b) o alto polimorfismo no DNA, especialmente em regiões de microssatélites; c) o baixo custo da genotipagem; d) o menor tempo requerido na análise do DNA em relação à análise fenotípica, para um grande número de espécies vegetais.

Contudo, Troyer & Rocheford (2002), utilizando como referência a cultura do milho nos EUA, mostraram exemplos de que um grande relacionamento entre linhagens ou híbridos, baseados em marcadores moleculares, não excluem diferenças expressivas no desempenho agrônômico. Em um dos exemplos, foram avaliados, em 3059 experimentos, dois híbridos simples, ambos obtidos a partir de uma linhagem comum a eles, a LH51, cruzada com outras duas linhagens, a B73, para obtenção de um dos híbridos e a LH119, para o outro. Além disso, LH119 é derivada de um híbrido em que uma das linhagens é a B73, sendo, então, as duas linhagens muito relacionadas. Foi verificado que elas possuem 88,2% de similaridade genética, utilizando marcadores RFLP. Observa-se, na Tabela 1, que os dois híbridos apresentaram a mesma produtividade de grãos, porém o híbrido B73-LH51 apresentou florescimento mais precoce, altura da planta 3% menor e de espiga, 9% menor. O outro híbrido foi 5% mais vigoroso na primavera, 15% superior em 'stay green', com redução de 18% em plantas quebradas. Assim, o híbrido LH119 x LH51 foi recomendado para regiões com maior quantidade de chuvas durante o cultivo. Demonstrou-se também que a linhagem LH119 foi mais tolerante ao calor e à seca do que a B73, no florescimento.

Os autores salientam que, dependendo de como essa tecnologia for empregada, com regras muito rígidas na identificação de linhagens

essencialmente derivadas, pode haver sérios prejuízos ao futuro do melhoramento genético.

No Brasil, ainda não foi regulamentado o emprego de marcadores moleculares como descritores de cultivares a serem protegidas. Nos EUA, é permitido, mas há controvérsia com relação ao nível de similaridade a ser adotado. Smith & Smith's (1989) propuseram o nível de 75% de similaridade do genoma, obtido por meio de marcadores moleculares, como indicador de uma cultivar essencialmente derivada de outra. Se adotada essa proporção, a linhagem LH119 seria considerada similar à B73, e o obtentor deveria pagar *royalties* ao detentor da linhagem B73. Segundo Troyer & Rocheford (2002), se adotado esse nível de similaridade, possivelmente linhagens, como a LH119, que trouxeram vantagens aos agricultores, seriam pouco ou não utilizadas na produção de híbridos comerciais.

Esse não é um problema exclusivo dos marcadores moleculares, mas sim de todos os descritores utilizados para a proteção de cultivares. Entretanto, é preciso que o assunto seja amplamente debatido, para não ser mais um entrave aos programas de melhoramento no Brasil. Isto porque as melhores linhagens ou cultivares, ou seja, aquelas que apresentam maior adaptação em várias condições, certamente terão muitos locos com constituições genéticas semelhantes.

3- Seleção assistida

O princípio da seleção assistida por marcadores é a correlação genética entre a marca e os diferentes genes envolvidos no controle do caráter. A correlação genética pode ocorrer devido à pleiotropia e à ligação. A pleiotropia ocorre quando um gene afeta mais de um caráter ao mesmo tempo. No caso dos marcadores, seria preciso que a marca estivesse dentro do gene, de modo que eles estariam sempre juntos. Mesmo para um caráter monogênico, essa possibilidade é muito pequena, e, para um caráter quantitativo,

TABELA 1. Comparação entre as linhagens B73 e LH119 em combinação híbrida com a linhagem LH51. Resultados médios de avaliações realizadas em 3059 experimentos.

Características	Híbridos	
	B73 x LH51	LH119 x LH51
Produtividade (t ha ⁻¹)	9,53	9,53
Umidade de grãos (g Kg ⁻¹)	203	202
Vigor na primavera (notas de 1 a 8)	5,7	6,0**
Graus dias no florescimento	718	705**
Altura da planta (cm)	232	226**
Altura da espiga (cm)	122	111**
<i>Stay-green</i> – notas	3,4	3,9**
Acamamento – colmo (%)	6,1	5,0**
Acamamento - raiz (%)	3,6	2,2**

Fonte: adaptado de Troyer & Rocheford (2002).

é impossível que isso ocorra. Assim, espera-se que os diferentes marcadores estejam ligados com os locos que contenham o alelo de interesse.

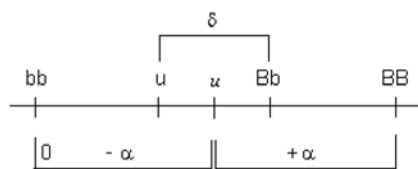
O princípio da ligação, que foi estabelecido por um brilhante geneticista, Thomas Hunt Morgan, em 1922, é o fundamento da seleção assistida por marcadores. É preciso salientar que a correlação devido à ligação não é permanente, ocorrendo somente quando há desequilíbrio de ligação. Para exemplificar, considere dois caracteres, o caráter X representado por M e o caráter Y, representado pelo gene B. Na tabela 2, é mostrado o que ocorre na geração F₂, quando M e B não estão ligados e quando estão ligados com uma frequência de recombinação (c) de 10%. É mostrado também o que irá ocorrer na presença de ligação quando o equilíbrio for atingido. Veja que, quando a distribuição é independente, a covariância entre X e Y é zero, e, evidentemente, a correlação entre eles também será nula. Portanto, numa situação como essa, se M fosse uma

marca, ela não teria utilidade. Ocorrendo ligação, a geração F₂ não está em equilíbrio, pois as frequências alélicas e genotípicas serão alteradas com o cruzamento ao acaso. Verifica-se que, nessa situação, como c = 10, a covariância entre MB é diferente de zero, e, portanto, a marca (M) pode ser utilizada na identificação do gene B. Com o decorrer do inter cruzamento, a população irá atingir o equilíbrio, mesmo com a seleção. Nota-se, ainda, na Tabela 2, que a covariância passa a ser nula e a mesma observação feita para a distribuição independente é válida com a ligação. Esse é um ponto fundamental que, muitas vezes, passa despercebido pelos geneticistas.

