

INFORME

v. 30 - n. 253 - nov./dez. 2009 ISSN 0100-3364

AGROPECUARIO



EPAMIG

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Biotecnologia



**GOVERNO
DE MINAS**



Mudas de Videira

- Mudas selecionadas.
- Produzidas pela moderna técnica de enxertia de mesa.
- Isentas de viroses.

Consulte as variedades disponíveis e informe-se sobre cursos em viticultura.

Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho
Av. Santa Cruz, 500 • Caldas • MG

(3 5) 3 7 3 5 1 1 0 1

epamig@epamigcaldas.gov.br



www.epamig.br



Informe Agropecuário

Uma publicação da EPAMIG

v.30 n.253 nov./dez. 2009

Belo Horizonte-MG

Apresentação

Esta edição do Informe Agropecuário tem por tema a Biotecnologia e suas aplicações no setor agropecuário.

Já é consenso que as técnicas, conceitos, processos e produtos gerados pela Biotecnologia Moderna são cada vez mais imprescindíveis para a evolução da pesquisa nas áreas da Biologia, Agronomia e Medicina.

O cultivo comercial de variedades transgênicas é uma realidade no Brasil e a cada dia produtos advindos da Biotecnologia Moderna estarão mais presentes no nosso cotidiano.

Mitos, tabus e receios relativos aos riscos da biotecnologia e suas aplicações só poderão ser redimidos e neutralizados por meio da informação imparcial, fundamentada no conhecimento técnico-científico e transmitida de forma compreensível à sociedade.

Dessa forma, a EPAMIG, com esta edição do Informe Agropecuário, disponibiliza diversos temas do campo da ciência, com foco na Biotecnologia Moderna, tais como biossegurança, detecção de cultivares e produtos transgênicos, aspectos da proteção legal, além de assuntos atuais e de interesse, como bioinformática, marcadores moleculares utilizados no melhoramento genético, sequenciamento de genomas em larga escala, dentre outros.

*Geraldo Magela de Almeida Cançado
Bárbara Dantas Fontes-Soares*

Sumário

Editorial	3
Entrevista	4
Biossegurança e sociedade	
<i>Aluizio Borém e Wellington Silva Gomes</i>	7
Plantas transgênicas	
<i>Geraldo Magela de Almeida Cançado, Ana Cristina Miranda Brasileiro, Ana Paula Ribeiro, Monique Carolina Nunes Fernandes, Gustavo César Sant'Ana, Bárbara Dantas Fontes-Soares, Hermínio Souza Rocha e Gustavo Faria Freitas</i>	14
Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes	
<i>Ellen Noly Barrocas, José da Cruz Machado, Antonia dos Reis Figueira, Ricardo Magela de Souza, Alessandra Keiko Nakasone Ishida, Ana Beatriz Zacaroni e Hermínio Souza Rocha</i>	24
Aspectos legais da proteção de cultivares transgênicas	
<i>Waldênia de Melo Moura, Paulo César de Lima, Ignácio Azpiazú, Josiane dos Santos e Felipe Rodrigues Reigado</i>	33
Deteção de produtos e organismos transgênicos	
<i>Sandra Rodrigues de Camargo</i>	44
Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas	
<i>Lisete Chamma Davide, Vânia Helena Techio, Roselaine Cristina Pereira, Bárbara Dantas Fontes-Soares e Giovana Augusta Torres</i>	53
Cultivo de plantas <i>in vitro</i> e suas aplicações	
<i>Geraldo Magela de Almeida Cançado, Ana Paula Ribeiro, Gustavo de Faria Freitas, Maria Eugênia Lisei de Sá, Hélio Evaldo da Silva, Moacir Pasqual, Aurinete Daienn Borges do Val e Claudinéia Ferreira Nunes</i>	64
Decifrando o genoma em grande escala	
<i>Sylvia Morais de Sousa, Andréa Almeida Carneiro e Newton Portilho Carneiro</i>	76
Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético	
<i>Claudia Teixeira Guimarães, Jurandir Vieira de Magalhães, Marcelo Abreu Lanza e Ivan Schuster</i>	86
Importância da bioinformática na biotecnologia e na agropecuária	
<i>Vagner Katsumi Okura</i>	96

ISSN 0100-3364

Informe Agropecuário	Belo Horizonte	v.30	n.253	p. 1-104	nov./dez.	2009
----------------------	----------------	------	-------	----------	-----------	------

© 1977 EPAMIG

ISSN 0100-3364

INPI: 006505007

CONSELHO DE DIFUSÃO DE TECNOLOGIA E PUBLICAÇÕES

Baldonado Arthur Napoleão

Enilson Abrahão

Maria Lélia Rodriguez Simão

Juliana Carvalho Simões

Mairon Martins Mesquita

Vânia Lacerda

COMITÊ EDITORIAL DA REVISTA INFORME AGROPECUÁRIO

Enilson Abrahão

Diretoria de Operações Técnicas

Mairon Martins Mesquita

Departamento de Transferência e Difusão de Tecnologia

Vânia Lacerda

Departamento de Publicações

Maria Lélia Rodriguez Simão

Departamento de Pesquisa

PRODUÇÃO

DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES

EDITOR

Vânia Lacerda

COORDENAÇÃO TÉCNICA

Geraldo Magela de Almeida Cançado e Bárbara Dantas Fontes-Soares

REVISÃO LINGUÍSTICA E GRÁFICA

Marlene A. Ribeiro Gomide, Rosely A. R. Battista Pereira e

Michele Pereira dos Santos (estagiária)

NORMALIZAÇÃO

Fátima Rocha Gomes e Maria Lúcia de Melo Silveira

PRODUÇÃO E ARTE

Diagramação/formatação: *Maria Alice Vieira, Erasmo dos Reis Pereira, Ângela Batista P. Carvalho, Letícia Martinez e Fabriciano Chaves Amaral*

Coordenação de Produção Gráfica

Fabriciano Chaves Amaral

Capa: *Letícia Martinez*

Foto da capa: *Tom Ellenberger, Washington University School of Medicine in Saint Louis, USA*

Impressão



IMPRESSA OFICIAL
Governo do Estado de Minas Gerais

PUBLICIDADE

Décio Corrêa

Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - Cidade Nova

CEP 31170-000 Belo Horizonte-MG

Telefone: (31) 3489-5088 - deciocorrea@epamig.br

Informe Agropecuário é uma publicação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG

É proibida a reprodução total ou parcial, por quaisquer meios, sem autorização escrita do editor. Todos os direitos são reservados à EPAMIG.

Os artigos assinados por pesquisadores não pertencentes ao quadro da EPAMIG são de inteira responsabilidade de seus autores.

Os nomes comerciais apresentados nesta revista são citados apenas para conveniência do leitor, não havendo preferências, por parte da EPAMIG, por este ou aquele produto comercial. A citação de termos técnicos seguiu a nomenclatura proposta pelos autores de cada artigo.

O prazo para divulgação de errata expira seis meses após a data de publicação da edição.

Assinatura anual: **6 exemplares**

Aquisição de exemplares

Departamento de Transferência e Difusão de Tecnologia

Divisão de Transferência Tecnológica

Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - Cidade Nova

CEP 31170-000 Belo Horizonte - MG

Telefax: (31) 3489-5002

E-mail: publicacao@epamig.br - Site: www.epamig.br

CNPJ (MF) 17.138.140/0001-23 - Insc. Est.: 062.150146.0047

Informe Agropecuário. - v.3, n.25 - (jan. 1977) - . - Belo Horizonte: EPAMIG, 1977 -
v.: il.

Cont. de Informe Agropecuário: conjuntura e estatística. - v.1, n.1 - (abr.1975).

ISSN 0100-3364

1. Agropecuária - Periódico. 2. Agropecuária - Aspecto Econômico. I. EPAMIG.

CDD 630.5

O Informe Agropecuário é indexado na
AGROBASE, CAB INTERNATIONAL e AGRIS

Governo do Estado de Minas Gerais
Secretaria de Estado de Agricultura,
Pecuária e Abastecimento
Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária
EPAMIG, UFLA, UFMG, UFV



Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

Conselho de Administração

Gilman Viana Rodrigues
Baldonado Arthur Napoleão
Pedro Antônio Arraes Pereira
Adauto Ferreira Barcelos
Osmar Aleixo Rodrigues Filho
Décio Bruxel
Sandra Gesteira Coelho
Elifas Nunes de Alcântara
Vicente José Gamarano
Joãoito Campos Júnior
Helton Mattana Saturnino

Conselho Fiscal

Carmo Robilota Zeitune
Heli de Oliveira Penido
José Clementino Santos
Evandro de Oliveira Neiva
Márcia Dias da Cruz
Celso Costa Moreira

Presidência

Baldonado Arthur Napoleão

Diretoria de Operações Técnicas

Enilson Abraão

Diretoria de Administração e Finanças

Luiz Carlos Gomes Guerra

Gabinete da Presidência

Thaissa Goulart Bhering Viana

Assessoria de Comunicação

Roseney Maria de Oliveira

Assessoria de Desenvolvimento Organizacional

Felipe Bruschi Giorni

Assessoria de Informática

Silmar Vasconcelos

Assessoria Jurídica

Nuno Miguel Branco de Sá Viana Rebelo

Assessoria de Negócios Tecnológicos

Jairo Pereira da Silva Júnior

Assessoria de Planejamento e Coordenação

Renato Damasceno Netto

Assessoria de Relações Institucionais

Marcílio Valadares

Assessoria de Unidades do Interior

José Maurício Fernandes Gonçalves Leite

Auditoria Interna

Carlos Roberto Ditadi

Departamento de Compras e Almoarifado

Sebastião Alves do Nascimento Neto

Departamento de Contabilidade e Finanças

Celina Maria dos Santos

Departamento de Engenharia

Luiz Fernando Drummond Alves

Departamento de Estudos Econômicos e Prospecção

Juliana Carvalho Simões

Departamento de Patrimônio e Serviços Gerais

Mary Aparecida Dias

Departamento de Pesquisa

Maria Lélia Rodriguez Simão

Departamento de Publicações

Vânia Lúcia Alves Lacerda

Departamento de Recursos Humanos

Flávio Luiz Magela Peixoto

Departamento de Transferência e Difusão de Tecnologia

Mairon Martins Mesquita

Departamento de Transportes

José Antônio de Oliveira

Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Fernando A. R. Magalhães, Gérson Occhi e Nelson Luiz T. de Macedo

Instituto Técnico de Agropecuária e Cooperativismo

Luci Maria Lopes Lobato e Francisco Olavo Coutinho da Costa

U.R. EPAMIG Sul de Minas

Gladyston Rodrigues Carvalho e Rodrigo Fráguas de Carvalho

U.R. EPAMIG Norte de Minas

Polyanna Mara de Oliveira e Josimar dos Santos Araújo

U.R. EPAMIG Zona da Mata

Trazilbo José de Paula Júnior e João Bosco Caldas Campos

U.R. EPAMIG Centro-Oeste

Édio Luiz da Costa e Waldênia Almeida Lapa Diniz

U.R. EPAMIG Triângulo e Alto Paranaíba

Marcelo Abreu Lanza e Marina Lombardi Saraiva

A biotecnologia e o futuro da agricultura brasileira

A biotecnologia é uma ciência cada vez mais presente na vida das pessoas e, por isso, passa a ser estratégica para a sobrevivência humana e para o desenvolvimento das nações. A necessidade crescente de aumento da produção de alimentos, para atender ao crescimento populacional em todo o mundo, coloca a biotecnologia em destaque, como ferramenta essencial para o aumento da produtividade, melhoria da qualidade nutricional, segurança alimentar, redução de custos de produção e combate aos efeitos da degradação ambiental.

Os principais benefícios na área agrônômica estão relacionados com o desenvolvimento de novas variedades de plantas, novas raças de animais, e microrganismos criados por meio da biotecnologia, que hoje está bastante apoiada no conhecimento gerado pela biologia molecular. Assim, além do melhoramento clássico, que usa marcadores genéticos, a biotecnologia conta também com o melhoramento assistido por marcadores moleculares e com o melhoramento genético a partir de transgenia.

Ainda polêmica, a questão da transgenia foi a que mais marcou a opinião pública brasileira, entre as várias áreas de atuação da biotecnologia, no final do século 20. Atualmente, com a divulgação de outras formas inovadoras de utilização dessa ferramenta, especialmente com relação à saúde humana, temores estão-se dissipando e permitindo que o País integre o rol daqueles que cultivam transgênicos. O Brasil ocupa o terceiro lugar entre os países com maior área cultivada com transgênicos no mundo, ou seja, 15,8 milhões/ha. A Argentina é o segundo colocado, com 21 milhões/ha e os Estados Unidos lideram o ranking com 62,5 milhões/ha.

O Brasil, reconhecido como o celeiro do mundo, não se pode abster dessa tecnologia e deve estar na vanguarda, acompanhando os avanços tecnológicos com o apoio da pesquisa, de informações confiáveis e com transparência, na defesa e proteção dos interesses comuns do País e de sua população.

Esta edição do Informe Agropecuário tem o objetivo de divulgar tecnologias e discutir ações para a melhor utilização da biotecnologia em benefício da sociedade.

Baldonado Arthur Napoleão
Presidente da EPAMIG

Incentivo à pesquisa biotecnológica

Alberto Duque Portugal é formado em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e Doutor em Sistemas Agrícolas, pela University of Reading, Inglaterra. Em 1995, assumiu a presidência da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), que, durante a gestão de oito anos, alcançou o reconhecimento como uma das maiores referências em agricultura tropical no mundo. Entre outros cargos, Portugal foi ministro interino da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; diretor da Agência de Inovação da Unicamp (Inova); secretário-adjunto de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais e diretor-executivo do Conselho Nacional do Café (CNC).

Atualmente, Alberto Portugal está à frente da Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, com o desafio de fazer a inovação acontecer. Em diversas áreas, os avanços já são muito significativos. Entre elas está a biotecnologia, que estimulada pelo Governo de Minas e parceiros, ocupa lugar de destaque no cenário nacional. Nesta entrevista, Portugal ressalta a importância da biotecnologia e esclarece a questão dos transgênicos.

IA - Qual o papel da biotecnologia neste século e sua responsabilidade em relação à biopirataria e à destruição de ambientes naturais? Como a biotecnologia pode auxiliar na proteção e conservação do patrimônio genético brasileiro?

Alberto Portugal - Embora seja um termo aparentemente novo, a biopirataria existe desde a época do descobrimento do Brasil, quando já se praticava a apropriação de conhecimento e do patrimônio genético de nossa biodiversidade com vistas ao uso unilateral. Infelizmente, nossa biodiversidade é muito mais conhecida na comunidade científica internacional do que nos centros de pesquisas brasileiros. Isso se deve ao fato de que a comunidade científica internacional investe grande montante de recursos em estudos, para desvendar o potencial genético dessa biodiversidade, a exemplo do Cerrado, da Floresta Amazônica, da Mata Atlântica, do Pantanal, etc. A biopirataria ganhou destaque com o advento da biologia molecular, a qual é utilizada para o sequenciamento do DNA que codifica animais e plantas. Existe uma linha tênue entre a biopirataria, representada pelo roubo indiscriminado de material biológico, e as atividades próprias da ciência, direcionadas à produção de informações sobre a fauna e a flora de uma determinada região e de como os organismos interagem e respondem aos estímulos do ambiente em que vivem. É nesse contexto que se encaixa a biotecnologia, por meio do conhecimento da engenharia genética e da leitura científica completa do código genético. Diante do grande potencial da biodiversidade

brasileira, fazem-se necessárias: a proteção do conhecimento, a formulação de políticas públicas relacionadas à gestão desse patrimônio, a proteção da biodiversidade com os patenteados pertinentes, a obrigatoriedade da informação sobre a origem dos recursos genéticos eventualmente utilizados e a comprovação da obtenção de consentimento prévio para a utilização de tais recursos.

IA - Inicialmente, a sociedade brasileira posicionou-se contra os produtos transgênicos. Atualmente, percebe-se uma maior aceitação em algumas culturas. Essa precaução inicial prejudicou o Brasil no agronegócio mundial?

Alberto Portugal - Não tenho dúvida que sim. O Brasil tornou-se uma potência na produção de alimentos e no mundo do agronegócio, muito recentemente. E foi em um momento de profundas mudanças no contexto mundial, tanto no sentido da globalização, como na formação dos blocos econômicos com maior incidência de barreiras não tarifárias e mudanças tecnológicas, a biotecnologia talvez tenha sido aquela de maior impacto. O fato de você não ter no Brasil um ambiente de segurança, estimulante para investimentos, tanto pelas empresas privadas, quanto pelas estatais, como Embrapa e EPAMIG e universidades, criou certo desestímulo ou redução dos investimentos, o que provocou atraso e diminuição da capacidade competitiva do Brasil no mercado mundial.

IA - Até que ponto os interesses econômicos de outras nações prejudicaram o



Lucia Sebe - Secom - MG

esclarecimento da população sobre os mitos e verdades envolvidos com os alimentos transgênicos?

Alberto Portugal - Estou convencido de que isso é um fato, uma vez que a biotecnologia e a nanotecnologia estão nas chamadas áreas ou ciências portadoras de futuro. Quem domina tecnologias como transgenia tem o poder de desenhar o produto que o mercado quer mais rapidamente, portanto, aumentando a competitividade do segmento. Algumas empresas, principalmente na Europa, não caminharam na mesma velocidade que as empresas americanas e isso fez com que houvesse um grande movimento apoiado por organizações que tinham preocupações com a utilização de alimentos geneticamente modificados. Isso resultou numa grande discussão, que já não se “travava” mais no campo científico e tecnológico, mas transformou-se numa guerra de comunicação. O Brasil já vinha sendo percebido pelos EUA e por outros grandes produtores de alimentos, como um País competitivo, com capacidade de dominar essas tecnologias e aumentar mais a sua competitividade. O País seria praticamente imbatível, como a realidade está mostrando na área de produção de alimentos e de energia. Entendemos, entretanto, que é exatamente o avanço da ciência de um lado e as necessidades da humanidade do outro, que vão abrindo perspectivas de reduzir esse tipo de pressão.

IA - Em sua opinião, as atuais ferramentas biotecnológicas poderão ser um diferencial positivo na corrida por novas

fontes de energia renováveis e de baixo impacto ambiental?

Alberto Portugal - Certamente. A biotecnologia de aplicação industrial trabalha com o desenvolvimento de enzimas e microrganismos voltados a diversas finalidades dentro da cadeia produtiva. Entre estes potenciais, podemos destacar a utilização na obtenção do etanol de segunda geração, a utilização de enzimas para obtenção de biopolímeros, inclusive na própria biomassa da cana-de-açúcar. A possibilidade de obtenção de biocombustível por rota enzimática, incluindo a substituição do metanol pelo etanol no caso de biodiesel é uma alternativa.

IA - *Qual a sua avaliação sobre a importância da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)?*

Alberto Portugal - A CTNBio tem um papel crucial. Deve pautar o seu trabalho, fundamentalmente, no estoque de conhecimento e de tecnologia que a humanidade dispõe, não só o Brasil, porque as análises por parte da CTNBio devem-se ater ao conhecimento científico. É avaliar se um determinado produto que está sendo submetido à sua análise pode causar mal ao homem e ao meio ambiente ou se dentro do conhecimento disponível, as probabilidades de não causar prejuízos são significativas. Os cientistas e a CTNBio têm o papel ético de esclarecer a sociedade, de não propositalmente misturar questões de caráter científico, com as de caráter cultural, religioso ou ideológico. A sociedade, por questões culturais, religiosas, ideológicas ou de mercado, pode tomar a decisão de não querer usar alimento transgênico. Nossa posição é de que a questão científica e tecnológica precisa ser debatida na CTNBio.

IA - *Alimentos funcionais e segurança alimentar são assuntos que têm recebido bastante atenção de toda a sociedade. A geração de produtos transgênicos diretamente associados a essas áreas pode ser uma forma de resgatar a credibilidade da engenharia genética junto ao cidadão?*

Alberto Portugal - Não tenho dúvida de que a transgenia na agricultura começou por uma necessidade que os produtores tinham de reduzir custos e impactos ambientais, por mais que esse segundo aspecto seja contestado. Contudo, se você reduz o número de aplicações de herbicida para o controle de pragas na soja ou no milho, está provado que reduz o custo do produtor, o que vai bene-

ficiar o consumidor com um alimento mais barato. Mas, muitas vezes, o consumidor leigo não tem essa percepção clara. A utilização de nutracêuticos, alimentos com melhor qualidade nutricional, é uma forma de você deixar o consumidor entender as vantagens do uso da transgenia no desenvolvimento de novos alimentos. O consumidor já utiliza, por exemplo, vacinas como a hepatite B e não há nenhuma resistência nisso. Quando o consumidor não percebe que tem transgenia, ele acredita que pode utilizar esse alimento sem que tenha maiores consequências. O fato é que a humanidade não tem como prescindir dessa tecnologia (transgenia) para seu futuro. Portanto, a tendência é que o consumidor esteja entendendo cada vez mais sobre o assunto e confiando na comunidade científica, responsável pela avaliação, que se baseia no conhecimento disponível, daquilo que é bom ou ruim ou daquilo que tem probabilidade de causar mal ao homem ou ao meio ambiente.

IA - *Quais linhas de pesquisas em biotecnologia o senhor considera estratégicas, para que o Brasil assegure sua posição de destaque na produção mundial de alimentos?*

Alberto Portugal - Não apenas na área de alimentos, mas também nas diversas cadeias produtivas sob influência da biotecnologia. Alguns exemplos são: DNA recombinante para o desenvolvimento de vacinas, como a Meningite C, hoje em desenvolvimento na Funed em parceria com a Novartis; enzimas para a produção de biocombustível como o etanol de segunda geração, microrganismos e enzimas para a produção de biopolímeros, por meio da utilização de biomassa; produção de medicamentos para gado; técnicas para germinação de sementes oleaginosas; utilização da biodiversidade para fabricação de medicamentos e outros produtos biotecnológicos. Com relação especificamente a alimentos, é preciso destacar que o País tem um papel importante na produção mundial, especialmente no que se refere aos grãos. Por outro lado, a plantação de culturas transgênicas é muito mais ampla em outras localidades, como EUA e Ásia. Em muitos aspectos, essas culturas tendem a gerar maior competitividade e produtividade para os países. O Brasil, para se manter no mercado ou mesmo conseguir novos, de forma eficiente e produtiva, precisa avaliar os benefícios da implantação de culturas ou mesmo de novos melhoramentos genéticos, que podem incluir a transgenia. Nesse ínterim, incentivar a pesquisa nessa área é de suma importância para

a produção de alimentos no País, tanto para atendimento ao mercado interno, quanto ao externo. No caso da soja, o Brasil é o segundo produtor mundial, embora o consumo do grão e de seus derivados ainda se mantenha baixo internamente. Grande parte da produção é voltada à exportação ou fabricação de óleo. Estudos comprovam que a soja é um alimento altamente rico em proteínas, com índices que chegam ao dobro do feijão. Mas, em nosso País, fatores como o sabor exótico, desconhecimento da versatilidade do grão na culinária e o alto preço (no caso dos derivados) são apontados como causas desse insucesso. Por isso, as empresas investem na redução de custos de produção e em processos para mascarar o sabor do grão. O desenvolvimento de pesquisas nessa linha cria diversas oportunidades de mercado em âmbito mundial, como é o caso das cultivares desenvolvidas, conjuntamente, pela Embrapa, EPAMIG e Fundação Triângulo, soja de tegumento amarelo e tegumento marrom. Tais variedades trabalham o sabor desse alimento, tornando-o mais palatável.

IA - *Na última década, observou-se uma grande corrida para o sequenciamento completo do código genético de várias espécies, inclusive do homem. Mesmo com os resultados obtidos, os impactos no cotidiano ainda não foram observados na intensidade em que foram apreçados. Como o senhor analisa esta questão?*

Alberto Portugal - Vivemos, atualmente, a explosão da era genômica. Genomas de mais de 1.100 espécies (www.genomesonline.org), na sua grande maioria microrganismos (957), já foram sequenciados e existem registrados mais de 6.200 projetos (provavelmente o número é bem superior). A informação genômica é a informação básica sobre qualquer espécie. Porém, traduzir esse conhecimento primário em compreensão da biologia do organismo ou em produtos que chegam ao consumidor é um caminho mais longo. Somente agora, algumas pesquisas trazem o conhecimento sobre o genoma humano na forma, por exemplo, de identificação de genes envolvidos em doenças e que, em grande parte, ainda não são utilizados na clínica. O mesmo se aplica a genomas de interesse da indústria agropecuária e de biotecnologia. Uma das explicações deve-se ao fato de que ainda não temos ferramentas para compreender o genoma em toda a sua complexidade. Cerca da metade dos genes descritos em eucariotos, por exemplo, não

têm função conhecida. O entendimento de sistemas biológicos está somente agora sendo passível de estudos. Dessa forma, é natural que exista um período maior do que se esperava, antes de se conhecerem os genomas de organismos-modelo, para que este conhecimento se transforme em produtos. Porém, o Brasil tem uma gigantesca fauna e flora, que se traduz em patrimônio genético ainda completamente inexplorado. É um grande produtor no agronegócio e pretende implantar uma forte indústria de base biotecnológica. Isso sem mencionar a diversidade genética da população brasileira ainda pouquíssimo explorada. O componente genético das doenças humanas nessa população é diferente de outras populações já estudadas e logo a genômica médica virá para tratar de forma individualizada essas pessoas. Assim, o País não pode ficar sem fazer a exploração dos genomas de interesse. É preciso saber gerar a informação, tratá-la e explorá-la com o uso intenso de ferramentas de bioinformática e buscar as respostas para a caracterização de espécies em extinção, marcadores para melhoramento de plantas e gado, produtos biotecnológicos de microrganismos, exploração da genômica médica, entre tantos outros. Do contrário, vamos ter que comprar a tecnologia estrangeira. Dessa forma, para o crescimento do agronegócio, da biotecnologia e da indústria da saúde é preciso que a genômica tenha um papel destacado na pesquisa científica brasileira.

IA - Quais são as estratégias do Governo de Minas para o setor de biotecnologia e principais resultados das pesquisas desenvolvidas no Estado com foco na geração de produtos inovadores e tecnologias aplicadas ao setor produtivo?

Alberto Portugal - O Governo de Minas, dentro do Plano Mineiro de Desenvolvimento Integrado (PMDI), tem por missão tornar Minas Gerais o melhor Estado para se viver e um Estado líder na economia do conhecimento. Para atingir esses objetivos, entre as áreas de resultados está "Inovação, Tecnologia e Qualidade". E coube à Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior de Minas Gerais (Sectes), a tarefa de executar as ações relacionadas a essa área de resultado.

Três projetos estruturadores, Rede de Formação Profissional Orientada Pelo Mercado, Rede de Inovação Tecnológica (RIT) e Arranjos Produtivos Locais (APL), coordenados pela Sectes, trabalham com universidades e empresas na ampliação do

acesso a tecnologias de informação, na disseminação do uso de tecnologias e da inovação e na interação universidade-empresa.

Minas Gerais foi o primeiro a criar sua Lei de Inovação, regulada pelo Decreto Estadual nº 44.874/2008. O decreto criou o Fundo de Incentivo à Inovação Tecnológica (FIIT), que financia projetos de inovação dentro das empresas, desenvolvidos em parceria com universidades ou centros de pesquisas.

O projeto estruturador, Arranjos Produtivos Locais, trabalha com três grandes programas: Pólo de Excelência, Pólo de Inovação e Arranjos Produtivos Locais. Os APLs apoiam segmentos portadores de futuro. O projeto abrange *Software*, *Eletrônico*, *Bioenergia* e *Biotecnologia*. O objetivo é promover e articular ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação em cada uma das áreas, gerando parcerias entre os setores acadêmico e empresarial, promovendo a qualificação das cadeias produtivas e ampliando a capacidade competitiva do APL de forma autossustentável.

Minas Gerais é a segunda unidade da federação em número de empresas do setor de biotecnologia, com 30% dos empreendimentos nacionais. As empresas de biotecnologia no território mineiro estão concentradas em três pólos: Região Metropolitana de Belo Horizonte, Viçosa e Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba. A interação dos polos possibilitou inúmeras iniciativas, entre estas a criação do Minas Biotec, que representa 70% da bioindústria mineira.

Além disso, existem em todo o Estado, 11 instituições federais de ensino superior e mais os Institutos Federais de Educação Tecnológica (Ifets), que formam a maior concentração do Brasil. Somam-se a esta rede, as instituições de ensino técnico e de ensino superior estaduais. Algumas dessas instituições exercem papel de liderança na pesquisa científica em várias áreas do conhecimento, sendo uma delas a área de biotecnologia. Em março de 2008, existiam 56 grupos de pesquisas ligados à biotecnologia cadastrados em Minas Gerais. Entre os cursos de pós-graduação ligados à biotecnologia estão: biologia celular e estrutural, ciências biológicas, bioquímica e imunologia, imunologia e parasitologia aplicadas, bioinformática, genética, genética e bioquímica e ciências farmacêuticas. O Projeto Estruturador APL de Biotecnologia conta com o apoio de parceiros estratégicos para a sua realização, que são: Sebrae, IEL/Fiemg, Sindusfarq, Fundação Triângulo, Centev, Funed e o Centro de

Pesquisas René Rachou/Fiocruz. E busca trabalhar alinhado às políticas federais. Nos anos de 2008 e 2009 os investimentos em biotecnologia chegaram a 9,6 milhões de reais. Esses montantes foram divididos em diversas ações, entre elas:

- Bureau de Inovação: disponibilizar de forma autossustentável serviços especializados a empresas, visando sua competitividade, especialmente os de Inteligência Competitiva, Propriedade Intelectual, Interação universidade empresa.

- Gestão da Competitividade: foco na área da saúde - Fármacos, Diagnósticos, Serviços Médicos e Tecnologia Médica;

- Centro de Excelência em Bioinformática: implantação e desenvolvimento de parcerias em bioinformática com redes de pesquisadores nacionais e internacionais;

- Certificação de produtos e processos: fornecer consultorias para adequação a critérios técnicos e regulatórios necessários à certificação e/ou à homologação de produtos e processos;

- Comunicação e *Marketing*: projetar e consolidar a imagem do Minas Biotec intra e inter APLs, nacional e internacionalmente;

- Edital de Biotecnologia: aumentar o número de produtos biotecnológicos disponíveis no mercado e complementar a cadeia produtiva de biotecnológicos;

- Biopolo Minas: criação de ambiente propício para o surgimento de novas empresas biotecnológicas, bem como fortalecimento das existentes, via aproveitamento de nicho de mercado das doenças infecto-contagiosas, negligenciadas.

No que se refere ao desenvolvimento de tecnologias em Minas Gerais, destaca-se o trabalho feito pelas nossas universidades e centros de pesquisas, com expressiva participação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NITs) e da Rede Mineira de Propriedade Intelectual (RMPI). Bem como, o caráter inovador da bioindústria mineira, ganhadora de prêmios nacionais e internacionais como são os casos:

- Biocod Biotecnologia: Prêmio José Costa 2009 - Categoria Tecnologia;

- Ecovec : Prêmio Tech Museum Awards 2006 - Produto Mosquitrap;

- Katal Biotecnológica: 1º Lugar do Prêmio Finep 2004 - Inovação de Produto;

- Excegen: 3º lugar do Prêmio FINEP 2004 - Inovação de Processo;

- Visiontech: Prêmio Dell de excelência em tecnologia 2005 - categoria mobilidade;

- Biogenetics: quatro prêmios, sendo dois nacionais e dois internacionais por inovação tecnológica.

■ Por Vânia Lacerda
Colaboração: Reginaldo Cangussu

Biossegurança e sociedade

Aluizio Borém¹

Wellington Silva Gomes²

Resumo - Biossegurança é o conjunto de estudos e de procedimentos que visam evitar ou controlar os riscos provocados pelo uso de agentes químicos, físicos e biológicos à biodiversidade. Estuda os impactos decorrentes da biotecnologia à saúde humana e animal e ao meio ambiente, sendo regulada, em vários países, por leis, procedimentos ou diretivas específicas. A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é uma instância colegiada multidisciplinar, criada pela lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 (BRASIL, 2005), cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao governo federal brasileiro na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança, relativa a organismo geneticamente modificado (OGM), bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados. A legislação de biossegurança, no Brasil, engloba apenas a tecnologia de engenharia genética, que é a tecnologia do DNA recombinante, estabelecendo os requisitos para o manejo de OGMs.

Palavras-chave: Biotecnologia. Organismo geneticamente modificado. OGM. Segurança alimentar. Transgênico. Saúde. CTNBio. Risco.

INTRODUÇÃO

A biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem e dos animais, à preservação do meio ambiente e à qualidade dos resultados. Esse foco de atenção retorna ao ambiente ocupacional e amplia-se para a proteção ambiental e para a qualidade.

Nas últimas três décadas, as questões ambientais passaram a integrar, de forma proeminente, fóruns científicos internacionais, decorrentes, dentre outras razões, do aumento da poluição atmosférica e hídrica em razão, principalmente, de gases e resí-

duos derivados da indústria e dos transportes, que geram o aquecimento global. Além disso, outras questões de caráter social passaram a preocupar cada vez mais a comunidade internacional. Estimativas do Banco Mundial mostram que cerca de 20% da população do mundo não tem acesso à água potável. Preservação ecológica nunca esteve com tanta evidência como agora.

Nesse cenário surgiu a engenharia genética, no início da década de 70, na Califórnia, EUA, com a transferência e expressão do gene da insulina em *Escherichia coli*. Essa experiência, em 1973, provocou forte reação da comunidade científica mundial, que culminou com a Conferência de Asilomar, em 1974, quando a comunidade científica praticamente propôs uma

moratória no uso da engenharia genética até que mecanismos fossem estabelecidos para garantir que essas técnicas poderiam ser utilizadas sem riscos para o homem e para o meio ambiente. Em um prazo relativamente curto, desenvolveram-se regras de biossegurança para uso dessas tecnologias em laboratório, e não se tem notícia de nenhum efeito adverso do uso da engenharia genética para a saúde humana e animal ou para o meio ambiente, nesses mais de 35 anos de pesquisas com a biotecnologia.

Vários produtos derivados da tecnologia do DNA recombinante são atualmente comercializados no mundo. Na América do Sul, os seguintes produtos transgênicos já se encontram no mercado: insulina humana, somatropina, variedades transgênicas de milho, soja, algodão etc.

¹Eng^o Agr^o, Ph.D., Prof. UFV, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: borem@ufv.br

²Biólogo, M.Sc., UFV, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: wellington.gomes@ufv.br

Embora a insulina produzida por bactérias transgênicas já seja comercializada no Brasil há algum tempo, o lançamento das variedades de plantas transgênicas no mercado mundial despertou uma nova ótica na avaliação dos riscos dos organismos geneticamente modificados para a saúde humana e animal e para o meio ambiente.

Testes de campo com variedades transgênicas têm sido conduzidos na Argentina, na Bolívia e no Chile desde 1991. Porém, no Brasil, esses testes só foram iniciados em 1997.

BIOSSEGURANÇA NA AGROPECUÁRIA

Noventa por cento da produção mundial de alimentos é obtida na América do Norte, Europa e Ásia. Atualmente, a América Latina tem dado uma contribuição comparativamente modesta ao mercado mundial. Certamente, haverá dificuldades para atender à demanda de alimentos dos países em desenvolvimento no futuro. Portanto, o papel da América Latina é muito importante nesse contexto, bem como o do Brasil, em particular.

Em 1979, o Brasil produzia cerca de 39 milhões de toneladas de grãos. Na safra 2006-2007, essa produção aumentou para 120 milhões. O País triplicou a produção agrícola em 27 anos. Esse aumento ocorreu graças à elevação da produtividade e à expansão da fronteira agrícola.

A biotecnologia tem um papel essencial na produção de alimentos, pois permite aumentar a produtividade, melhorar a qualidade nutricional e reduzir os custos de produção. Um dos primeiros setores que está sendo fortemente afetado pela biotecnologia é o de produtos químicos, que hoje, em direta relação com a agricultura, manipula algo em torno de US\$ 20 bilhões, anualmente. Desse valor, cerca de US\$ 8 bilhões/ano correspondem aos chamados defensivos agrícolas usados para o controle de doenças, pragas e espécies daninhas. Em alguns casos, o custo dos agrotóxicos em relação ao custo total da produção atinge cerca de 40%, como no caso do algodão. A engenharia genética

já desenvolveu variedades resistentes a insetos, fungos, bactérias e vírus, permitindo, assim, diminuir o custo da produção agrícola, além de diminuir os resíduos dos produtos fitossanitários que causam danos ao meio ambiente e à saúde humana.