A teoria da seleção assistida por marcadores é relatada em algumas literaturas (Lande & Thompson, 1990; Stuber, 1992; Dudley, 1993; Bearzoti, 1997) e um sumário do que se encontrou será comentado a seguir. O modelo mostrado abaixo é usado para representar o valor genotípico do loco B:

TABELA 2. Estimativas da covariância (COV) entre um marcador M e o loco B, considerando a distribuição independente e presença de ligação ($c=10$), com a geração $F_1 = \frac{MB}{mb}$. Valores hipotéticos de $BB = 10$; $Bb = 6$; $bb = 4$ e $MM = 6$, $Mm = 4$, $mm = 2$.

Genótipos		Valores fenotípicos		Frequência em F_2		Equilíbrio de Ligação
X	Y	X	Y	Distribuição Independente	Genes ligados ($c = 10$)	
MM	BB	6	10	0,0625	0,2025	0,0625
MM	Bb	6	6	0,1250	0,0450	0,1250
MM	bb	6	2	0,0625	0,0025	0,0625
Mm	BB	4	10	0,1250	0,0450	0,1250
Mm	Bb	4	6	0,2500	0,4100	0,2500
Mm	bb	4	2	0,1250	0,0450	0,1250
mm	BB	2	10	0,0625	0,0025	0,0625
mm	Bb	2	6	0,1250	0,0450	0,1250
mm	bb	2	2	0,0625	0,2025	0,0625
				$Cov_{G_{XY}} = 0$	$Cov_{G_{XY}} = 3,20$	$Cov_{G_{XY}} = 0$
Correlação (X,Y)				$r = 0$	$r \neq 0$	$r = 0$



em que u é ponto médio entre os dois homozigotos, α é o desvio dos homozigotos em relação à média e δ é o desvio dos heterozigotos em relação à média. Esses valores podem ser extrapolados para o valor genotípico associado à marca M ligada ao loco B (Dudley, 1993), ou seja:

$$\overline{MM} = (1 - 2c)\alpha + 2c(1 - c)\delta$$

$$\overline{mm} = -(1 - 2c)\alpha + 2c(1 - c)\delta$$

$$\overline{Mm} = (1 - 2c + 2c^2)\delta$$

Nessa condição, a média de uma geração F_2 associada à marca será: $\overline{F}_2 = \left(\frac{1}{2}\right)$ que corresponde ao contraste $\overline{MM} - \overline{mm} = 2\alpha(1 - 2c)$. Esse último contraste avalia a capacidade da associação marcador-loco genético, variando em função da diferença genotípica dos homozigotos (α) e da frequência de recombinação entre a marca e o gene. Quanto mais próximo, maior será o contraste. Se a distribuição é independente ($c = 0,5$), não se detecta associação entre a marca e o gene. Esse contraste pode ser testado de vários modos, alguns deles são discutidos por Dudley (1993) e Kearsey e Faquar (1997) e não serão comentados aqui.

A variância genética associada aos marcadores (σ_{GM}^2) é fornecida por $\sigma_{GM}^2 = (1 - 2c)\sigma_A^2 + [1 - 8c(1 - 3c + 4c^2 - 2c^3)]\sigma_D^2$ e a variância genética não explicada pelo marcador é: $\sigma_{GDM}^2 = 4c(1 - c)\sigma_A^2 + 8c(1 - 3c + 4c^2 - 2c^3)\sigma_D^2$ em que: σ_A^2 é a variância genética aditiva e σ_D^2 é a variância de dominância (Souza Júnior, 1992). Se $c = 0$, toda variância é explicada pelo marcador, isto é, $\sigma_{GM}^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2$ e $\sigma_{GDM}^2 = 0$. Por outro lado, se $c = 1/2$, $\sigma_{GM}^2 = 0$ e $\sigma_{GDM}^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2$. Pode-se, então, ter a proporção da variância aditiva explicada pelo marcador pela expressão $p = \sigma_{AM}^2 / \sigma_A^2$. Ela é linearmente associada ao coeficiente de recombinação c , ou seja, 1 ou 100% com $c = 0$ e 0 quando $c = 0,5$.

A partir da expressão do ganho pela seleção fenotípica (GS_F), utilizando indivíduos ou famílias, pode-se inferir sobre a eficiência da seleção assistida por marcadores. A expressão do ganho é $GS_F = i_F c_F \sigma_F h^2$, em que i_F é a intensidade da seleção, c_F é o controle parental, isto é, $1/2$ se a seleção ocorre após a polinização, $1,0$ se antes e 2 se a recombinação é realizada com clones ou S_1 , σ_F é o desvio padrão fenotípico da unidade seletiva e h^2 a herdabilidade do caráter, considerando que, quando $c = 0$ ou muito próximo de zero, o marcador explicará a maior parte da variação e a herdabilidade associada ao marcador será 1. Assim, a equação do ganho com a seleção, utilizando o marcador, passa a ser $GS_M = i_M c_M \sigma_{AM}$. Desse modo, a eficiência da seleção, utilizando o marcador em relação à