No entanto, para a liberação de qualquer produto biotecnológico no setor agropecuário, é necessária uma rígida avaliação do produto quanto aos possíveis impactos negativos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. No Brasil, existe a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que é uma instância colegiada multidisciplinar, criada com a finalidade de prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB), relativa a organismos geneticamente modificados (OGMs), bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos conclusivos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGMs e derivados.

A CTNBio é composta por cientistas, representantes de ministérios e da sociedade civil. Diferente do que muitos acreditam, essa comissão não faz experimentos de biossegurança, mas avalia dados encaminhados junto aos processos de pedido de liberação de cada transgênico. Portanto, a CTNBio requer para cada julgamento uma série de estudos que atestem a biossegurança do produto, que, infelizmente, na maioria dos casos, são feitos pelos próprios interessados na liberação e comercialização do transgênico. Ainda falta à comunidade científica brasileira um apoio institucional e financeiro para a execução de estudos paralelos, em universidades ou instituições de pesquisa independentes, sobre os reais impactos de cada transgênico, pelo menos no que diz respeito ao dano ambiental, que pode, em alguns casos, levar décadas para ser notado.

PLANTAS TRANSGÊNICAS

As primeiras plantas transgênicas começaram a ser testadas em campo, no início da década de 80. Até hoje, já foram realizados mais de 25 mil testes de campo no mundo, metade dos quais nos Estados Unidos e no Canadá. Na América Latina, o maior número de liberações ocorreu na Argentina. A comercialização de variedades transgênicas começou na década de 90, com o tomate geneticamente modificado pela Calgene. Atualmente, variedades transgênicas de soja, milho, algodão, canola e mamão, dentre outras, já têm participação relevante na agricultura dos Estados Unidos, do Canadá e da Argentina (Fig. 1). No Brasil, já foram liberadas pela CTNBio, para plantio, consumo e comercialização, variedades transgênicas de soja, milho e algodão. Além dessas, variedades transgênicas de muitas outras espécies, como eucalipto, fumo, tomate, batata, cana-de-açúcar etc., tendem a se popularizar. As espécies citadas têm como características transgênicas resistência a insetos e a doenças, tolerância a herbicidas e melhor qualidade nutricional. Como exemplo, cita-se a canola, cuja composição lipídica foi alterada para diminuir o conteúdo de ácidos graxos indesejáveis, característica especialmente importante para a dieta de pacientes cardíacos.

ANIMAIS TRANSGÊNICOS

As dificuldades adicionais na transformação gênica de animais adiaram sua chegada ao mercado.

O primeiro animal transgênico comercializado foi o *oncomouse*, um camundongo no qual foi introduzido um gene do câncer. Esse animal é utilizado em estudos de drogas para tratamento do câncer. No setor de alimentos, o primeiro animal transgênico colocado no mercado foi o salmão, modificado para produzir maior quantidade de hormônio de crescimento. Esse peixe cresce mais rapidamente que os convencionais e possui uma taxa de conversão alimentar cerca de 15% superior à dos não-transgênicos. Nos Estados Unidos, o salmão foi liberado para comércio,

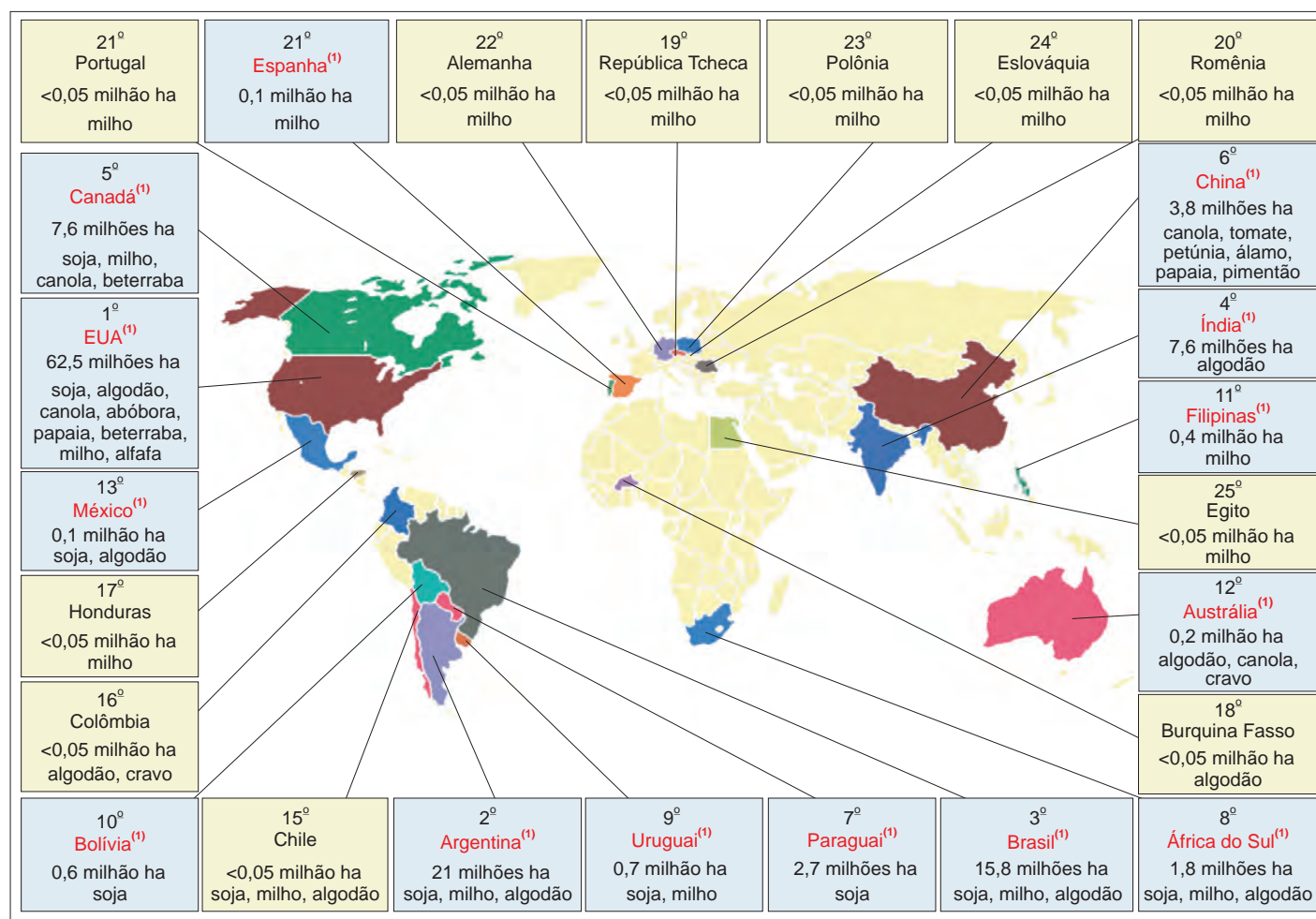


Figura 1 - Países que possuem autorização de plantio de variedades geneticamente modificadas, em 2008

FONTES: Clive James (2008 apud INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRICULTURAL BIOTECH APPLICATIONS).

(1) Crescimento de 50 mil hectares ou mais, na produção de plantas transgênicas nos 14 mega-países.

produção e consumo, em 2001.

Outros animais transgênicos, como bovinos, suínos, ovinos e caprinos, estão em fase final de avaliação e devem ser colocados no mercado nos próximos anos. Essa avaliação técnica da biossegurança dos animais transgênicos é normalmente menos complicada do que a elaboração de pareceres técnicos para liberação de plantas transgênicas. No entanto, animais transgênicos sofrem críticas de outros órgãos, como sociedades protetoras de animais e comissões de ética em experimentação animal.

REGULAMENTAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA

A necessidade de regulamentação dos OGMs tornou-se mais evidente em meados

de 1980, quando as empresas de biotecnologia procuraram obter permissão para suas pesquisas com esses organismos.

Atualmente, a regulamentação das normas de biossegurança no mundo é realizada caso a caso, com base em aspectos técnicos e científicos, com transparência nos processos de tomada de decisão e consistência, construindo a confiança pública.

Agências reguladoras nos EUA

Nos Estados Unidos, as agências que examinam a segurança das variedades geneticamente modificadas são a Environmental and Protection Agency (EPA), a Food and Drug Administration (FDA), o Department of Health and Human Services

(HHS) e o Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), do United States Department of Agriculture (USDA).

O APHIS regula o desenvolvimento e os testes de campo tanto de plantas, quanto de microrganismos geneticamente modificados. É essa a agência que revisa os processos de licença para a realização de testes de campo pelas indústrias, universidades e ONGs. Os processos relacionados com a segurança agrícola e ambiental de organismos pesticidas, como a soja RR, também são revisados pelo APHIS.

A responsabilidade da EPA é garantir a segurança de OGMs praguicidas, substâncias químicas e biológicas para distribuição, comércio e consumo e também de variedades que produzem elementos pesticidas.

A FDA avalia a segurança e os aspectos nutricionais de variedades geneticamente modificadas que são alimentos (inclusive para animais). A diretriz da FDA baseia-se no fato de que todo alimento deve satisfazer os mesmos rigorosos padrões de segurança requeridos para os alimentos convencionais.

Com base na legislação dos EUA, a jurisdição da EPA, é limitada a substâncias pesticidas. Por exemplo, uma planta, que tenha sido modificada geneticamente para resistir a uma praga, enquadra-se na sua jurisdição, enquanto que, uma planta modificada para resistir à seca, não se enquadra. A planta resistente a uma praga está sob a autoridade da EPA, porque a substância que a planta produz é pesticida. No outro caso, a resistência à seca pode ser decorrente de raízes mais profundas etc. Essa planta transgênica estaria sujeita à regulamentação pelo USDA-APHIS.

Para as variedades resistentes às pragas, a EPA tem quatro categorias de análise: caracterização do produto, toxicologia, efeitos em organismos não-alvo e destino no ambiente. A caracterização de produto inclui a revisão da origem do gene e como este é expressado em organismos vivos, a natureza da substância pesticida, as modificações para a característica introduzida – em comparação com aquela encontrada na natureza – e a biologia da planta receptora. Para conhecer a toxicologia, o nível de toxicidade oral aguda da substância pesticida é avaliado em ratos. Para as proteínas tóxicas aos insetos, a EPA requer também um teste de digestibilidade, que avalia o tempo necessário para a proteína ser digerida pelos sucos gástricos e intestinais. A EPA analisa ainda a alergenicidade da proteína. Com relação aos impactos ambientais, essa agência examina a exposição e toxicidade da planta transgênica aos insetos não-alvo e insetos benéficos.

Biossegurança em outros países

A regulamentação da biossegurança é realizada em cada país por meio de agên-

cias locais: no Canadá, pela Health Canada (HC) and Canadian Food Inspection Agency (CFIA); no Japão pelo Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) e Ministry of Health, Labour and Welfare; na Argentina, pela Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABia). No Brasil, tanto a elaboração de normas técnicas de biossegurança, como a revisão técnica dos processos de liberação de transgênicos é de responsabilidade da CTNBio.

BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR

A segurança alimentar de plantas transgênicas é avaliada de acordo com os princípios de uma metodologia denominada análise de riscos. Essa metodologia foi desenvolvida inicialmente com o objetivo de avaliar efeitos deletérios na saúde humana, advindos de potenciais substâncias químicas tóxicas presentes em alimentos, como resíduos de pesticidas, contaminantes e aditivos alimentares, sendo posteriormente aplicada na avaliação da segurança alimentar de plantas geneticamente modificadas (GM).

Um dos fundamentos da metodologia de análise de riscos é que as plantas transgênicas não são intrinsecamente mais perigosas que as convencionais, ou seja, os eventuais riscos alimentares que uma variedade transgênica pode oferecer não são decorrentes do fato de ser transgênica, mas sim das eventuais alterações químicas que podem resultar da modificação genética (KÖNIG et al., 2004). Por exemplo, uma planta de feijão GM, expressando uma proteína alergênica de castanha-do-pará, será alergênica não pelo fato de ser obtida por ferramentas de engenharia genética, mas sim pelo fato de a modificação genética ter incorporado uma proteína alergênica a essa variedade.

É evidente que, de forma geral, uma planta transgênica possui uma proteína que não está presente nas variedades convencionais. Essa proteína é aquela cuja produção foi codificada pelo transgene e introduzida exatamente com o propósito de

conferir a característica que se deseja incorporar. No entanto, além dessa diferença, outras alterações bioquímicas podem ser resultantes da introdução de um transgene, mas tudo isso é investigado durante os estudos de segurança alimentar.

No caso de plantas transgênicas, a análise de riscos é realizada pela comparação dessas com as plantas não-GM equivalentes, consideradas seguras pelo histórico de uso. Por essa metodologia, em vez de se tentar identificar cada perigo associado à variedade GM, procura-se identificar novos perigos que não estejam presentes na variedade tradicional.

Essa diferença pode parecer pequena, mas tem profundas implicações. No caso de tentar analisar se uma planta GM é segura, estudando cada potencial perigo que ela possa apresentar, poderiam ser realizados inúmeros ensaios que não corroborariam a avaliação de riscos atualmente feita. Em vez dessa abordagem, parte-se de um parâmetro que é considerado seguro: identificam-se as diferenças que a planta GM apresenta em relação a não-GM, avaliando se as diferenças representam novos riscos.

A partir dessa análise comparativa, surge o termo equivalência substancial. Com base na comparação do perfil bioquímico da variedade transgênica com o da convencional, a variedade GM pode ser classificada como substancialmente equivalente ou substancialmente não-equivalente.

Nesse ponto, deve-se esclarecer que a avaliação da segurança alimentar de uma planta GM não se restringe à aplicação do conceito de equivalência substancial. Esse se constitui somente no ponto de partida dessa avaliação, que visa à identificação das diferenças que serão posteriormente analisadas. As análises posteriores incluem testes de alergenicidade e de toxicidade realizados *in silico*, *in vitro*, além de estudos com animais (roedores, aves, peixes e outros), para avaliar a toxicidade. Nessas análises, em geral, é determinada a dose letal em 50% dos casos (DL50), como um indicativo da toxicidade aguda, isto é, de curto prazo.

Análises de riscos

As análises de riscos são realizadas em três etapas:

Avaliação de riscos

Pode ser definida como a avaliação da probabilidade de efeitos adversos à saúde advindos da exposição humana ou animal a um perigo. Consiste de quatro etapas:

- identificação do perigo: identificação de agentes biológicos, químicos e físicos capazes de causar efeitos prejudiciais à saúde, os quais podem estar presentes em um alimento;
- caracterização do perigo: objetiva avaliar, em termos qualitativos e quantitativos, um perigo identificado. Frequentemente, envolve o estabelecimento de uma relação dose-resposta em razão da magnitude de exposição (dose) a um agente físico, químico ou biológico e da severidade dos efeitos adversos à saúde;
- avaliação da exposição: avaliação quantitativa e qualitativa da probabilidade de ingestão de agentes físicos, químicos e biológicos por meio da alimentação;
- caracterização do risco: estimativa qualitativa e quantitativa da probabilidade de ocorrência e severidade de um efeito contrário à saúde com base na identificação e caracterização do perigo e na avaliação da exposição.

Gerenciamento de riscos

São medidas tomadas a partir dos resultados da avaliação de riscos e outros fatores legítimos, que visam reduzir os riscos para projetar a saúde dos consumidores. Medidas de gerenciamento podem incluir rotulagem, imposição de condições para aprovação comercial e monitoramento pós-comercial.

Comunicação de riscos

É a troca de informações que deve ser realizada entre todas as partes interessadas, incluindo governo, indústria, comunidade científica, mídia e consumidores. Deve acontecer durante todo o processo de ava-

liação e gerenciamento de riscos e incluir a explicação das decisões para o público, garantindo acesso aos documentos obtidos a partir da avaliação de riscos e, ao mesmo tempo, respeitando o direito de salvaguardar a confidencialidade de informações industriais e comerciais.

As variedades transgênicas são consideradas seguras para o consumo humano por diversas instituições científicas renomadas, como a Organização Mundial de Saúde, o Conselho Internacional para a Ciência, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, a Sociedade Real de Londres e as Academias nacionais de ciências de vários países: Brasil, México, Índia, Estados Unidos, Austrália, Itália, entre outros.

BIOSSEGURANÇA AMBIENTAL

De forma semelhante à avaliação de riscos alimentares, a avaliação de riscos ambientais considera três pontos importantes: possibilidade, probabilidade e consequência de um perigo, o qual deve ser sempre avaliado caso a caso. Isso significa que, a partir da identificação de um possível perigo, deve-se considerar se esse perigo é possível, se é provável e, se viesse a ocorrer, qual seria sua consequência (CONNER; GLARE; NAP, 2003). No caso específico de avaliação de riscos de plantas GM, um quarto ponto também deve ser considerado: os riscos decorrentes da não-adoção dessa tecnologia.

Uma premissa essencial em qualquer avaliação de riscos é o estabelecimento de parâmetros de comparação corretos. Como descrito, na avaliação de segurança alimentar, a planta GM é comparada com plantas não-GM equivalentes. De forma análoga, o impacto ambiental de plantas transgênicas deve ser avaliado em relação àquele impacto causado pela variedade convencional.

Esses princípios são essenciais para orientar sobre quais ensaios devem ser realizados e quais perguntas devem ser respondidas, a fim de gerar informações que

auxiliem na tomada de decisão de utilizar ou não determinada planta transgênica. A não-observância desses princípios pode ter como consequência ensaios desnecessários e que não ajudam na correta avaliação de riscos.

Por exemplo, o cultivo de algodão transgênico resistente a insetos no Brasil suscitou preocupações em relação ao escape gênico, ou seja, a possibilidade de cruzamento da variedade transgênica com duas espécies silvestres do gênero *Gossypium*, que são sexualmente compatíveis com o algodão cultivado (FREIRE et al., 2006). Os questionamentos originaram-se da possibilidade de grãos de pólen de origem de algodão transgênico fertilizarem plantas de algodão silvestres. A progênie desse cruzamento poderia sofrer retrocruzamentos, levando à introgressão do transgene, o que poderia ter consequências para a manutenção da diversidade genética.

O escape gênico de plantas transgênicas pode ocorrer de três maneiras principais:

- quando a planta transgênica torna-se uma espécie daninha;
- quando o DNA transgênico é transferido, por cruzamento, para espécies silvestres ou outras variedades cultivadas;
- quando o DNA transgênico é transmitido assexuadamente para outras espécies e organismos.