fenotípica será: $\frac{GS_M}{GS_F} = \frac{i_M c_M \sigma_{AM}}{i_F c_F \sigma_F h^2}$. E

como $h^2 = \sigma_A^2 / \sigma_F^2$, pode-se escrever:

$$\frac{i_M c_M \sigma_{AM}}{i_F c_F \sigma_F \frac{\sigma_A^2}{\sigma_F^2}} = \frac{i_M c_M \sigma_{AM}}{i_F c_F \frac{\sigma_A^2}{\sigma_F}} \cdot \frac{\sigma_F}{\sigma_A} = p \text{ associado}$$

ao marcador tem-se: $\frac{i_M c_M \sqrt{p}}{i_F c_F h}$. Considerando i_M

$= i_F$ e $c_M = c_F$, tem-se: $\frac{\sqrt{p}}{h}$. Fica evidente que o ganho, utilizando o marcador, será superior à seleção fenotípica quando $p > h^2$.

Como foi visto, a seleção assistida por marcadores será mais eficiente quando a proporção da variância genética aditiva explicada pelo marcador for maior que a herdabilidade. Então, ela só seria apropriada para caracteres de baixa herdabilidade, normalmente h^2 inferior a 0,3. Contudo, para que o p seja confiável, ele tem que ser obtido a partir de experimentos bem conduzidos, em que a h^2 necessariamente seja alta. Depreende-se que o benefício máximo da seleção assistida por marcadores de QTLs (*quantitative traits loci*) seria aquela praticada sob condições de alta h^2 e quando a característica de interesse é difícil de ser medida (Dudley, 1993).

Tem ocorrido um acúmulo de informações a respeito dos QTLs. Mackay (2001) discute alguns resultados com *Drosophila*, verificando que o tamanho médio do intervalo, contendo um QTL foi de 8,9 cM. Isso corresponde a uma região do DNA, contendo 4459 Kb, sendo que a variação de tamanho foi de 0,1 a 44,7 cM. Como o genoma da *Drosophila* contém 120Mb, estima-se que ela possua 13600 genes, com tamanho médio de 8,8 Kb. Assim, em um QTL médio

estão incluídos 507 genes, que podem variar de 11 a 2191 genes. Como se observa, mesmo para essa espécie, ainda está distante a possibilidade de utilizar o QTL efetivamente na seleção. Ressalta-se que o QTL não é um loco ou conjunto de locos propriamente dito, mas, sim, segmentos em diferentes regiões dos cromossomos, associados a outros genes que afetam o caráter quantitativo. Alguns trabalhos em que se utilizou somente a seleção fenotípica reforçam esse fato. Um dos trabalhos de maior duração de que se tem informação é o que está sendo realizado para seleção em milho para teor de óleo e proteína (Dudley & Lambert, 1992). Já foram realizados mais de 100 ciclos seletivos com resposta contínua à seleção. Dudley (1977) fez uma análise detalhada dos resultados com 76 ciclos seletivos. A população original possuía 1,09 mg/g de proteína no grão, passando para 2,89 mg/g por meio da seleção no sentido positivo (aumento do teor de proteína) e a 0,4 mg/g, com a seleção no sentido negativo. Houve um incremento de 165% no teor de proteína, que representou um ganho de 2,17% por ciclo seletivo (Dudley & Lambert, 1992). Os autores comentam que a resposta contínua à seleção só seria possível se o caráter fosse controlado por um grande número de genes de pequeno efeito (poligenes ou modificadores). Utilizando algumas informações de genética quantitativa, ele estimou que o número de genes para esse caráter está próximo de 200.

Posteriormente, Lynch & Walsh (1998) relataram resultados de marcadores moleculares associados a esse caráter. Para isto, foram cruzadas as duas populações com alto e baixo teor de proteína, após 76 gerações. Desse cruzamento, foram avaliadas 100 famílias $F_{2,3}$, procurando cobrir todo o genoma, utilizando-se marcadores moleculares espaçados de 20 cM. Foram encontradas 22 marcadores, distribuídos em todos os

10 cromossomos para o caráter. Contudo, apenas 6 marcadores explicaram 65% da variação. Segundo os autores, esse resultado pode ter ocorrido devido ao pequeno poder dos testes, resultando em uma superestimativa dos efeitos dos marcadores. Apesar disso, esses resultados são coerentes com a proposição de Mather (1949), que sugeriu estarem os poligenes organizados nos cromossomos em blocos gênicos. Nesses blocos, os vários locos envolvidos na expressão do caráter estariam próximos um dos outros, como por exemplo, ++ --- -++ -, em que + representa os locos com alelos favoráveis e - os desfavoráveis. A liberação de variabilidade seria gradual, por meio da recombinação. Desse modo, seria explicada a resposta à seleção em longo prazo, observada para esses caracteres. Assim, um marcador de QTL estaria ligado ao bloco gênico, sendo essa a razão de se encontrar um pequeno número de marcadores que explica grande parte da variação. Numa situação como essa, os marcadores associados ao QTL seriam de pequena utilidade.

Apesar de todos os avanços, ainda persiste a incerteza sobre a natureza do controle dos caracteres quantitativos, a mesma dúvida que tinha Fisher, Mather e Comstock há mais de 60 anos. O primeiro seqüenciamento completo de um genoma vegetal foi o da *Arabidopsis*. Nessa espécie, foi detectada a presença de 25500 genes, sendo que 45% deles estão em 4 ou mais cópias (Walsh, 2001). No caso do milho, tem sido constatado também que mais de 1/3 do genoma representa várias cópias repetidas de genes. Provavelmente, essas cópias podem ser os genes candidatos aos caracteres quantitativos, os poligenes. Tudo indica que o tamanho dos QTLs disponíveis seja insuficiente para se promoverem os ganhos esperados com a seleção assistida. Contudo, o acúmulo de informações a esse respeito deverá

propiciar melhor entendimento do controle genético dos caracteres quantitativos.

4- Seleção assistida por marcadores no retrocruzamento

O retrocruzamento é um método amplamente utilizado quando se tem uma boa linhagem, mas que é deficiente em uma ou poucas características. Ele foi utilizado por Briggs por volta de 1922, visando a obtenção de linhagens de trigo resistente a patógenos. Já, naquele momento, ele enfatizou um método perfeito, pois o melhorista pode prever o resultado a cada retrocruzamento efetuado (Allard, 1999). Seja, por exemplo, uma linhagem boa (P_1), que foi cruzada com uma linhagem (P_2) que possui um alelo que pode solucionar um problema no P_1 . Esse genitor (P_1) é denominado de recorrente. A geração F_1 é novamente cruzada com o P_1 , obtendo-se o primeiro retrocruzamento (RC_1). Nessa condição, em média, 75% dos alelos já serão do pai recorrente. No segundo retrocruzamento (RC_2), esse número passa para 87,5%. Com x retrocruzamentos, a proporção de recuperação do

genitor recorrente é fornecida por $\frac{2^{x+1} - 1}{2^{x+1}}$. Veja que a recuperação do pai recorrente ocorre de modo previsível e rapidamente. Na prática, são utilizados de 5 a 6 retrocruzamentos.

Uma das possibilidades de se utilizar a seleção assistida foi exatamente no método do retrocruzamento (Tanksley *et al.*, 1989). Os marcadores podem ser utilizados de dois modos (Hospital & Charcosset, 1997): a) para acelerar a recuperação dos alelos do genitor recorrente que estão distribuídos em todos os cromossomos e b) para auxiliar na eliminação dos alelos do genitor não recorrente que estão ligados com o(s) loco(s) de interesse para os melhoristas.

Inicialmente, será enfatizado o primeiro caso, isto é, para acelerar a recuperação dos alelos

do genitor recorrente. Como já foi mencionado, o que se tem, a cada geração de retrocruzamento, é a frequência média de recuperação. Como há variação, por meio de emprego de marcadores pode-se identificar os indivíduos que mais se aproximam do genitor recorrente. Já foram realizados vários estudos teóricos que comprovam a sua eficiência (Hospital *et al.*, 1992; Frisch *et al.*, 1999; Frisch & Melchinger, 2001). É importante que se diga que as comparações foram efetuadas considerando que os melhoristas não realizam nenhuma seleção. Quando os dois genitores são bem diferentes, a seleção que o melhorista realiza também acelera o processo. Essa seleção será tanto mais eficiente quanto maior for o tamanho da população. Nesse contexto, a seleção assistida proporciona alguma vantagem, mas, dependendo do custo do emprego dos marcadores, pode não compensar o investimento efetuado, principalmente se o melhorista realiza a seleção.

Infelizmente, não existem muitos resultados, na literatura, de situações em que os marcadores foram efetivamente utilizados. Em uma das poucas referências encontradas, foi com a cultura do milho para transferência de genes de alto teor proteína (QPM) entre linhagens de milho (Duarte, 2003). Ele considerou duas situações, sendo que em uma delas a recuperação do parental recorrente foi de 86,5% e na segunda, de 85,5% após 2 retrocruzamentos, valores que são muito próximos do esperado no RC_2 , que é de 87,5%. O autor concluiu que o uso do marcador não proporcionou a vantagem almejada.

O grande problema do retrocruzamento é quando o loco de interesse é ligado próximo a outro cujo fenótipo do genitor não recorrente é indesejável, que é a segunda situação mencionada anteriormente. Com isso, a transferência do gene de interesse leva consigo outro(s) indesejável(veis). Esse fenômeno é conhecido por

‘linkage drag’. Segundo Souza (2001), a seleção assistida pode reduzir ou eliminar esse problema por meio da identificação de recombinantes, utilizando os marcadores moleculares.

McClean (2003) sugere, após o primeiro retrocruzamento, utilizar um marcador a 1 cM do gene de interesse. Aquelas linhas, em que ocorre a recombinação, poderiam ser selecionadas. Em seguida, seriam novamente retrocruzadas e a descendência submetida a um novo marcador de 1 cM no outro lado do gene. Assim, em somente duas gerações a quantidade de DNA indesejável seria reduzida a 2 cM. Como o próprio autor enfatiza, a dificuldade está em identificar esses dois marcadores tão próximos do gene de interesse. Além do mais, para se ter o recombinante, como já mencionado, a descendência deve ter um grande número de indivíduos. Isso é factível para algumas espécies, mas para outras não, como o feijão e a soja, em que os cruzamentos são difíceis e com poucos descendentes por cruzamento. Nesse contexto, é preciso salientar que, se há disponibilidade de um grande número de descendentes, o melhorista pode realizar a seleção fenotípica, porque, no caso de genes ligados com efeitos indesejáveis, a diferenciação fenotípica é normalmente fácil.

Plantas transgênicas no melhoramento

Os trabalhos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento de uma nova e importante ferramenta, que possibilita a introdução de genes por meio não sexual. Com isso, tornou-se possível a transferência de genes entre espécies não relacionadas, como, por exemplo, de uma bactéria para uma planta, ou do homem para bactérias e muitas outras combinações. Surgiu, assim, a possibilidade de se criar variabilidade por meio antes não imaginado. Essa nova tecnologia tem apresentado uma repercussão muito grande, com amplo envolvimento da mídia, gerando, até

mesmo, grupos bem distintos: aqueles que a defendem e os tradicionalmente contra a tecnologia.