Para que o escape gênico entre distintas espécies ocorra por transmissão sexual, algumas condições são necessárias:

- os dois indivíduos parentais devem ser sexualmente compatíveis;
- deve ocorrer sobreposição no período de florescimento entre os dois tipos parentais;
- um vetor de pólen adequado deve estar presente e ser capaz de transferir o pólen entre os indivíduos;
- a progênie resultante deve ser fértil e ecologicamente adaptada às condições ambientais, onde os parentais estão situados.

Plantas de milho e soja não possuem atributos biológicos para “escapar” e esta-

belecer-se como espécie daninha. O milho é o resultado de uma espécie de polinização eólica e as distâncias que o pólen pode percorrer dependem do padrão do vento, da umidade e da temperatura. Em geral, campos com essas variedades devem ser isolados de outras variedades convencionais com uma distância de pelo menos 200 m. O risco de escape gênico da soja e do milho para parentes silvestres no Brasil é considerado, pela maioria dos cientistas, pequeno ou inexistente. No entanto, se a espécie transgênica fosse o feijão, esse risco seria real, pois existem, no País, várias espécies de feijão silvestres. Em outros países, o risco do escape gênico com soja ou milho pode ser significativo.

Quist e Chapela (2001) relatam a presença de sequências típicas de variedades GM em milho silvestre da região da Sierra Norte, na Província de Oaxaca, sul do México. Vários questionamentos foram levantados sobre os resultados publicados nesse artigo, como os apresentados por Pelevitz (2002), que afirma ter a revista *Nature* se precipitado ao publicar o referido artigo, uma vez que as conclusões tiveram como base artefatos dos dados de reação em cadeia de polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR).

A diversidade genética e de espécies deve ser preservada, pois pode ser futuramente útil no desenvolvimento de novas variedades sempre que outros desafios surgirem para os melhoristas, a exemplo de uma doença inédita para a qual não se conhece uma fonte de resistência.

Quanto ao risco das variedades transgênicas *Bt* (que contém o gene da bactéria *Bacillus thuringiensis*) para insetos benéficos, como abelhas, joaninhas etc., as evidências apontam que a dose letal (DL50) é muito superior à que os insetos estarão expostos em campos plantados com essas variedades transgênicas. Embora a segurança das variedades *Bt* para a borboleta-monarca tenha sido inicialmente questionada, trabalhos conduzidos por diferentes grupos evidenciaram sua segurança, inclusive para esses insetos (TABASHNIK et al., 1994; TANG et al., 1996).

Um estudo conduzido por 15 anos (1985-2000), realizado sob os auspícios da União Europeia, acerca dos impactos ambientais ocasionados pelo cultivo de plantas GM, envolvendo 400 instituições públicas de pesquisa, alcançou a seguinte conclusão: “a pesquisa demonstra que, de acordo com avaliações de riscos-padrão, as variedades GM e seus produtos não apresentam riscos para a saúde humana ou para o ambiente. De fato, o uso de tecnologia mais precisa e as análises mais acuradas, conduzidas durante a fase de regulação, tornam essas variedades e seus produtos derivados até mais seguros do que os convencionais” (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2001).

Além dos aspectos relacionados com o fluxo gênico, os possíveis efeitos adversos do OGM para a microbiota do solo, para organismos não-alvo, como os insetos benéficos (abelhas, inimigos naturais das pragas etc.), e a possibilidade de seleção de pragas resistentes são criteriosamente investigados antes da liberação da variedade transgênica para plantio comercial.

LEI DE BIOSSEGURANÇA E A CTNBio

Vários países, incluindo, na América Latina, Brasil, Argentina, Chile, México e Venezuela, dentre outros, estabeleceram, por meio de legislações específicas, normas de biossegurança para regular o uso da engenharia genética e a liberação, no meio ambiente, de organismos geneticamente modificados. No Brasil, essas normas estão reguladas pela Lei nº 11.105 (BRASIL, 2005) sancionada em 24 de março de 2005, que cria ainda a CTNBio, o Conselho Nacional de Biossegurança (CNS), também conhecido como Conselho de Ministros, e o Serviço de Informação em Biossegurança (SIB).

A CTNBio é composta por 27 membros titulares e seus suplentes, dentre os quais especialistas indicados pela comunidade acadêmica, com notório saber científico nas áreas humana, animal, vegetal e ambiental, obrigatoriamente com doutorado, além de representantes dos Ministérios

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); da Ciência e Tecnologia (MCT); da Saúde; do Meio Ambiente (MMA); do Desenvolvimento Agrário (MDA); do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC); da Defesa; das Relações Exteriores (MRE); da Pesca e Aquicultura (MPA). O mandato é de dois anos, permitida a recondução ao cargo por duas vezes.

A Comissão reúne-se mensalmente para certificar a segurança de laboratórios e experimentos relativos à liberação de OGM no meio ambiente e para julgar pedidos de experimentos e de plantios comerciais de produtos que contenham OGMs.

Foram elaboradas pela CTNBio e publicadas resoluções normativas que regulamentam os mais diversos aspectos da biotecnologia moderna no País. Atualmente, existem cerca de 130 instituições públicas e privadas credenciadas, por meio da concessão de Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), para desenvolver atividades com organismos transgênicos. A Comissão já autorizou e vem acompanhando cerca de 800 processos. A grande maioria refere-se a plantios agrícolas em escala experimental e, apenas três, em escala comercial: da soja *Roundup Ready*TM, tolerante ao herbicida glifosato; do algodão *Bollgard*, resistente a lagartas; e do milho *LibertyLink*TM, tolerante ao herbicida glufosinato de amônio.

A CTNBio analisa, caso a caso, as solicitações que lhe são encaminhadas, emitindo pareceres específicos para o transgênico alvo da avaliação. Antes da liberação para plantio, comércio ou utilização de qualquer produto transgênico, este deve ser submetido a análises sobre seus possíveis riscos para o homem, para os animais e para o meio ambiente. Os resultados dessas análises são avaliados pela CTNBio, que faz a recomendação de liberação dos transgênicos que não oferecem riscos à saúde humana ou animal ou ao meio ambiente. Os produtos transgênicos suspeitos de apresentarem algum efeito nocivo à saúde humana, animal ou ao meio ambiente são vetados para comercialização pela CTNBio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O rápido avanço da engenharia genética trouxe questões de relevâncias ética e jurídica que têm obrigado a maioria dos países a criar ou rever suas legislações. Uma dessas questões mais sensíveis resulta da clonagem de mamíferos a partir de células não reprodutivas de indivíduos adultos, experiência realizada com sucesso pela primeira vez com a ovelha Dolly, pelo Dr. Ian Wilmut, do Instituto Roslin, na Escócia. Atualmente, há relatos de bovinos, suínos, macacos e outros animais clonados.

A lei brasileira de biossegurança proíbe a manipulação genética de células reprodutivas humanas (BRASIL, 2005). Portanto, a clonagem de seres humanos é proibida no Brasil, bem como na maioria dos outros países. No entanto, clones animais já estão sendo gerados no Brasil, seguindo todos os princípios éticos e as normas de biossegurança.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 16º da Lei nº 10.814 de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 mar. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm>. Acesso em: ago. 2009.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **The agricultural situation in the European Union**: 2000 report. Brussels, 2001. 161p.

CONNER, A.J.; GLARE, T.R.; NAP, J.P. The release of genetically modified crops into the environment – part II: overview of ecological risk assessment. **The Plant Journal**, v.33, n.1, p.19-46, Jan. 2003.

FREIRE, E.C. et al. Melhoramento genético do algodoeiro nas regiões oeste e sudoeste da Bahia. In: SILVA FILHO, J. L. da; PEDROSA, M. B.; SANTOS, J. B. dos. **Pesquisas realizadas com algodoeiro no estado da Bahia**: safra 2004/2005. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 146).

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRICULTURAL APPLICATIONS. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008 – the first thirteen years, 1996 a 2008**. [S.l.], 2008. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>>. Acesso em: ago. 2009

KÖNIG, A. et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n.7, p.1047-1088, Jul. 2004.

PELEVITZ, B.A. Corn goes pop, then kaboon. **Scientist**, v.16, n.9, p.18-19, 2002.

QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. **Nature**, v.414, p.541-543, Nov. 2001.

TABASHNIK, B.E. et al. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, n.10, p.4120-4124, May 1994.

TANG, J.D. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamond – back moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.564-569, Feb. 1996.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BELÉM, M.A.F. et al. Biossegurança de alimentos derivados da biotecnologia rDNA. **Biotecnologia**. Ciência & Desenvolvimento, ano 3, n.18, p.34-40, jan./fev. 2001. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio18/18_mat_6.pdf>. Acesso em: set. 2009.

BIOTECH. Informação científica sobre biotecnologia, ano 2, n.6, set. 2004. Disponível em: <www.cib.org.br/pdf/biotech10.pdf>. Acesso em: set. 2009.

BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2007. 387p.

_____; GIÚDICE, M. **Biotecnologia e meio ambiente**. 2. ed. Visconde do Rio Branco:

Suprema, 2008. 510p.

_____; COSTA, N.M.B. **Alimentos geneticamente modificados**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2003. 305p.

_____; PATERNIANI, E.; CASTRO, L.A.B. **Transgênicos: a verdade que você precisa saber**. Brasília: Dupligráfica, 2003. 57p.

_____; ROMANO, E; SÁ, M.F.G. **Fluxo gênico e transgênicos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2007. 199p.

COSTA, N.M.B. Biotecnologia aplicada ao valor nutricional dos alimentos. **Biotecnologia**. Ciência & desenvolvimento, n.32, jan./jun. 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/nutricional_32.pdf>. Acesso em: set. 2009.

DIPPLE, K.M.; MCCABE, E.R.B. Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.71, p.43-50, 2000.

GIDDINGS, G. et al. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1151-1155, 2000.

GIÚDICE, M.P. et al. **Alimentos transgênicos**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2000. 291p.

LEITE, M. **Os alimentos transgênicos**. São Paulo: Publifolha, 2000. 89p.

MERCENIER, A.; WIDERMANN, U.; BREITENEDER, H. Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, n.5, p.510-515, Oct. 2001.

MESSINA, L. **Biotechnology**. New York: H.W. Wilson, 2000. 186p.

PERELMAN, C. **Ética e direito**. São Paulo: Martins Fontes, 1999. 322p.

POSSAS, C. de A.; NEPOMUCENO, A.L. Bioética nas atividades com plantas geneticamente modificadas: contribuição ao Código de ética das manipulações genéticas. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, n.16, p.163-181, out. 2002.

ROCHA, M.M. Biotecnologia e patentes. In: BIOWORK, 1., 1998, Viçosa, MG. [Anais]... Propriedade intelectual, biossegurança e transgênicos. Viçosa, MG: UFV, 1998.

VARELLA, M.D.; FONTES, E.; ROCHA, F.A.N.G. **Biossegurança e biodiversidade: contexto científico e regulamentar**. Belo Horizonte: Del Rey, 1999. 301p.

Plantas transgênicas

*Geraldo Magela de Almeida Cançado*¹

*Ana Cristina Miranda Brasileiro*²

*Ana Paula Ribeiro*³

*Monique Carolina Nunes Fernandes*⁴

*Gustavo César Sant'Ana*⁵

*Bárbara Dantas Fontes-Soares*⁶

*Hermínio Souza Rocha*⁷

*Gustavo Faria Freitas*⁸

Resumo - Com o advento da Engenharia Genética e os avanços da Biologia Molecular, já é possível, hoje, introduzir novas características genéticas em um determinado organismo pela manipulação direta dos genes. A transformação genética permite a troca de genes entre organismos filogeneticamente distantes e que não cruzam entre si, ampliando de forma espantosa a variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento. Os métodos mais utilizados no momento, para a obtenção de plantas transgênicas, são a transformação via *Agrobacterium*, que faz uso de uma bactéria de solo capaz de promover naturalmente a transferência de genes exógenos para o genoma de plantas, a transformação via biobalística, que se baseia na transferência de genes para as células vegetais por intermédio de microprojéteis disparados diretamente para o interior da célula, e a transformação via eletroporação, que gera poros na membrana de protoplastos por pulsos elétricos, permitindo que o gene exógeno penetre no interior da célula e integre-se ao genoma. Existem, ainda, outros métodos de transformação de plantas, utilizados em menor escala. De maneira geral, não há um método de transformação melhor que o outro, visto que a eficiência está relacionada principalmente com o objetivo, o custo, a operacionalidade técnica e a espécie trabalhada.

Palavras-chave: Transformação de plantas. Construção gênica. *Agrobacterium*. Biobalística. Eletroporação.

INTRODUÇÃO

Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio de melhoramento

clássico, em que características fenotípicas de interesse, determinadas por genes, são transferidas à progênie por meio de cruzamentos. No entanto, esses métodos

de melhoramento esbarram em uma série de problemas, como redução da variabilidade genética, ligação gênica, seleção de características poligênicas, mutações

¹Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: cancado@epamig.br

²Eng^a Florestal, Ph.D., Pesq. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900 Brasília-DF. Correio eletrônico: anacmb@cenargen.embrapa.br

³Biotecnologista, Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: anapaula@epamigcaldas.gov.br

⁴Biotecnologista, Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: moniquecarolinamg@yahoo.com.br

⁵Biólogo, Mestrando em Genética e Melhoramento, UFV, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: gcsant@yahoo.com.br

⁶Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: barbarafontes@epamig.br

⁷Eng^a Agr^a, D.Sc., Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: hsrocha2009@gmail.com

⁸Eng^a Agr^a, Doutorando em Fitotecnia, UFLA, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: freitasgf@yahoo.com.br

espontâneas e incompatibilidade sexual, além do longo tempo necessário para transferir características desejáveis para genótipos já melhorados. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às modernas técnicas de Engenharia Genética para auxiliar na resolução de algumas dessas limitações. A combinação de técnicas de Biologia Molecular, de cultura de tecidos e de transferência de genes resultou no desenvolvimento da transformação genética de plantas. Prática que consiste na introdução controlada de um gene no genoma de uma planta e sua posterior expressão, conferindo a esta planta uma nova característica. Como esse gene pode ser oriundo de diferentes organismos (vegetais, animais, bactérias, vírus, fungos etc.), daí a denominação transgene ou gene exógeno.

A introdução do transgene no genoma vegetal receptor é feita de forma controlada e de modo independente da fecundação. Uma vez incorporado no genoma e expresso de maneira estável, o transgene passa a fazer parte do patrimônio genético da planta, não alterando sua constituição genética global. Assim, as plantas transgênicas constituem, hoje, fonte adicional de variabilidade genética para ser incorporada aos programas de melhoramento.

Atualmente, as plantas transgênicas têm grande importância na agricultura mundial, sendo grande parte da área cultivada com espécies de interesse agrônomico ocupada por variedades transgênicas. Em 2008, cerca de 125 milhões de hectares foram cultivados com culturas transgênicas em 25 países, segundo relatório do International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) (Quadro 1). A área é maior que o dobro do território da França ou cerca de quatro vezes e meia a do estado de São Paulo. A transgenia é uma ferramenta biotecnológica que tem gerado grandes benefícios para a humanidade, mas são necessárias avaliações minuciosas dos impactos da liberação do cultivo de plantas transgênicas sobre a saúde humana e animal, sobre o meio ambiente e sobre a sociedade.

COMO SÃO OBTIDAS AS PLANTAS TRANSGÊNICAS

Para obter uma planta transgênica, são necessárias três etapas básicas. A primeira, geralmente a mais limitante, é a identificação do gene que irá conferir a nova característica de interesse para a planta em estudo. A variabilidade genética existente na natureza torna-se potencialmente a fonte desses genes. Entretanto, para ser manipulado, o gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado e isolado dos demais genes no genoma do organismo doador. De posse do gene, este será caracterizado, introduzido em vetores para

transformação e, só então, transferido para o genoma da planta em estudo (ARAGÃO; RECH, 1998).

A segunda etapa consiste no desenvolvimento de uma metodologia eficiente de transformação da espécie vegetal de interesse. Atualmente, diferentes estratégias para a transferência de genes em plantas estão disponíveis, sendo as mais utilizadas as de transformações via *Agrobacterium*, biobalística e eletroporação. A última etapa para a transformação de uma planta é o estabelecimento de um sistema eficiente, simples e, principalmente, reproduzível de regeneração *in vitro* da espécie vegetal.

QUADRO 1 - Área cultivada com transgênicos no mundo, em 2008

Posição	País	Área (milhões de ha)
1ª	EUA	62,5
2ª	Argentina	21,0
3ª	Brasil	15,8
4ª	Índia	7,6
5ª	Canadá	7,6
6ª	China	3,8
7ª	Paraguai	2,7
8ª	África do Sul	1,8
9ª	Uruguai	0,7
10ª	Bolívia	0,6
11ª	Filipinas	0,4
12ª	Austrália	0,2
13ª	México	0,1
14ª	Espanha	0,1
15ª	Chile	<0,1
16ª	Colômbia	<0,1
17ª	Honduras	<0,1
18ª	Burquina Fasso	<0,1
19ª	República Checa	<0,1
20ª	Romênia	<0,1
21ª	Portugal	<0,1
22ª	Alemanha	<0,1
23ª	Polônia	<0,1
24ª	Eslováquia	<0,1
25ª	Egito	<0,1

FONTE: Clive James (2008 apud INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS, 2008).

Durante o processo de regeneração, a célula inicialmente transformada multiplica-se e dá origem a uma planta inteira, na qual todas as células vão conter a nova informação introduzida. A regeneração dessa planta baseia-se no princípio da totipotência, isto é, a potencialidade que as células vegetais têm de diferenciar-se, originando um novo indivíduo.

Cada espécie vegetal ou diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie têm exigências nutricionais e hormonais diferenciadas para a sua regeneração. Alguns apontam a dificuldade em cultivar determinadas espécies vegetais *in vitro* como o principal limitante à transformação de plantas no momento. No entanto, os grandes avanços obtidos na pesquisa com reguladores de crescimento de vegetais e cultura de tecidos fazem com que um número crescente de plantas possa ser regenerado via cultivo *in vitro*, permitindo a obtenção de um maior número de espécies vegetais capazes de ser geneticamente transformadas.

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE GENES DE INTERESSE

O genoma de uma bactéria contém, aproximadamente, 5 mil genes; o de plantas tem em torno de 40 mil a 60 mil, enquanto que o dos seres humanos, embora este dado ainda não seja conhecido com exatidão pelos cientistas, é estimado em 30 mil a 50 mil genes. Os genes de organismos vivos, independentemente de sua complexidade, são constituídos por segmentos de um mesmo tipo de molécula: o ácido desoxirribonucleico (DNA), exceto para alguns tipos de vírus, cujo material genético é o ácido ribonucleico (RNA). Esta característica é que permite que genes de um organismo sejam potencialmente funcionais em outro.

Uma forma de identificar e isolar genes de interesse é por meio da construção de uma biblioteca genômica. Para isso, o DNA do organismo que contenha o gene, que potencialmente for utilizado, será isolado e, em seguida, cortado em pequenos

fragmentos com o auxílio de enzimas de restrição, que agem como tesouras moleculares. Esses fragmentos são, então, ligados em fragmentos circulares de DNA (plasmídeos), inseridos em bactérias e multiplicados pelo seu crescimento exponencial. A partir daí, é só selecionar a colônia de bactérias que contém o fragmento de DNA correspondente ao gene de interesse (CORDOVAL, 2002). Uma forma de fazer isso é pelo sequenciamento de cada um dos fragmentos de DNA que constituem a biblioteca genômica. Dessa maneira, uma quantidade imensa de genes de vírus, bactérias, fungos, plantas, animais e humanos já foi isolada, identificada, caracterizada, e suas sequências de nucleotídeos disponibilizadas para a comunidade científica em bancos de dados gigantescos como o GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2009).

O isolamento, a identificação e a caracterização de genes assistem avanços contínuos e rápidos nas últimas duas décadas e, como exemplo de novas tecnologias, podem-se citar a bioinformática e a genômica funcional. Métodos que estudam padrão de expressão de genes e de biossíntese de proteínas em larga escala, tais como transcriptomas (microarranjos de DNA), proteomas e metabolomas, aceleram e facilitam a identificação de genes-alvo entre dezenas ou mesmo centenas de milhares de outros genes, além de possibilitar ao pesquisador, uma visão mais ampla dos processos metabólicos em nível molecular.

Diversos genes de interesse agrônomico já foram isolados, tais como genes que codificam proteínas capazes de modificar herbicidas, inativando-os. Desse modo, culturas que contêm esse gene poderiam tornar-se resistentes ao herbicida, facilitando o controle de plantas daninhas. Há também, genes bacterianos que codificam proteínas com propriedades tóxicas para insetos. Os insetos ao se alimentarem de plantas que expressam esse gene morreriam ou se desenvolveriam com menor eficiência, reduzindo ou mesmo evitando seu controle por meio da aplicação de inseticidas químicos, que podem ser danosos à

saúde e ao ambiente (LACERDA, 2006).

As características dos exemplos citados são monogênicas, ou seja, o fenótipo é determinado pela expressão de um único gene. Mas é necessário salientar que muitas características importantes para a agricultura são poligênicas ou multigênicas, ou seja, o fenótipo é determinado pela expressão e/ou repressão temporal e espacial de vários genes, simultaneamente ou em uma cascata coordenada de eventos. Resistência à seca, altura de planta e potencial de produção são exemplos de fenótipos controlados por vários genes. Diante da grande complexidade, a identificação de todos os componentes genéticos para características multigênicas ainda é um desafio para a ciência (LACERDA, 2006).

VETORES PARA TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Os vetores utilizados para a transformação genética de plantas são, geralmente, plasmídeos bacterianos, nos quais o gene de interesse foi clonado. E o que vem a ser um plasmídeo? As bactérias são conhecidas por possuírem uma molécula de DNA dupla hélice, de maior tamanho, definida como DNA cromossômico e moléculas de DNA circular, de menor tamanho (2 mil a 15 mil pares de base), denominadas plasmídeos (ARAGÃO; RECH, 1998). Esses são independentes do DNA cromossômico, com replicação autônoma no interior da célula. Vários plasmídeos de bactérias foram manipulados pelo homem para ser utilizados como vetores para transformação de plantas (Fig. 1). Uma vez identificado o gene de interesse no genoma do organismo doador, sua sequência codificadora (posteriormente traduzida em uma proteína) deverá ser isolada e transferida para um cassete, onde será flanqueada por um promotor, que permite que o gene seja reconhecido por enzimas específicas e expresso corretamente em plantas, e um sinal de terminação, que promove o final da leitura do gene. Esse cassete, contendo o gene quimérico é então transferido para um plasmídeo que será utilizado como

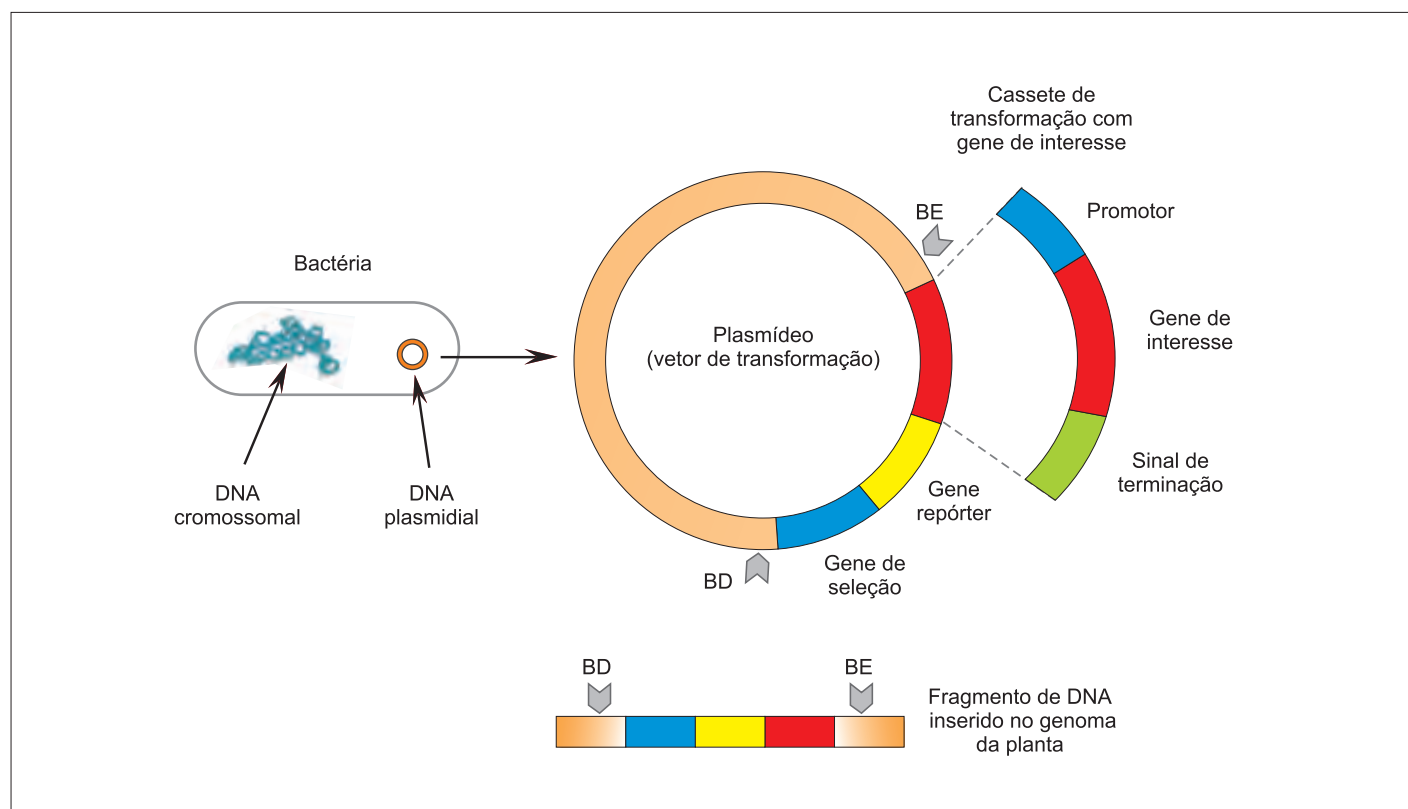


Figura 1 - DNA plasmidial contendo o cassete de transformação (plasmídeo Ti)

NOTA: O cassete de transformação é composto pelo gene de interesse e suas sequências regulatórias (promotor e região de terminação), associados aos genes marcadores e suas sequências regulatórias. As setas indicam os sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição (onde ocorre a clivagem do ácido desoxirribonucléico (DNA)) e que flanqueiam o cassete de transformação, em que, BD = borda direita e BE - borda esquerda.

vetor de transformação de plantas (Fig. 1). De forma geral, um vetor de transformação contém basicamente o gene de interesse, um gene de seleção e um gene repórter, necessários para a identificação das plantas que foram efetivamente transformadas. A esse conjunto de genes é dado o nome de DNA de transferência (T-DNA), que será transferido para o genoma da planta (DELÚ FILHO; CASCARDO; FONTES, 1999).

GENES MARCADORES DE SELEÇÃO E REPÓRTERES

Genes marcadores de seleção são aqueles que codificam para uma proteína com uma atividade enzimática ou para um produto, que irá conferir às células transformadas da planta resistência a um determinado substrato. A finalidade do uso de um gene marcador de seleção é permitir que apenas as células transformadas

cresçam em detrimento às células não-transformadas. Assim, as plantas transformadas deverão possuir, além do gene de interesse, um gene marcador de seleção que irá conferir resistência a uma determinada substância tóxica ao desenvolvimento das plantas, geralmente um antibiótico ou um herbicida. Uma eficiente seleção é de grande importância para a obtenção de plantas transformadas, pois, na presença do agente seletivo, somente aquelas que foram efetivamente transformadas conseguem desenvolver-se, por causa da resistência conferida pelo gene de seleção. Por outro lado, genes repórteres são aqueles que codificam para uma proteína, geralmente com atividade enzimática, cujo produto é facilmente detectável.

Esses genes possibilitam a identificação ou marcação das células transformadas sem contudo eliminar as células não-transformadas. Assim, o gene repórter

funciona de maneira complementar ao gene de seleção. Sua principal função na planta é indicar, por meio da expressão de um gene, a presença de células ou tecidos transformados, de maneira simples e rápida. O produto da expressão do gene repórter, assim como do gene de seleção, não pode estar presente nas células de plantas não-transformadas. Entretanto, muitas vezes, estas plantas podem-se desenvolver na presença do agente seletivo por motivos que vão desde concentrações insuficientes ou degradação dos agentes de seleção, até o surgimento de variações somaclonais (mutações) resistentes a estes. Esses eventos são conhecidos como escapes. Após o evento da transformação, as células transformadas e não-transformadas do explante são cultivadas em meios que contêm o agente seletivo. Como pode haver escapes nessa fase, faz-se necessária a presença do outro gene repórter para confirmação do estado transgênico do material.

O gene repórter seria então uma segunda confirmação indireta da transformação, pois, *a priori*, apenas as plantas que apresentam o cassete de transformação inserido em seu genoma seriam capazes de expressar o gene repórter. O gene repórter mais utilizado no momento é o gene *gus* que codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS). Na presença da enzima GUS, um substrato cromogênico, o X-Glu, forma um precipitado de cor azul-intenso no tecido transformado (JEFFERSON, 1987). Assim, com apenas um pequeno pedaço de tecido metabolicamente ativo pode-se confirmar a transformação de forma rápida e simples.

No entanto, quando a transformação é via *Agrobacterium*, podem ocorrer falsos positivos para o teste do GUS, por causa da contaminação endógena das plantas com a própria bactéria utilizada para a transformação. Mesmo estando o gene *gus* sob o controle de sequências regulatórias de plantas, pode haver expressão de GUS em *Agrobacterium*. Como a eliminação completa da bactéria nos explantes transformados pode ser difícil e demorada, é comum o aparecimento de falsos-positivos. Este problema foi resolvido pelo desenvolvimento de vetores contendo um gene *gus* alterado, cuja expressão é nula ou não-detectável em *Agrobacterium*. Uma outra limitação do gene *gus* como repórter reside no fato de algumas plantas possuírem uma atividade endógena similar à de GUS, o que também pode gerar falsos-positivos. Esse problema pode ser contornado utilizando-se outras classes de genes repórteres, tais como o gene *gfp* (proteína verde fluorescente), que é traduzido em uma proteína fluorescente no comprimento de luz azul e que não existe naturalmente em plantas (CHALFIE et al., 1994).

A maior vantagem da utilização do gene *gfp* sobre outros genes repórteres é que a GFP não necessita de cofatores para fluorescer, podendo assim ser visualizada em células vivas. E por que não se poderia utilizar o produto do gene de interesse introduzido (proteína) ou o fenótipo da planta, para selecionar as plantas transformadas? Isso sem dúvida é feito, só que em

uma etapa final do trabalho. Nos estádios iniciais de transformação, o número de explantes produzidos é bastante elevado. O uso de genes de seleção e genes repórteres permite o descarte precoce de todas as plantas que não foram efetivamente transformadas, evitando-se gastos desnecessários de espaço, tempo e recurso. Além do mais, na maioria dos casos, o produto do gene de interesse pode ser uma proteína ou enzima de difícil detecção ou que só pode ser detectada em estádios avançados do desenvolvimento das plantas.

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Vários métodos de obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidos. Alguns deles já estão bem estabelecidos, sendo utilizados de forma rotineira em laboratórios de transformação de plantas. Apesar de existirem inúmeros métodos de transformação, serão descritos aqueles via *Agrobacterium*, eletroporação de protoplastos e biobalística, por serem os mais usuais. Outros métodos de transformação apresentados pela literatura, tais como macroinjeção, microinjeção, lipossoma e polietilenoglicol (PEG) são utilizados para propostas mais específicas, por sua maior complexidade (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Deve-se ter em mente que não existe um método de transformação ótimo ou ideal para todo o tipo de planta. Em função da espécie vegetal e do propósito do trabalho, pode-se optar por um método ou outro, segundo as vantagens que possa apresentar.

Transformação por *Agrobacterium*

As agrobactérias são microrganismos tipicamente do solo e possuem forma de bacilo, movendo-se por meio de um a seis flagelos. O gênero *Agrobacterium* (do grego *agros* = campo e *bakterion* = bastonete) pertence à mesma família das bactérias fixadoras de nitrogênio e está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela sintomatologia em diferentes plantas

(KERSTERS; LEY, 1984). *Agrobacterium tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa (*crown gall*), *A. rhizogenes* causa a raiz-em-cabeleira (*hairy root*), *A. rubi* induz tumores especificamente em *Rubus* spp. (*cane gall*), *A. vitis* induz tumores especificamente em videiras (*Vitis* spp.) e *A. radiobacter* é saprófita, isto é, não patogênica (BRASILEIRO, 1998).

Mais de 600 espécies vegetais são comumente suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, pertencendo a maioria delas à classe das Angiospermas dicotiledôneas e Gymnospermas e, mais raramente, das Angiospermas monocotiledôneas (BRASILEIRO, 1998). Apesar de as doenças causadas por agrobactérias, principalmente a galha-da-coroa, serem muito sérias para algumas culturas, estas raramente têm causado danos econômicos para a agricultura no Brasil. A infecção de uma planta por *Agrobacterium* inicia-se pela penetração da bactéria no tecido vegetal por meio de uma lesão sofrida pela planta por tratos culturais, geadas, insetos ou outro agente. A lesão na planta exsuda moléculas, como compostos fenólicos, açúcares ou aminoácidos, que atraem as agrobactérias. Essas moléculas exsudadas são responsáveis por ativar genes presentes na agrobactéria e também pela transferência de parte do plasmídeo de virulência dessas bactérias, conhecido como plasmídeo Ti, para o genoma da planta.

Os genes presentes no fragmento do plasmídeo Ti da agrobactéria, que é transferido para a planta, conhecido como T-DNA, serão expressos nas células vegetais, produzindo enzimas que estão envolvidas com a síntese de hormônios vegetais e com a síntese de opinas (compostos sintetizados para a nutrição da bactéria). Dessa forma, as células vegetais que recebem o T-DNA proliferam desordenadamente, em consequência da síntese de hormônios, levando à formação de um tumor (BRASILEIRO; LACORTE, 1998). Este tumor é o principal sintoma da doença galha-da-coroa, causada por *A. tumefaciens*. Em *A. rhizogenes* a expressão dos genes do T-DNA induz à produção de raízes no local do ferimento, provocando

a doença denominada raiz-em-cabeleira. Por achar que se tratava de uma forma vegetal de câncer, as agrobactérias foram intensamente estudadas nos anos 80 na esperança de o modelo da doença vegetal ser semelhante ao câncer, que ocorre em células animais, auxiliando dessa forma na descoberta da cura.

Apesar de os pesquisadores terem-se frustrado em seu objetivo inicial, pois não havia nenhuma relação entre os tumores em vegetais e a doença em animais, logo se percebeu que o sistema de transferência de genes das agrobactérias para as plantas poderia ser um método extremamente eficaz para a transferência de genes de interesse para plantas. Assim, os plasmídeos Ti das agrobactérias foram intensamente estudados e manipulados, permitindo a troca de genes do T-DNA, não-essenciais para a transformação, por genes de interesse, ou seja, transformaram o plasmídeo Ti de agrobactérias em um vetor natural de transformação de plantas. As linhagens de *Agrobacterium* que perderam todo ou parte do seu T-DNA são denominadas linhagens desarmadas, pois são incapazes de produzir tumores nas plantas hospedeiras (ZAMBRYSKI et al., 1983).

Para transformar plantas, utilizando linhagens desarmadas de *Agrobacterium*, utilizam-se explantes com potencial regenerativo, como segmentos de folhas jovens (discos foliares), embriões zigóticos, entrenós, cotilédones etc. O explante é colocado na presença de meio líquido contendo as bactérias desarmadas com o vetor de transformação que contém o gene de interesse, em um processo denominado cocultura (Fig. 2). Durante este contato, as bactérias infectam o tecido vegetal e iniciam o processo de transferência do cassete de transformação para o genoma da planta. Após a cocultura, o tecido é cultivado em um meio de regeneração na presença de antibiótico, para eliminação da *Agrobacterium* e de um agente seletivo, para a seleção das células transformadas.