Deixando de lado os aspectos mais ideológicos do que científicos, o que se pretende mostrar é que, mesmo utilizando os transgênicos, ainda há um enorme envolvimento do melhoramento tradicional e, conseqüentemente, também da biometria. Para ilustrar, vamos utilizar o exemplo de maior sucesso até o momento, que foi a obtenção da soja resistente ao herbicida glifosato. O modo de ação do herbicida e como foi realizada a construção gênica são apresentados em detalhe por Padgett *et al.* (1995). O importante é mencionar que a incorporação realizou-se por meio de aceleração de partículas – a biobalística, e, portanto, aleatoriamente inserido no DNA da soja. Para a transferência, utilizou-se a linhagem A5403 e uma marca de seleção para identificar as células transformadas, as quais deram origem às plantas com o provável gene de interesse. No total, foram obtidas 316 plantas e, na primeira geração, após a transformação (R_0), foram identificadas 40 linhas promissoras, avaliadas em casa de vegetação (Figura 1). Uma das linhas, a 40-3, não mostrou nenhum dano quando pulverizada com o glifosato e foi selecionada. Essa planta foi representada na geração R_2 por apenas 4 famílias e as sementes das famílias foram avaliadas em um ou dois locais, dependendo da disponibilidade de sementes. Dessas linhas, destacou-se a 40-3-2, que foi retrocruzada para introduzir o gene em outras linhagens. Além disso, ela ainda foi avaliada em vários ambientes por algumas gerações.

Como se observa, o processo se assemelha ao método genealógico, usualmente utilizado no melhoramento convencional para identificar-se uma linhagem desejável. Além do mais, foi necessária intensiva avaliação em vários locais. Mesmo quando o gene foi transferido para outras linhagens, por meio de retrocruzamentos,

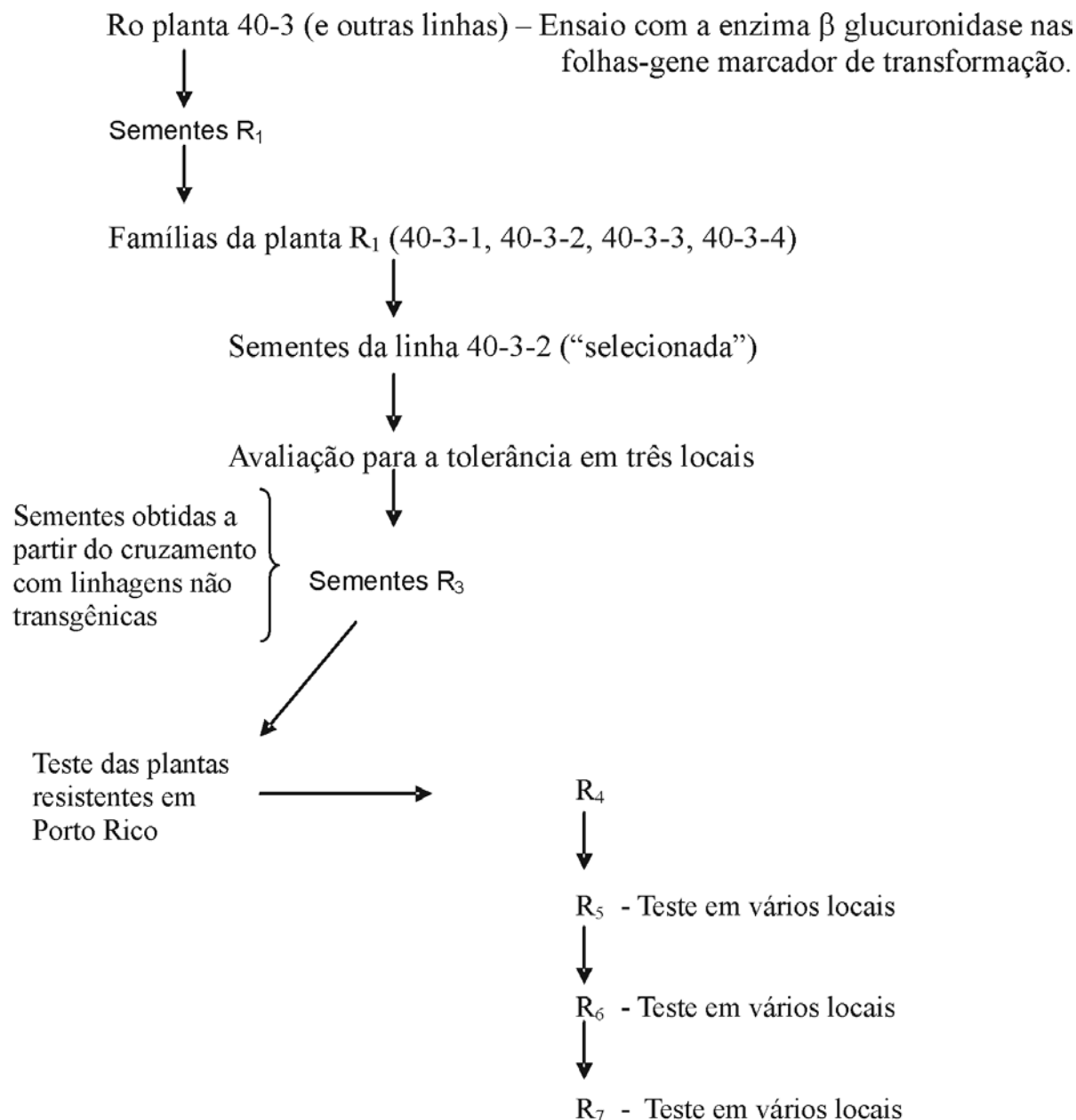


FIGURA 1. Esquema utilizado para obtenção do primeiro transgênico de soja resistente ao glifosato, a partir da identificação de uma linhagem promissora. Adaptado de Padgett *et al.* (1995).

houve necessidade de inúmeros testes para verificar se outros caracteres da planta não foram afetados.

Algumas publicações têm procurado estabelecer paralelos entre o melhoramento convencional e por meio de transgênicos (Prakash, 2001;

Gepts, 2002). No melhoramento tradicional, normalmente são manuseados milhares de genes simultaneamente, e nos transgênicos, um ou poucos genes. Uma outra diferença apresentada por Gepts (2002) é que os transgênicos atuais envolvem um ganho de função com o gene inserido,

ao passo que no convencional, quase sempre há perda de função. O referido autor justificou sua proposição baseada no fato de que muitos alelos importantes são recessivos, ou seja, não produzem a enzima ou alteram a estrutura da proteína, de modo que ela não funcione. Por outro lado, nos transgênicos é produzida uma nova proteína que irá conferir resistência aos insetos ou tolerância aos herbicidas, por exemplo. Contudo, há inúmeras exceções como alelos importantes no melhoramento convencional que são dominantes e casos de transgênicos em que se procura impedir a síntese de alguma proteína da planta transformada.

Não resta dúvida de que os transgênicos poderão dar uma importante contribuição para a sociedade. Um questionamento que surge é que, até o momento, foram introduzidos nas plantas genes que, pelo menos aparentemente, são seletivamente neutros. Ou seja, para a planta, o fato de ser resistente ou não aos herbicidas, por exemplo, deve ter pequena importância na sua adaptação. Já quando estão envolvidas alterações em caracteres controlados por mais de um gene, em enzimas de várias rotas metabólicas e que representam o resultado de milhares de anos de evolução, é provável que as dificuldades sejam bem maiores. Há várias tentativas a esse respeito, como plantas com redução de lignina, maior tolerância à seca e ao frio, etc. Só o tempo poderá mostrar se os transgênicos serão eficientes também nesse caso. No entanto, até os resultados aparecerem deve-se continuar utilizando os métodos tradicionais, que embora não produzam mudanças com grande repercussão em curto prazo, mostraram-se capazes, em médio ou longo prazo, de moldarem as plantas com a seleção para atender aos anseios dos homens. No Brasil, por exemplo, enquanto a discussão sobre o comércio ou não de transgênicos da soja se prolonga

por mais de 5 anos, os melhoristas prosseguiram com a seleção. Nesses, trabalhos foram obtidas outras linhagens resistentes ao cancro da haste e ao nematóide do cisto, apenas para citar algumas, com importância superior à dos transgênicos para o agronegócio da soja.

Seqüenciamento do Genoma

O seqüenciamento do Genoma tem por objetivo conhecer toda a seqüência de bases do DNA de uma determinada espécie. O que parecia ser um horizonte distante há pouco mais de 10 anos, tornou-se uma realidade. Os seqüenciadores automáticos disponíveis atualmente são capazes de seqüenciar alguns milhões de bases por dia. Como já mencionado, a primeira espécie vegetal que teve o genoma completamente decifrado foi a *Arabidopsis thaliana*, que possui 120 Mpb. A ênfase atual está sendo direcionada ao conhecimento de seqüência completa do genoma estrutural (EST: "Expressed Sequence Tag") de algumas espécies cultivadas como o arroz, cana-de-açúcar e café, dentre outras.

Muito se espera dos resultados a serem obtidos com o conhecimento detalhado do genoma. A quantidade de recursos humanos e financeiros aplicados a esses estudos é enorme em todos os países. Os mais otimistas, como Ferreira (2003), comentam que não será surpresa se esse conhecimento proporcionar uma verdadeira revolução no melhoramento genético. Há que se ressaltar que, embora os equipamentos de seqüenciamento sejam cada vez mais rápidos, o grau de complexidade envolvido é enorme. É mencionado, por exemplo, que o genoma do homem e do macaco possui 99% de homologia. Em princípio, isso mostra que evolutivamente eles são muito semelhantes como as teorias já previam. Contudo, considerando que o genoma humano

possui $5,81 \times 10^9$ pares de bases na célula diplóide, um por cento do genoma ainda representa 58,1 milhões de bases. Considerando que muitos alelos novos surgem por alteração em uma ou poucas bases, pode-se inferir que ainda há diferenças gigantescas em vários genes que compõem essas espécies.

Alguns estudos com simulação têm sido desenvolvidos para se verificar o potencial da genômica em auxiliar o melhorista na seleção. Bernardo (2001), utilizando o BLUP (“Best Linear Unbiased Predictors”), mostrou que a informação do genoma apresentou limitado potencial para auxiliar na seleção de caracteres quantitativos. Deve-se considerar, ainda, que a quantidade de informação a ser manuseada é enorme e, mesmo com o desenvolvimento da Bioinformática, essa será a limitação mais séria. Por outro lado, é esperado um maior aprofundamento no conhecimento dos genes, especialmente como eles são regulados. Essas informações deverão contribuir para que os melhoristas possam conduzir os seus trabalhos com maior conhecimento científico do que atualmente o fazem.

Considerações Finais

A experiência do passado não deixa dúvida de que a Biometria e o Melhoramento Genético das Plantas tiveram importante papel em reduzir a fome no mundo. Não apenas isso, elas contribuíram também para aumento da produção de madeira, fibras e muitos outros produtos essenciais à vida do homem, sobretudo durante o século XX. Não há nenhuma evidência de que a importância dessa ciência seja reduzida no futuro.