Numa etapa final, as plantas transformadas são regeneradas *in vitro* e transferidas para ambientes de aclimação da mesma forma que se faz para outros trabalhos com cultura de tecidos (Fig. 2). Atualmente, para algumas espécies de plantas, tais como

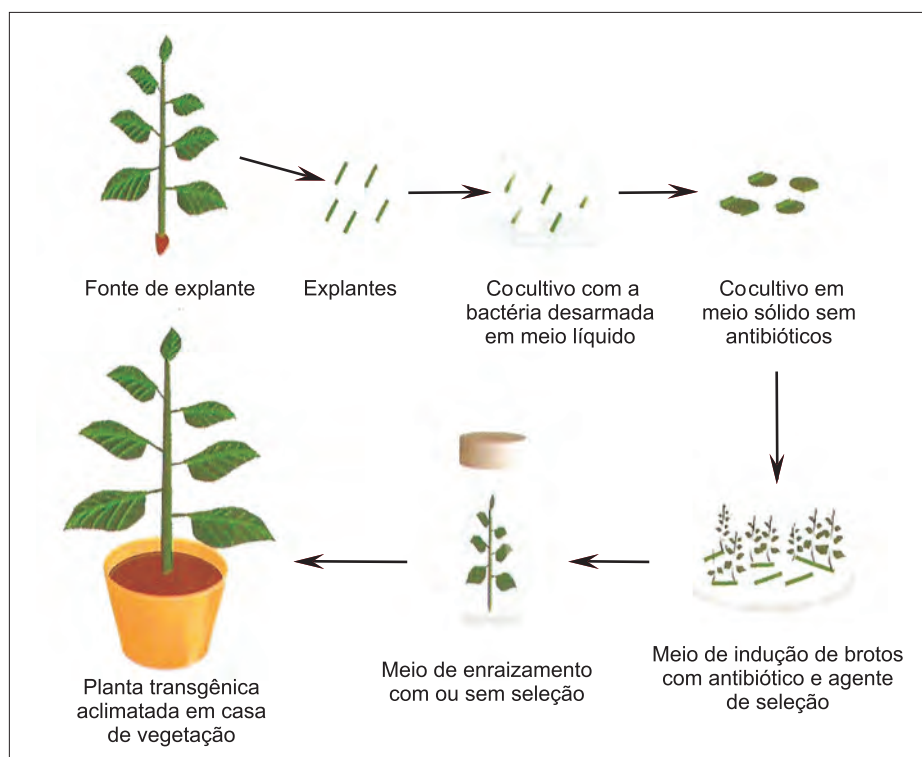


Figura 2 - Transformação de plantas por *Agrobacterium*

FONTE: Brasileiro e Dusi (1999).

NOTA: Segmentos foliares são retirados da folha da planta, a qual se quer transformar, e são submersos em solução na presença da bactéria que contém o vetor de transformação (plasmídeo Ti contendo o cassete de transformação). Algumas horas após, os segmentos foliares são transferidos para meio nutritivo sólido na presença de um antibiótico para a eliminação da bactéria e de um agente seletivo (antibiótico ou herbicida) para a seleção das células transformadas. Após regeneração das plântulas, estas são transferidas para novo meio, quando se faz a seleção das plântulas positivas, com auxílio do agente seletivo. As plantas que crescerem no meio com agente seletivo, são submetidas a novos testes para confirmação (testes histoquímicos para expressão do gene repórter, *polymerase chain reaction* (PCR), *Southern*, *northern* e *western blots*), e as plantas transformadas positivamente são enraizadas *in vitro* e transferidas para vasos com solo em casa de vegetação.

Arabidopsis thaliana, a transformação pode ser feita pelo contato direto de botões florais com a solução, contendo *Agrobacterium*. A taxa de sementes positivamente transformadas por este método pode alcançar até 5%. Dessa forma, as agrobactérias têm sido utilizadas como um eficiente vetor natural para a transformação genética de plantas, principalmente, de Angiospermas dicotiledôneas. A alta eficiência de transformação e o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção, são as maiores razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium*.

Transformação por eletroporação de protoplastos

Protoplastos são células vegetais individualizadas e desprovidas de paredes celulares que foram eliminadas com o auxílio de enzimas pectocelulolíticas. Em condições adequadas de cultura de tecidos, os protoplastos podem reconstituir suas paredes celulares, regenerando um novo tecido que pode dar origem a uma nova planta (BOURGIN; CHUPEAU; MISSIONIER, 1979). A eletroporação de protoplastos consiste na indução de poros na membrana celular de protoplastos por

meio de pulsos elétricos de alta voltagem. Esses poros permitem a entrada do vetor de transformação contendo o gene de interesse para o interior da célula e, como os poros são reversíveis, ou seja, fecham-se novamente após terminada a aplicação do pulso elétrico, os protoplastos contendo o vetor de transformação podem-se regenerar em novas plantas (FROMM; TAYLOR; WALBOT, 1985) (Fig. 3).

Os protoplastos, logo após terem sido isolados, são imediatamente colocados em um eletroporador na presença do vetor de transformação, contendo o gene de interesse. O pulso elétrico é muito rápido e, logo após, os protoplastos são transferidos para um meio de cultura, onde serão selecionados aqueles que forem transformados. A grande vantagem desse método em relação aos outros é que a transformação é feita em células individuais. Assim,

todo o tecido regenerado será originado a partir de uma única célula, evitando dessa forma o surgimento de quimeras (tecido constituído de células transformadas e não-transformadas), problema observado com certa frequência, quando se realiza transformação em tecidos ou órgãos. A grande desvantagem desse método reside justamente na dificuldade de obtenção de uma nova planta a partir de um protoplasto. O processo é lento, exige mudanças constantes de meios de cultura e condições de cultivo e possui, geralmente, uma baixa eficiência. Para algumas espécies vegetais, o processo de regeneração do protoplasto pode ser um forte limitante ao uso desta técnica.

Por outro lado, a eletroporação tem sido extremamente útil em estudos de expressão transiente, que é a expressão do gene exógeno sem que ele tenha sido necessa-

riamente incorporado ao genoma. Neste caso, o gene expressa-se transitoriamente na célula transformada, mas, à medida que as células dividem-se e multiplicam-se, a expressão do gene vai diminuindo até desaparecer por completo. A análise da expressão transiente após eletroporação permite testar rapidamente a funcionalidade de uma construção gênica, sem a necessidade de obter uma planta transgênica.

Transformação por biobalística

A biobalística, como o próprio nome indica, funciona de forma análoga a uma arma de fogo, onde micropartículas revestidas com o vetor de transformação são aceleradas em alta velocidade contra o tecido no qual se quer transferir o gene. Esse método de transformação também é conhecido como bombardeamento ou *gene gun* (arma de genes) e foi inicialmente proposto por Sanford et al. (1987). As micropartículas utilizadas pela biobalística são partículas microscópicas (de 0,2 a 4 µm de diâmetro) de ouro ou tungstênio, que possuem adsorvido à sua superfície o vetor de transformação, contendo o cassete com o gene de interesse. As micropartículas atravessam de forma não-letal a parede celular e a membrana plasmática, alojando-se de forma aleatória no interior das células. Uma vez na presença do líquido celular, o DNA adsorvido à superfície da micropartícula encontra condições para se tornar livre, podendo então ser incorporado ao genoma nuclear da célula vegetal (RECH; ARAGÃO, 1998; LACORTE et al., 1999). As micropartículas são aceleradas em direção ao tecido-alvo por meio de uma onda de choque que pode ser gerada de diversas formas, sendo que a mais utilizada atualmente é a de uma descarga de gás hélio à alta pressão.

O aparelho responsável por gerar a onda de choque é denominado acelerador de micropartículas ou bombardeador e está esquematizado na Figura 4. A onda de choque gerada pela liberação rápida do gás hélio lança a membrana carreadora (onde as micropartículas estão depositadas) a uma altíssima velocidade contra uma tela

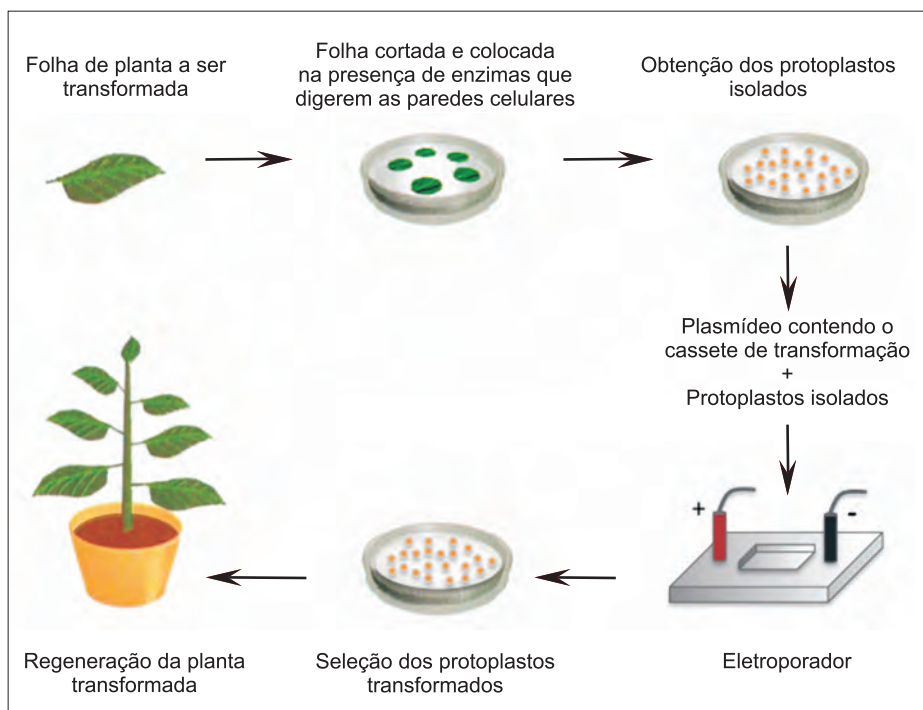


Figura 3 - Transformação de plantas por eletroporação

FONTE: Dados básicos: Brasileiro e Dusi (1999).

NOTA: Segmentos foliares da planta, a qual se quer transformar, são digeridos com enzimas que degradam as paredes celulares, para a liberação dos protoplastos. Os protoplastos são purificados e transferidos para a cuba de eletroporação com o ácido desoxirribonucléico (DNA) plasmidial, contendo o cassete de transformação, onde serão submetidos a pulsos elétricos para a formação dos poros na membrana celular. Após a eletroporação, os protoplastos são transferidos para meio de seleção, onde apenas os protoplastos transformados com a construção gênica serão multiplicados.

de retenção que detém esta membrana e permite a passagem apenas das micropartículas. Estas, por sua vez, continuarão sua trajetória pela inércia e irão atingir diretamente o tecido que está posicionado logo abaixo da tela de retenção. Todo o processo ocorre no interior de uma câmara sob vácuo (Fig. 4), para evitar a desaceleração das partículas causada pelo atrito com o ar.

Essa técnica é bastante versátil, pois permite potencialmente a transformação de qualquer espécie vegetal ou genótipo, assim como qualquer tipo celular ou mesmo organelas, como mitocôndrias e cloroplastos. Além disso, a técnica de transformação por biobalística pode ser considerada relativamente simples, rápida e que não envolve maiores investimentos em infraestrutura e equipamentos. O próprio acelerador de partículas é um aparelho simples e de baixo custo. Uma outra vantagem da biobalística é a maior eficiência de transformação em Gymnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado com a transformação por *Agrobacterium* (RECH; ARAGÃO, 1998). A biobalística também é bastante utilizada, à semelhança da eletroporação de protoplastos para estudar a funcionalidade de construções gênicas.

ANÁLISE DAS PLANTAS TRANSFORMADAS POR TÉCNICAS MOLECULARES

A expressão de um gene repórter ou a sobrevivência de um explante em meio seletivo é considerada apenas como evidência da transformação, não sendo suficiente como prova definitiva da integração e expressão do cassete no genoma da planta. Como foi frisado anteriormente, mesmo com o uso dos genes marcadores de seleção e repórter, pode ocorrer a presença de falsos-positivos. A reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) e o *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) são duas técnicas moleculares indispensáveis para a confirmação da presença e da integração do cassete de transformação no genoma das plantas transformadas. No caso do PCR (Fig. 5), o gene de interesse e/ou

um dos genes marcadores são amplificados bilhões de vezes *in vitro* por enzimas que sintetizam novas fitas de DNA e com o auxílio de um termociclador, máquina que simula os ciclos de replicação do DNA. Estes bilhões de cópias do gene podem

então ser facilmente visualizados na forma de uma banda em um gel de agarose. No caso do *Southern blot* (Fig. 6), o gene pode ser visualizado pela utilização de sondas marcadas radiotivamente (isótopo ^{32}P), que se ligam (hibridizam) especificamente

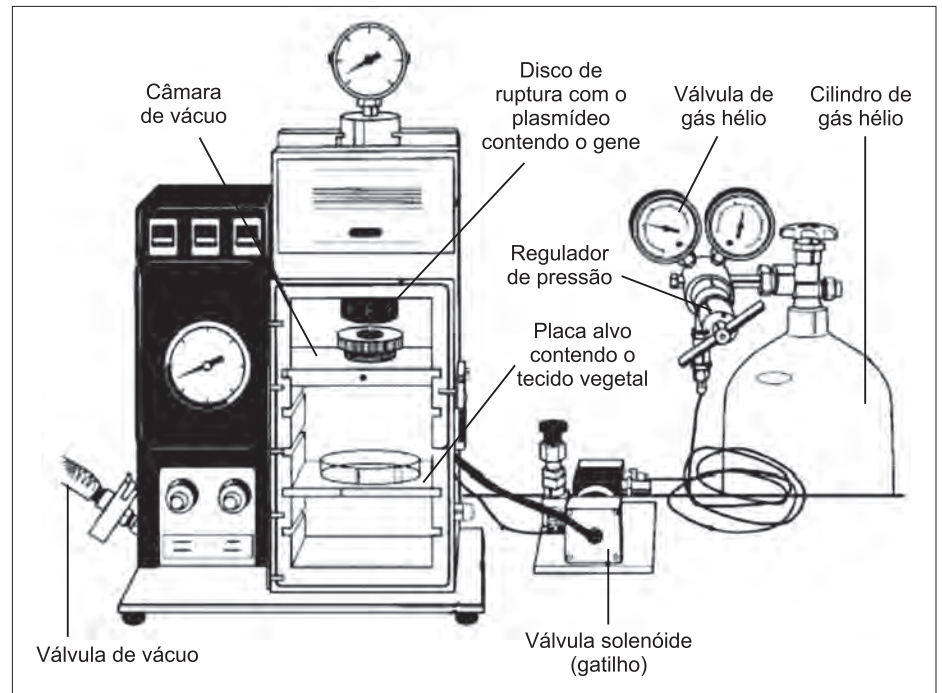


Figura 4 - Esquema de um acelerador de partículas a gás hélio, utilizado para transformação de plantas por biobalística

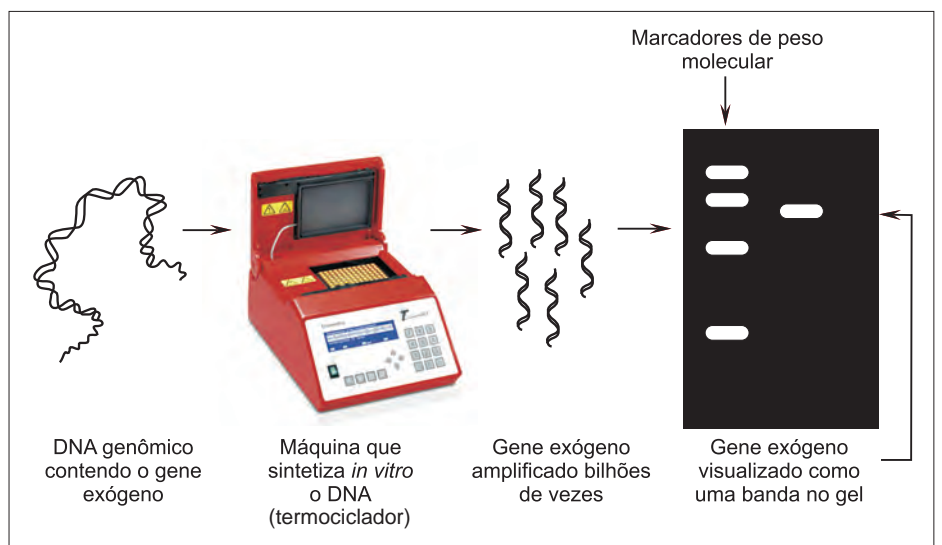


Figura 5 - Detecção do gene exógeno por meio da amplificação do DNA via PCR

NOTA: Nesta técnica, bilhões de cópias do gene exógeno são sintetizadas *in vitro*. O termociclador é a máquina que simula as condições necessárias para a síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) *in vitro*. Após a amplificação, o produto do *polymerase chain reaction* (PCR) é aplicado em gel de agarose, para visualização da banda correspondente ao DNA do gene exógeno.

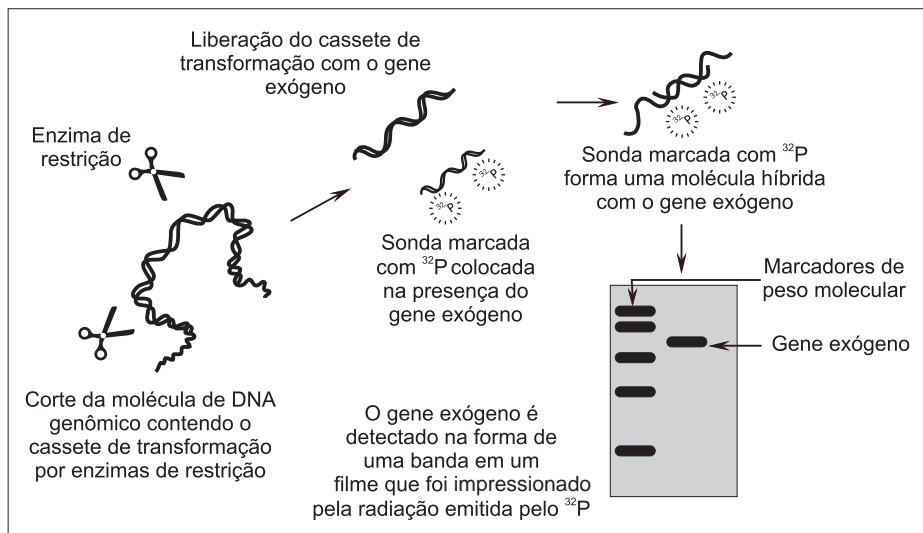


Figura 6 - Detecção do gene exógeno por meio da técnica de *Southern blot*

NOTA: Nesta técnica, o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico é clivado por enzimas de restrição e os fragmentos gerados são eluídos em gel de agarose e transferidos para membrana de náilon ou nitrocelulose, conservando sua posição de corrida no gel. O fragmento que contém o gene exógeno hibrida-se com uma sonda marcada, de sequência homóloga à sequência do gene exógeno. A molécula híbrida de DNA formada pela sonda e pelo fragmento de DNA, contendo o gene exógeno, emite radiação que impressiona filme de raios X ou *Image Plate*, gerando banda, que confirma a presença do gene.

ao gene de interesse ou a um dos genes marcadores.