Normalmente, comenta-se que o trabalho de melhoramento genético é demorado, levando em torno de 10 a 15 anos em média para obter-se uma nova linhagem. Esse tempo é relativo, pois,

se um programa de melhoramento já está implantado, a cada ano, é possível recomendar uma nova cultivar. Essa constatação é válida para solucionar os problemas rotineiros nos programas de melhoramento. Se ocorrer um problema novo, é evidente que demandará mais tempo. Nesse último caso, a observação é válida mesmo quando se utilizaram técnicas biotecnológicas. Os transgênicos, por exemplo, apresentam o mesmo problema de uma cultivar obtida por métodos convencionais, pois há necessidade de comprovação de que ele é bom, somente possível após intensiva avaliação.

Um outro aspecto refere-se ao custo de obtenção de uma nova cultivar. Ferreira (2003), utilizando a cultura de arroz como referência, escreveu que: “o desenvolvimento de uma nova variedade comercial leva de seis a oito anos, com custo médio de milhares ou, tipicamente, milhões de reais”. A questão do tempo já foi comentada, no entanto, se a obtenção de uma nova cultivar custasse milhões de reais, é provável que, somente para espécies como soja e café, haveria condições de se obterem novas cultivares. O recurso disponível, especialmente para culturas de subsistência, como arroz e feijão, tem sido bem inferior a esses relatados e, mesmo assim, novas cultivares freqüentemente chegam ao mercado. Deve ser enfatizado que o custo de qualquer programa de melhoramento, comparado com o da maioria das técnicas biotecnológicas, é bem inferior. Infelizmente, não há disponibilidade de informações de quanto foi investido pelos órgãos de fomento no Brasil, nos últimos vinte anos, em técnicas biotecnológicas e no melhoramento convencional. Mas, certamente, os programas de melhoramento receberam quantia ínfima em relação à biotecnologia. Esse, aliás, é o principal problema enfrentado pelos melhoristas no Brasil. Os recursos, sobretudo aqueles relativos a programas

especiais, nunca são destinados ao melhoramento convencional. Deve-se considerar que é no agronegócio que a economia do país tem-se sustentado e a obtenção de novas cultivares pelo melhoramento convencional é uma das principais razões desse sucesso. Paterniani (2002), comentando sobre as técnicas de manipulação genética, escreveu que “ainda é oportuno e desejável a condução de programas de melhoramento do milho empregando as técnicas convencionais já consagradas como eficientes e ainda não suficientemente exploradas”.

O treinamento de profissionais com ênfase ao melhoramento genético têm-se reduzido acentuadamente nos últimos anos. Nos cursos de Genética e Melhoramento de Plantas, por exemplo, o número de matrículas na disciplina de Genética Molecular, é pelo menos, três vezes superior ao da Genética Quantitativa. Walsh (2001), comentando sobre as perspectivas da genética quantitativa na era da Genômica, enfatiza que é indispensável atualmente aos biólogos moleculares o conhecimento profundo do trabalho de Fisher (1918). A recíproca também é verdadeira, é importante que os melhoristas tenham sólidos conhecimentos em biologia molecular, para avaliarem o real potencial e identificarem situações em que as técnicas possam ser úteis.

Os conhecimentos básicos gerados pela Biologia Molecular tornaram as ciências relacionadas ao Melhoramento de Plantas muito mais excitantes. Os recursos computacionais disponíveis possibilitam simulações de situações que jamais os pioneiros da Genética Quantitativa puderam imaginar. A cada dia que passa, novas informações são adicionadas ao conhecimento da atuação dos genes. Isso possibilitará que, num futuro bem próximo, os continuadores do trabalho de Fisher e Mather, tenham muito mais dados para formularem os seus modelos e procurem

alternativas para tornar os programas de melhoramento genético ainda mais eficazes. Os novos conhecimentos também têm servido para mostrar a capacidade criativa e de imaginação de inúmeros cientistas que marcaram suas vidas por importantes contribuições à ciência. Um exemplo é o caso do geneticista russo Nikolai Vavilov, que dedicou sua vida a elucidar o processo de domesticação das espécies cultivadas, estabelecendo o que foi conhecido por lei das séries homólogas da variação. Segundo essa lei, pode-se esperar que características encontradas em uma espécie também sejam encontradas em espécies relacionadas. Vavilov utilizou esse princípio para prever características ainda não descobertas. Todos os estudos com marcadores moleculares e, especialmente da genômica, comprovam a lei das séries homólogas.

Literatura Citada

- ABREU, A. F. B. **Predição do potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais**. 1997. 79 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ALLARD, R. W. History of plant population genetics. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 1-27, 1999.
- BAENZIGER, P. S.; PETERSON, E. J. Genetic variation: its origin and use for breeding self pollinated species. In: STALKER, H. T.; MULTRIPHY, J. P. **Plant Breeding in the 1990's**. Raleigh: North Caroline University, 1991. p. 69-100.
- BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas**. 1997. 230 f. Tese