O DNA total da planta é inicialmente extraído e clivado por enzimas de restrição em sítios específicos da molécula de DNA que flanqueiam o cassete de transformação. Dessa forma, o cassete é liberado do resto do genoma e transferido para uma membrana que, posteriormente, é colocada na presença da sonda radioativamente marcada, para que possa ocorrer a formação da molécula híbrida entre o gene exógeno presente no cassete de transformação e a sonda. Ou seja, uma fita simples de DNA do gene exógeno com uma fita simples de DNA da sonda unem-se, em consequência da formação de pontes de hidrogênio, formando novamente uma fita dupla de DNA. Quando exposto na presença de filme de raios X ou *Image Plate*, as sondas marcadas o impressionam, por causa da emissão de radiação, dando origem a uma banda que corresponde ao gene de interesse. Dependendo do tipo de clivagem realizado no DNA total da planta, o *Southern blot* pode permitir a estimativa do número de cópias do cassete no genoma receptor (ROMANO, 1998).

Muitas vezes, a integração do T-DNA no genoma da planta não significa necessariamente que o gene será expresso, ou seja, que vá produzir a proteína ou enzima de interesse. Isso é um problema muito comum observado em transformação de plantas e os motivos que levam a isso possuem inúmeras causas, sendo que muitas delas ainda não foram completamente desvendadas. A forma mais simples para checar se um gene está sendo expresso ou não é pela observação de seu fenótipo em uma planta completamente regenerada ou em sua progênie (descendentes), desde que o produto do gene em questão cause alterações que possam ser detectáveis visualmente ou por técnicas moleculares e bioquímicas.

Como foi dito anteriormente, a expressão de determinados genes pode ocorrer em níveis tão baixos, que mudanças no fenótipo da planta podem não ser perceptíveis ou, ainda, o produto do gene pode não causar nenhuma alteração expressiva no fenótipo final da planta. A purificação bioquímica da proteína ou da enzima produzida pelo gene exógeno pode ser difícil de ser rea-

lizada, exigindo pessoal e infraestrutura adequados, o que muitas vezes pode ser bastante complexo e caro. Existem técnicas moleculares que permitem observar a expressão dos genes de forma fácil e rápida. As mais utilizadas são o *northern blot* (ALWINE; KEMP; STARK, 1977) e o *western blot* (BURNETTE, 1981; TO-WBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) e, mais recentemente, uma nova técnica com base na detecção em tempo real da expressão diferencial de genes denominada por *quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction* (qRT-PCR) ou transcrição reversa quantitativa – reação em cadeia da polimerase.

O *northern blot* permite detectar a quantidade e o tamanho do RNA mensageiro (mRNA) produzido pelo gene exógeno por meio de hibridização com sondas específicas marcadas radioativamente. Já na qRT-PCR, acompanha-se a evolução da replicação do DNA complementar (cDNA) do gene de interesse a cada ciclo da PCR pela emissão de fluorescência. No *western blot*, detecta-se a proteína ou enzima produzida por este mRNA, por meio da ligação com anticorpos específicos. Essas técnicas possuem sensibilidade suficiente para detectar pequenas quantidades de mRNA ou de proteínas produzidas pelo gene exógeno.

O interessante em utilizar o *northern blot*, *western blot* e a qRT-PCR é que estes permitem não só a detecção da expressão do gene, como também quantificar a intensidade dessa expressão pela intensidade das bandas e curvas de amplificação que são geradas. Isto é de grande importância para os pesquisadores, pois, além da integração do gene no genoma da planta, é muito importante saber se este se expressa em níveis adequados, para que ocorra a mudança fenotípica esperada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O que era visto como uma possibilidade para o futuro, hoje já pode ser encarado como realidade. São inúmeras as espécies vegetais, assim como as características genéticas estudadas no campo da trans-

formação genética de plantas, com objetivos que vão desde a obtenção de plantas resistentes ou tolerantes a condições de estresses bióticos e abióticos, a plantas com melhor qualidade nutricional, capazes de produzir fármacos e biomoléculas de interesse industrial (biorreatores) e até mesmo na recuperação de ambientes degradados e contaminados (biorremediadores e biodegradadores). A tecnologia de introdução de genes exógenos via transformação genética de plantas tem disponibilizado, para os melhoristas, genes antes impossíveis de ser manipulados pelos métodos convencionais de melhoramento. Com a eliminação das barreiras que impediam o cruzamento interespecífico, é esperado um novo salto tecnológico para o setor agrícola, principalmente no que diz respeito ao lançamento de cultivares. O uso de organismos transgênicos como modelos de estudo também tem colaborado significativamente para elucidação de processos e fenômenos importantes nas áreas de Genética, Fisiologia, Biologia Celular e Biologia Molecular. No entanto, ainda há inúmeros desafios a serem vencidos, tais como a adequação do processo de cultivo e regeneração *in vitro* para várias espécies recalcitrantes, compreensão da função da grande maioria dos genes e a manipulação genética de características complexas, que são governadas pela ação de vários genes e que frequentemente estão associadas à produtividade.

REFERÊNCIAS

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.74, n.12, p.5350-5354, Dec. 1977.

ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Isolamento de vetores para transformação direta. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.17-33.

BOURGIN, J.; CHUPEAU, Y.; MISSONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Phy-**

siologia Plantarum, Copenhagen, v.45, n.2, p.288-292, Feb. 1979.

BRASILEIRO, A.C.M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. In: _____; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.65-74.

_____; DUSI, D.M. de A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPB, 1999. v.2, p.679-735.

_____; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: _____; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.75-92.

BURNETTE, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, New York, v.112, n.2, p.195-203, Apr. 1981.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v.263, n.5148, p.802-805, Feb. 1994.

CORDOVAL, M.B. **Transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/TRANS/G/TRG003.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

DELÚ FILHO, N.; CASCARDO, J.C. de M.; FONTES, E.P.B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPB, 1999. v.2, p.653-677.

FROMM, M.; TAYLOR, L.P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.82, n.17, p.5824-5828, Sept. 1985.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008 – the first thirteen years, 1996 to 2008**. [S.l., 2008]. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>>. Acesso em: ago. 2009.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Mo-**

lecular Biology Reporter, v.5, p.387-405, 1987.

KERSTERS, K.; LEY, J. Genus III: *Agrobacterium* Conn 1942. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systemic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.244-254.

LACERDA, A.L. de S. **Plantas transgênicas**. [S.l.]: Infobibos, 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/transgenicos/index.htm>. Acesso em: 20 ago. 2009.

LACORTE, C. et al. Biobalística. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPB, 1999. v.2, p.761-781.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA: part F**. San Diego: Academic Press, 1987. p.335-350. (Methods in Enzymology, 155).

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank overview**. Bethesda, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.51-64.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica Southern blot. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.205-222.

SANFORD, J.C. et al. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v.5, p.27-37, 1987.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v.98, n.3, p.503-517, Nov. 1975.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, Sept. 1979.

ZAMBRYSKI, P. et al. Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, Oxford, v.2, p.2143-2150, 1983.

Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes

Ellen Noly Barrocas¹
José da Cruz Machado²
Antonia dos Reis Figueira³
Ricardo Magela de Souza⁴
Alessandra Keiko Nakasone Ishida⁵
Ana Beatriz Zacaroni⁶
Hermínio Souza Rocha⁷

Resumo - A associação de fitopatógenos com sementes tem sido responsável por danos dos mais significativos em cultivos de interesse humano, causando prejuízos tanto para produtores de sementes como para produtores e consumidores de grãos, além dos efeitos danosos a todo sistema produtivo. O diagnóstico preciso de patógenos, quando ainda estão em sementes e/ou materiais de propagação vegetal, é uma das mais importantes estratégias de manejo de doenças, já que previne sua entrada no campo. A dificuldade de distinção entre algumas espécies e outras formas de variação dos agentes patogênicos, aliada às circunstâncias de alta pressão de análises de amostras em determinadas épocas do ano, obriga o uso de métodos de detecção mais sensíveis, rápidos, simples e acurados. Para enfrentar esses desafios, as técnicas moleculares, em conjunto com métodos biológicos, surgem como importantes ferramentas, que, uma vez desenvolvidas e ajustadas, podem atender, satisfatoriamente, aos sistemas envolvidos nesse tipo de demanda.

Palavras-chave: Patologia da semente. Diagnose molecular. Fungos. Bactérias. Vírus.

INTRODUÇÃO

A detecção de patógenos em sementes e outros materiais de propagação vegetal é uma das mais importantes etapas no sistema de produção agrícola e torna-se cada vez mais imprescindível pelos reflexos que produz em termos de garantia de produções e sustentabilidade dessas atividades,

principalmente em países, cuja economia e demanda social dependem, em grande parte, do setor agropecuário.

Por ser a semente um insumo básico para a produção da maioria das espécies vegetais de interesse humano, é a sua qualidade um aspecto que exige, por parte dos sistemas de certificação de qualidade,

maior atenção e um extremo cuidado, por parte dos órgãos controladores desses insumos.

A qualidade sanitária das sementes é, atualmente, o aspecto que mais tem merecido atenção nos sistemas produtivos e no comércio agrícola, considerando-se os reflexos negativos que a associação de

¹Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. PNPd/CAPES/UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: ellennoly@gmail.com

²Eng^a Agr^a, Ph.D., Prof. Tit. UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: machado@ufla.br

³Química, Ph.D., Prof. Tit. UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: antonia@ufla.br

⁴Eng^a Agr^a, D.Sc., Prof. Associado UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: rmagelas@ufla.br

⁵Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66095-100 Belém-PA. Correio eletrônico: keiko@cpatu.embrapa.br

⁶Eng^a Agr^a, Doutoranda UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: anabeatriz.zacaroni@gmail.com

⁷Eng^a Agr^a, D.Sc., Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM - FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: hsrocha2009@gmail.com

patógenos com sementes pode determinar sob diversos ângulos.

O grande número de patógenos, aliado à alta variabilidade e semelhanças morfológicas entre espécies, que se associam às sementes de modo geral é fator complicador para a detecção e identificação correta desses agentes em análises de rotina. Dessa forma, percebe-se que métodos de detecção e de identificação de patógenos, com base em aspectos morfológicos ou outros que são influenciados facilmente por fatores ambientais, não atendem às necessidades dos sistemas de controle de qualidade em nível de rotina. Soma-se a estas dificuldades o fato de que o atendimento à demanda de um grande volume de análises, em curtos períodos, faz com que o uso de alguns testes de sanidade cause maiores problemas de natureza logística aos produtores e usuários de sementes em geral.

Dentre as estratégias que podem ser lançadas para a detecção e identificação mais rápida e precisa de determinados patógenos, com grandes semelhanças morfológicas ou que apresentam dificuldades de desenvolvimento nos testes biológicos já conhecidos, está o uso de técnicas moleculares. Por este método, a análise é mais rápida e acurada. O rápido avanço das pesquisas nesse campo já tem disponibilizado um bom número de métodos para alguns patógenos que são transmitidos ou transportados pelas sementes de espécies hospedeiras.

Neste artigo, o foco está voltado para os principais métodos moleculares existentes para a detecção de patógenos dos diferentes grupos taxonômicos, com ênfase em fungos, bactérias e vírus. Para mais detalhes sobre métodos de detecção de patógenos em sementes, sob a égide dos Programas de Certificação no Brasil, recomenda-se consultar o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009).

DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS EM SEMENTES

Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem, de modo geral, as mesmas regras adotadas pela In-

ternational Seed Testing Association (Ista) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzirem estruturas, ou alguns metabólitos, que permitam a sua identificação.

Os métodos utilizados na detecção de fungos em sementes baseiam-se em diferentes aspectos, que variam desde análise visual da amostra e da fração impura, exame microscópico da suspensão proveniente da lavagem de sementes, exame de embriões, método do rolo de papel, incubação em meios de cultura padronizados ou meios semisseletivos e incubação em substrato de papel de filtro (*blotter test*).

Esses métodos, apesar de padronizados e usados em testes de rotina, apresentam limitações, quando existe a necessidade da diagnose em nível de algumas espécies, subespécies, variedades e raças. Um bom exemplo é a dificuldade de distinção entre os agentes da antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) do algodoeiro. Embora sejam relatadas diferenças entre os dois agentes na literatura, na prática, muitas vezes, não é possível discernir com clareza quais os patógenos associados às sementes, já que existe grande variabilidade até mesmo entre os isolados desses fungos.

Somam-se a essa dificuldade outras, como a demora na obtenção de resultados para alguns patossistemas e a dificuldade de distinção, quando outros organismos, também associados às sementes, apresentam maior potencial de competição. A identificação correta das espécies do complexo *Stenocarpella*, causadoras da podridão do colmo e da espiga do milho, por exemplo, só é possível com a formação dos picnídios e esporos que os identificam. Para isso, é necessária a incubação das sementes por 15 dias. Durante esse tempo, o aparecimento de outros organismos pode comprometer a correta identificação daquelas espécies.

Em relação a outros patossistemas, inúmeras dificuldades ainda constituem desafio para as pesquisas em patologia de sementes. Muitas espécies de fungos proximamente relacionadas encontram similaridade entre

suas características morfológicas, dificultando a identificação precisa, como é o caso de espécies de *Phomopsis* em sementes de soja, *Drechslera* em sementes de arroz e trigo e *Fusarium* em sementes de feijão e algodão.

A correta diagnose dos patógenos é, portanto, uma das ferramentas básicas no controle de doenças transmitidas por sementes. Diferentes trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos, investigando metodologias que auxiliem na correta detecção, na identificação e até na quantificação de patógenos utilizando diferentes métodos, combinados entre si ou não.

A Biologia Molecular veio ao encontro dos interesses da fitopatologia, disponibilizando ferramentas que auxiliam na diagnose e identificação de patógenos que apresentam dificuldades por métodos tradicionais. Essas técnicas, por meio das diferenças existentes entre sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA), permitiram o avanço no conhecimento de genomas de espécies, subespécies e até raças diferentes com alto grau de especificidade.

Inicialmente, os trabalhos de diagnose de fungos em sementes consistiam no isolamento dos fungos dessas sementes e a sua detecção era realizada em meios de cultura, já que uma das maiores dificuldades para a detecção nas sementes seria a presença de inibidores. Muitas espécies podem conter naturalmente em suas sementes substâncias como taninos, componentes fenólicos e carboidratos capazes de inibir ou influenciar a atuação da enzima Taq polimerase utilizada na reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR). Nesse caso, há redução da sensibilidade, dificultando as ampliações das regiões estudadas e gerando resultado falso-negativo, quando a extração é feita diretamente de sementes maceradas. Para reduzir esse efeito são recomendadas etapas adicionais para a extração de DNA e purificação. São utilizadas substâncias como clorofórmio e fenol para a precipitação de alguns desses inibidores, ou o uso de *kits* comerciais, que têm-se mostrado como um grande facilitador da técnica, já que agiliza o processo

de automação para a extração de DNA e minimiza a ação dos inibidores.

Apesar das dificuldades apresentadas, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para a detecção de fungos diretamente nas sementes. No Quadro 1 estão listados alguns trabalhos de publicação recente.

Nos últimos 30 anos, o avanço em estudos de genômica e bioinformática tem revolucionado e aproximado ainda mais o desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico em suporte aos métodos clássicos, tornando a detecção de patógeno mais rápida, acurada e sensível. O foco dessas técnicas baseia-se no estudo de regiões do genoma dos patógenos, a fim de identificar sequências específicas no DNA. Os marcadores moleculares como *random amplified polymorphic* (RAPDs), *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP), microssatélites, dentre outros, têm sido largamente usados em estudos de diferenciação de patógenos.

Da mesma forma, sequências já conhecidas, como por exemplo genes do DNA ribossomal (rDNA), que são facilmente obtidos do genoma de fungos, têm sido avaliadas. Os rDNAs codificam os RNAs ribossomais (rRNAs) e são relativamente conservados entre os fungos, além de aparecerem repetidos centenas de vezes no genoma fúngico. Estão incluídas as porções 18S, 5.8S e 28S, separadas por regiões espaçadoras conhecidas como *internal transcribed spacer region* (ITS) (Fig. 1). Apesar de essas regiões não serem traduzidas em proteínas, possuem um papel importante no desenvolvimento das funções do mRNA, com sequências que variam entre espécies, demonstrando ser promissoras para a construção de *primers* (pequenas sondas de oligonucleotídeos) específicos.

Os estudos de filogenia também complementam os de variabilidade, além da possibilidade de identificação da origem de isolados e análise de divergência genética entre grupos. Nesse estudo, além das regiões ITS e *intergenic spacer region* (IGS),

genes que codificam para histonas, fator de alongação - *elongation factor* (EF) e beta tubulina, genes ligados à patogenicidade ou à produção de toxinas também têm sido estudados e podem ser bons candidatos para a construção de *primers*.

Para a detecção de fungos, especificamente em sementes, é necessário que, independente do método adotado, o par de *primers* seja testado quanto à especificidade e otimizado para o máximo de sensibilidade, tanto para a colônia pura de fungos, como em associação com sementes, uma vez que a sensibilidade entre um e outro pode variar. Dombrowski et al. (2006) avaliaram a concentração necessária para a detecção de *Neotyphodium* sp.,

em cultura pura e na cultura associada à semente de aveia, e concluíram que a quantidade necessária para detectar o fungo, quando ele está associado às sementes, é dez vezes maior do que quando está em cultura pura.