- (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BERNARDO, R. What if we knew all the genes for a quantitative trait in hybrid crops? **Crop Science**, Madison, v. 41, n.1, p.1-4, 2001.
- BERZONSKY, W. A.; LAFEVER, H. N. Progress in Ohio soft red winter wheat breeding: grain yield and agronomic traits of cultivars released from 1871 to 1987. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1382, 1993.
- CARDWELL, V. B. 50 years of Minnesota corn production - sources of yield increase. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 6, p. 984-990, 1982.
- CARNEIRO, J. E. S. **Alternativas para obtenção e escolha de populações segregantes no feijoeiro**. 2002. 134 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CROW, J. F. Dominance and overdominance. In: CORRS, J. G.; PANDEY, S. (Ed.) **The genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p. 49-58.
- DUARTE, J. M **Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica (QPM)**. 2003. 129 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.; HUBBARD, L. The evolution of apical dominance in maize. **Nature**, London, v. 386, p. 485-488, 1997.
- DUDLEY, J. W. 76 generations of selection for oil and protein percentage in maize. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUANTITATIVE GENETICS, 1976, Ames, Iowa. **Proceedings...** Ames: Iowa State University Press, 1977. p. 459-474.
- DUDLEY, J. W.; LAMBERT, R. J. Ninety generations of selection for oil and protein in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 37, p. 81-87, 1992.
- DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 660-667, 1993.
- DUDLEY, J. W. Quantitative genetics and plant breeding. **Advances in Agronomy**, New York, v. 59, p. 1-23, 1997.
- DUVICK, D. N. Plant Breeding, an evolutionary concept. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 539-548, 1996.
- EVANS, L. T. **Feeding the ten billion**: plants and population growth. Cambridge: University Press, 1998. 247 p.
- FALCONER, D. S., MACKAY, T. E. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. New York: Longman, 1996. 438 p.
- FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: Mcmillian, 1987. 761 p.
- FERREIRA, M. E. Melhoramento genético do arroz: impactos da genômica. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.; SEDIYAMA, T. (Ed.) **Melhoramento genômico**. Viçosa: UFV, 2003. Cap. 4, p. 73-127.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3 ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.
- FISHER, R. A. The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance.

- Transactions of the Royal Society of Edinburg**, Edinburg, v. 52, p. 399-433, 1918.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1295-1301, 1999.
- FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. Marker-Assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1716-1725, 2001.
- GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H.; ALTMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, Washington, v. 298, p. 2345-2349, Dec. 2002.
- HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B.; **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1981. 468 p.
- HOSPITAL, F.; CHARCOSSET, A. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 147, p. 1469-1485, 1997.
- GEPTS, P. A Comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1780-1790, 2002.
- HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, Baltimore, v. 132, p. 1199-1210, 1992.
- JENSEN, N. F. **Plant breeding methodology**. New York: J. Wiley, New York, 1988. 676 p.
- JINKS, J. L.; POONI, H. S. Predicting the properties of recombinant inbred lines derived by single seed descent. **Heredity**, Essex, v. 36, n. 2, p. 253-266, 1976.
- KEARSEY, M. J.; FARQUHAR, A. G. L. QTL analysis in plants; where are we now? **Heredity**, Essex, v. 80, p. 137-142, 1998.
- KEARSEY, M. J.; POONI, H. S. **The genetical analysis of quantitative traits**. Oxford: Chapman and Hall, 1996. 381 p.
- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 143-182, 1999.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Maryland, v. 121, p. 185-199, 1989.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, New York, v. 55, p. 265-343, 1995.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.
- MACHADO, C. F.; SANTOS, J. B.; NUNES, G. H. S.; DUARTE, J. M. Efficiency of genetic distance based on RAPD markers for choosing parents of common bean. **Journal of Genetics & Breeding**, Rome, v. 54, p. 252-258, 2000.
- MACHADO, C. de F. **Procedimentos para a escolha de genitores de feijão**. 1999. 118 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- MACKAY, T. F. C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 35, p. 303-339, 2001.
- MATHER, K. **Biometrical genetics**: the study of continuous variation. London: Methuen, 1949. 162 p.
- McCLEAN, P. Analysis of plant genomes with molecular markers: linkage drag Disponível em: <<http://www.cc.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/analysis/analysis6.htm>>. Acesso em: 20/10/2003.
- MENDONÇA, H. A. de. **Escolha de populações segregantes de feijoeiro utilizando parâmetros genéticos, fenotípicos e marcadores RAPD**. 2001. 100 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINNIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.
- PATERNIANI, E. Breve História da Agricultura até a era da biotecnologia. In: PATERNIANI, E. (Ed.) **Agricultura Brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. cap.1, p.11-30.
- PATERNIANI, E. Uma percepção crítica sobre técnicas de manipulação genética. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 77-84, jan./abr. 2002.
- PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, New York, v. 46, p. 39-89, 1991.
- PRAKASH, C. S. The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 8-15, 2001.
- RASMUSSEN, D. C.; PHILLIPS, R. L. Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 2, p. 303-310, Mar./Apr. 1997.
- SANTOS, P. G. **Escolha de populações segregantes para o programa de seleção de arroz em terras altas**. 2000. 106 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. The description and assessment of distances between inbreds of maize. II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 34, p. 151-156, 1989.
- SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-966.
- SOUZA JR., C. L. de. Genetic variances of molecular markers of F_2 and related populations. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p. 913-926, 1992.
- SOUZA SOBRINHO, F. **Divergência genética de híbridos simples e alternativas para**

- obtenção de híbridos duplos de milho.** 2001. 96 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras
- STUBER, C. W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 9, p. 37- 61, 1992.
- TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATTERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, New York, v. 7, n. 3, p. 257-263, 1989.
- TROYER, A. F.; ROCHERFORD, T. R. Germplasm ownership: related corn inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 42, n.1, p. 3-11, 2002.
- VENCOVKY, R.; RAMALHO, M. A. P. Contribuição do Melhoramento Genético de Plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. (Ed.) **Agricultura Brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. cap. 4, p. 57-89.
- WALSH, B. Quantitative genetics in the age of genomics. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v. 59, p. 75-184, 2001.
- WILCOX, J. R. Sixty years of improvement in publicly developed elite soybean lines. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 1711-1716, 2001.
- WRICKE, G.; WEBER, E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: Walter de Gruyter, 1986. p. 257-279.