A partir de sequências conhecidas é possível a amplificação dos fragmentos por meio da técnica PCR. Para a detecção de patógenos associados às sementes, os fatores já descritos anteriormente devem ser ponderados, de modo que evitem a interferência de inibidores que podem gerar resultados errôneos. Para a patologia de sementes, a técnica de PCR, associada a outras, tem sido utilizada com sucesso para

QUADRO 1 - Exemplos de trabalhos publicados com detecção molecular de patógenos diretamente nas sementes

Patógeno/Hospedeiro	Fonte
<i>Fusarium circinatum</i> (pinus)	Ioss et al. (2009)
<i>Septoria tritici</i> (trigo)	Consolo et al. (2009)
<i>Pyrenophora graminea</i> (cevada)	Justesen, Hansen e Pinnschmidt, (2008)
<i>Stenocarpella</i> sp. (milho)	Barrocas (2008)
<i>Botrytis</i> spp. (cebola)	Chilvers et al. (2007)
<i>Rhynchosporium secalis</i> (cevada)	Ríos, Fernández e Carmona (2007)
<i>Plasmopara hastedii</i> (girassol)	Ioos et al. (2007)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i> (manjerição)	Pasquali et al. (2006)
<i>Neotyphodium</i> (centeio)	Dombrowski et al. (2006)
<i>Magnaporthe grisea</i> (arroz)	Chadha e Gopalakrishna (2006)
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> (soja)	Vechiato, Maringoni e Martins (2006)

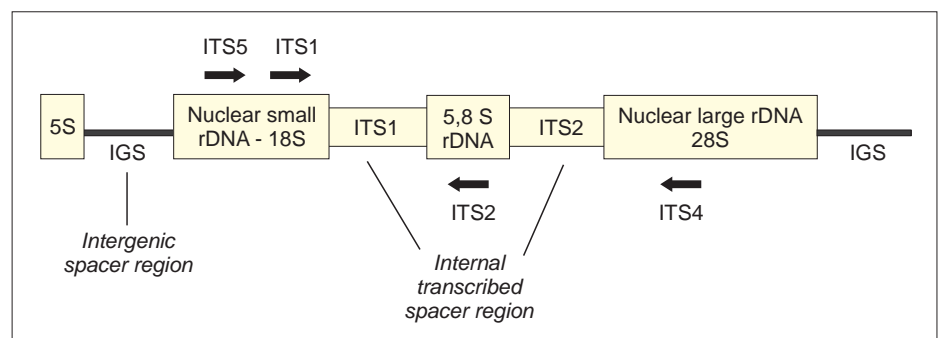


Figura 1 - Esquema representativo do DNA ribossomal (rDNA) mostrando a localização de primers padrão utilizados na PCR

NOTA: PCR - Polymerase chain reaction.

o diagnóstico de espécies que apresentam difícil distinção por meio de marcadores morfológicos, fungos com reduzida esporulação, que produzem micélio estéril e os suprimidos por fungos de crescimento mais rápido, além de estimar o potencial toxicológico dos fungos em sementes.

Apesar da grande sensibilidade da técnica de PCR convencional, os trabalhos envolvendo a diagnose de patógenos associados às sementes encontram obstáculos, quando estão com baixos níveis de infestação/infecção. Para contornar o problema utiliza-se a Bio-PCR, que tem o objetivo de enriquecer a biomassa do fungo na semente, para aumentar a sensibilidade da técnica e absorção ou diluição de componentes inibidores durante o período de incubação. A Bio-PCR envolve uma etapa de incubação das sementes, em condições de alta umidade relativa, por períodos que podem variar de cinco a sete dias ou mais, dependendo do organismo-alvo. Apesar do acréscimo de mais uma etapa ao processo, para muitos fungos torna-se indispensável para uma diagnose confiável. Para o diagnóstico de *Magnaporthe grisea* em sementes de arroz infestadas, é necessária a sua incubação em meio batata dextrose ágar (BDA), por 48 horas, a 25°C, sob agitação constante (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006). Vechiato, Maringoni e Martins (2006) utilizaram o tempo de sete dias de incubação prévia para a detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja.

A Bio-PCR possui vantagens sobre a PCR convencional, incluindo o aumento de sensibilidade e a detecção somente de células viáveis, mas possui desvantagens, como o aumento do tempo para diagnose e a necessidade de determinação do tempo de enriquecimento. O longo tempo de incubação pode permitir o crescimento de organismos saprófitas, que podem interferir na detecção do organismo-alvo (DOMBROWSKI et al., 2006).

É importante ainda salientar que a PCR

convencional indica somente presença ou ausência do patógeno, o que pode ser um fator limitante para a patologia de sementes, quando existe a necessidade de determinar a incidência do patógeno no lote. Por outro lado, para patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, cujo índice de tolerância em sementes é zero, o teste pode ser recomendado. Para outros patossistemas, o uso de PCR convencional pode funcionar como um primeiro *screening* para informar se o lote está infectado ou não, permitindo rapidamente a comercialização dos lotes sadios. Para os lotes considerados infectados, outras técnicas complementares podem indicar a incidência do patógeno.

Mesmo com a utilização da PCR convencional, a sensibilidade da técnica ainda permite detectar lotes com baixos níveis de infecção, conforme pode ser observado na Figura 2.

A introdução da PCR em tempo real facilitou o desenvolvimento de trabalhos de quantificação dos organismos-alvo de detecção. Durante o desenvolvimento do método, é medido o acúmulo dos produtos da PCR, o que permite sua quantificação. Quando comparado com a PCR convencional, apresenta vantagens como maior rapidez, redução do risco de contaminações cruzadas, eliminação da eletroforese para determinar os resultados da PCR, quantificação do patógeno, mesmo em baixíssimas quantidades, o que em patologia de sementes torna-se de grande valia, uma vez que determina o nível de infecção de um lote de sementes. Alguns trabalhos conseguem a quantificação de até um esporo por semente

contaminada (CHILVERS et al., 2007). Essas vantagens podem ser promissoras para a detecção de patógenos, eliminando muitas barreiras para a sua detecção em sementes.

Normalmente, as técnicas de análise molecular para fungos são desenvolvidas, utilizando culturas puras para identificar espécies ou genótipos dentro de populações. Para patologia de sementes, a utilização de quaisquer técnicas moleculares tem sua aplicação prática em um sistema de análises em escala, se houver o seu desenvolvimento para a detecção direta na semente, já que pouco se ganha em termos de diagnose, quando existe a necessidade de isolamento do patógeno em cultura pura para posterior detecção.

Muitos desafios ainda existem para a detecção de fungos em sementes. Neste sentido, percebe-se que o uso das ferramentas moleculares representa um grande avanço e pode contribuir de maneira mais precisa e rápida para a diagnose preventiva desses e de outros microrganismos patogênicos, em associação com sementes de plantas cultivadas. Dessa forma, o controle de importantes doenças pode ser alcançado com sucesso por meio do manejo sanitário preventivo, em que o uso de sementes sadias ou tratadas é uma alternativa eficaz e de custo relativamente baixo.

DETECÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EM SEMENTES

A associação com as sementes de seus hospedeiros é um dos mecanismos de

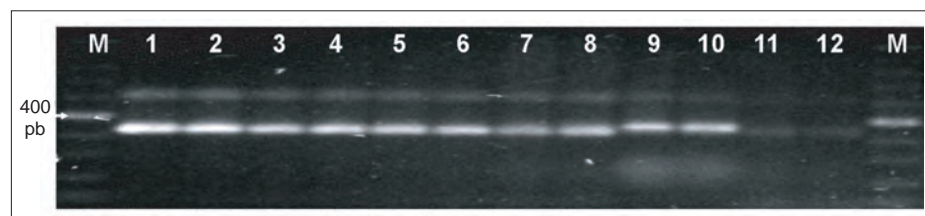


Figura 2 - Amplificação do DNA genômico de *Stenocarpella maydis* em diferentes níveis de infecção em sementes de milho

FONTE: Barrocas (2008).

NOTA: Linha M= 100-bp DNA ladder; 1-2=100%; 3-4=20%; 5-6= 10%; 7-8=2%; 9-10=1%; 11-12=0%.

M – Marcador de peso molecular; bp – Pares de base.

sobrevivência desenvolvido pelas fitobactérias e permite o seu transporte e transferência de inóculo no tempo e no espaço (OLIVEIRA; MOURA; SOUZA, 2005). Quando se mencionam bactérias em associação com sementes, isso pode significar tanto a bactéria infectando a semente alojada em seus tecidos como, simplesmente, infestando-a, isto é, a bactéria aderida na semente, sem causar infecção.

Com o avanço da biotecnologia, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, com o intuito de rapidamente diagnosticar e caracterizar o patógeno. Tais técnicas baseiam-se em métodos sorológicos, na amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse, no desenvolvimento de sondas fluorescentes e na citometria de fluxo.

Vários métodos sorológicos são usados para identificar e detectar bactérias fitopatogênicas em sementes, desde os mais simples, como aglutinação em lâminas, até os mais complexos, como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunofluorescência (IF).

Trujillo e Saettler (1979) compararam a análise combinada de meio semisseletivo e teste de dupla difusão com o teste de patogenicidade padrão. De 175 amostras testadas, 61 apresentaram reações positivas pelo teste padrão e 90, pelo teste de dupla difusão e meio semisseletivo.

O teste ELISA baseia-se na ocorrência do complexo antígeno-anticorpo, por meio do desenvolvimento enzimático rápido de um produto colorido distinto. O teste foi utilizado com sucesso na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, *X. campestris* pv. *campestris* em folhas de repolho e *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* em tubérculos de batata.

Na imunofluorescência, o anticorpo é conjugado com uma sonda fluorescente, geralmente isotiocianato de fluoresceína –

fluorescein isothiocyanate (FITC), a qual pode ser visualizada em lâminas, em microscópio de fluorescência, devidamente equipado e apropriado. Células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *malvacearum* foram identificadas por esta técnica em sementes de feijão e algodão. O sucesso desse método, bem como o teste ELISA, depende da especificidade dos anticorpos, que devem ser testados antes de serem usados e que, preferencialmente, não ocorram reações cruzadas com outras bactérias presentes na amostra. A sensibilidade do método permite a detecção de 10^3 UFC/mL e oferece ainda a possibilidade de estudar a morfologia das células em combinação com reações sorológicas⁸.

A amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse por meio da PCR, utilizando *primers* específicos, caracteriza-se como um método rápido, sensível, preciso e específico de detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades e associadas à alta população saprofítica. Outros métodos derivados da técnica, como a Bio-PCR desenvolvida por Schaad et al. (1995), que consiste na análise das colônias bacterianas primeiramente obtidas em meio seletivo, são utilizados com sucesso na detecção.

Como vantagem, a técnica de Bio-PCR permite a identificação mais rápida das colônias suspeitas, obtidas nos meios seletivos, do que quando se utilizam os testes bioquímicos ou a inoculação em planta hospedeira. Em relação a PCR convencional, as vantagens são as mesmas mencionadas no tópico anterior.

Como desvantagem, as técnicas sorológicas e de PCR não fornecem informações sobre a viabilidade dos patógenos, exceto a Bio-PCR, quando amostras naturais são usadas; também não permitem a detecção de bactérias diretamente nos extratos de sementes, por causa da presença de substâncias inibidoras da reação, e não são quantitativas.

Recentemente, o uso de sondas fluorescentes e em combinação com o citômetro de fluxo surgiu como método rápido, preciso e sensível para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos.

Sonda fluorescente é um fluorocromo capaz de localizar uma região específica em uma amostra biológica ou de responder a um estímulo específico. Essas sondas têm a habilidade de explorar diferentes propriedades da célula, tais como: atividade enzimática, permeabilidade da membrana citoplasmática, potencial da membrana citoplasmática, atividade respiratória, conteúdo relativo de DNA e gradiente de pH. Existe um grande número de sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos. As mais utilizadas estão descritas no Quadro 2.

O sucesso da técnica na avaliação da viabilidade e detecção de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi relatado por Chitarra et al. (2006) e Tebaldi (2005) em sementes de tomate, brássicas e feijão.

Embora seja uma técnica relativamente nova, o uso de sondas fluorescentes, em combinação com o citômetro de fluxo, apresenta grande potencial. Deve ser explorado na fitopatologia, particularmente na bacteriologia, em que os métodos de detecção e avaliação da viabilidade apresentam limitações, pois a técnica permite obter informações quantitativas sobre o número total de células presentes na amostra, bem como a porcentagem de células viáveis, em milhares de células analisadas num curto período.

Diversas são as técnicas disponíveis para a detecção de bactérias em sementes, ficando a critério de cada laboratório a escolha da mais adequada ao patossistema analisado e às condições disponíveis para a execução dos trabalhos. Ressalta-se que, em muitos casos, é necessária a aplicação de mais de uma técnica para alcançar um diagnóstico preciso.

⁸UFC - Unidade formadora de colônia.

QUADRO 2 - Sondas fluorescentes mais usadas em combinação com o citômetro de fluxo para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos

Atividade enzimática	Potencial de membrana	Ácido nucleico	Imunorreagente
FDA	Rh 123	PI	FITC
cFDA	BOX	DAPI	
cF	DiBAC ₄ (3)	Sytox Green	
cFSE		EB	
Calcein AM		Syto 9	
ChemChrome B			
BCECF-AM			
DiOC ₆ (3)			

FORNTE: Tebaldi (2005).

NOTA: FDA - fluorescein diacetate; cFDA - 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate; cF - carboxyfluorescein; cFSE - 5-(and 6-)carboxyfluorescein succinimidyl ester; Calcein AM - calcein acetoxymethyl ester; BCECF-AM - 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester; DiOC₆(3) - 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; Rh 123 - rhodamine 123; BOX - bisoxonol; DiBAC₄(3) - bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol; PI - propidium iodide; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole; EB - ethidium bromide; FITC - fluorescein isothiocyanate.

DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS EM SEMENTES

Ao contrário de outras doenças causadas por patógenos como fungos, bactérias e nematoides, as viroses são de mais difícil controle, por não existir um produto químico capaz de interromper ou mesmo impedir o desenvolvimento da doença na planta. Assim, as medidas de controle devem ser de caráter preventivo, visando impedir ou retardar o máximo possível a chegada do vírus na planta. Nesse contexto, o uso de unidades propagativas, constituídas por sementes verdadeiras ou partes da planta, como bulbos, borbulhas, tubérculos e outros, comprovadamente livres de vírus, é de grande importância e representa o princípio básico que deve ser observado para evitar uma epidemia no campo.

A determinação da sanidade das unidades propagativas requer o uso de técnicas de diagnose sensíveis, eficientes e de alta repetibilidade, que não ofereçam margens às dúvidas, pois o descarte de um lote de sementes tem várias implicações econômicas e sociais, onde o produtor é o principal

alvo, de modo que uma decisão equivocada pode trazer consequências desastrosas para todo o sistema de defesa fitossanitária envolvido.

Quando comparadas às outras unidades propagativas, a detecção de vírus nas sementes verdadeiras é bem mais difícil, por uma série de motivos. O primeiro deles está relacionado com a concentração de partículas virais nas sementes, que é geralmente baixa, exigindo o emprego de métodos de alta sensibilidade. A escassez de partículas, aliada ao seu tamanho, torna a sua visualização direta ao microscópio eletrônico praticamente impossível. Além disso, os vírus nem sempre induzem sintomas visíveis a olho nu nas sementes e, quando esses sintomas estão presentes, na maioria das vezes não estão correlacionados com a sua transmissão. Finalmente, a porcentagem de transmissão dos vírus pelas sementes é, de modo geral, baixa e bastante variável, pois diversos fatores podem influenciar na proporção de sementes infectadas produzidas por uma planta doente, como o vírus, a estirpe e a própria planta hospedeira.

Desse modo, a escolha do método a ser empregado para diagnose dos vírus em sementes depende de uma série de eventos, como o número de amostras a ser analisado, o tipo de vírus e a sua provável concentração nas sementes e a infraestrutura do laboratório que irá processar as análises. Até os anos 80, as opções de escolha eram bastante limitadas, e tinham como método mais sofisticado o sorológico ELISA que foi desenvolvido por Clark e Adams (1977), na sua primeira versão *double antibody sandwich* (DAS). Apesar de ser um método bastante sensível e de fácil aplicabilidade, possui como limitação o fato de não poder ser aplicado para discriminar estirpes virais estreitamente relacionadas nem para viroides, uma vez que esses não possuem capa proteica para atuar como antígeno.

Com a evolução das técnicas de manipulação e estudo de ácidos nucleicos, na Biologia Molecular, surgiu a técnica de hibridização com cDNA e, pouco tempo depois, a de PCR e *reverse transcription-PCR* (RT-PCR), para vírus, cujo ácido nucleico é o ácido ribonucleico (RNA).

Hibridização com ácido nucleico complementar

A hibridização com cDNA foi desenvolvida pela necessidade de encontrar uma técnica eficiente para a detecção do *Potato spindle tuber viroid*. Pouco depois, tornou-se popular também para a detecção de diversos vírus em plantas, sendo empregada tanto para vírus de DNA, com fita simples ou dupla, como para vírus de RNA.

Seu processamento baseia-se na fixação do ácido nucleico, extraído da planta ou da parte da planta que se quer analisar, em um suporte sólido, geralmente uma membrana de náilon ou de nitrocelulose, colocando-a em contato com a sonda que contém a sequência de bases complementares a um segmento genômico específico, que caracteriza o patógeno que se quer identificar. O único problema é que essa reação de hibridização não pode ser identificada, se não houver a incorporação de

um agente marcador na sonda empregada. Embora sondas de cRNA e de cDNA possam ser empregadas, as de cDNA são as preferidas, porque os híbridos RNA/DNA são mais estáveis.

Os primeiros marcadores empregados foram do tipo isótopos radioativos (fósforo radioativo – ^{32}P) ou enxofre radioativo – ^{35}S), o que constitui uma limitação, pois, além do perigo que uma exposição constante a material radioativo proporciona, poucos laboratórios são equipados e licenciados para trabalhar com radioatividade no Brasil.

O desenvolvimento de marcadores não radioativos, como a biotina e a digoxigenina, abriu novas perspectivas para a popularização dessa técnica. A maior dificuldade foi encontrada na mão-de-obra qualificada geralmente exigida para a realização da técnica, e na ocorrência de falsos-positivos. Figueira, Domier e Darcy (1997) conseguiram simplificar a técnica de hibridização, utilizando sondas marcadas com biotina, diminuindo o seu tempo de processamento e eliminando os falso-positivos na detecção do *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) - PAV-IL.

A sensibilidade dessa técnica varia com o tipo de vírus que se quer identificar, o tipo de sonda e o conjunto de enzimas e substratos empregados. Borja e Ponz (1992) detectaram *Cherry leafroll virus* em 160 μg de tecido infectado e em menos de 1 ng de RNA viral purificado, utilizando sondas cromogênicas, e, em 30 μg de tecidos e 250 pg de vírus purificado, quando utilizou sondas quimioluminescentes. Figueira, Domier e Darcy (1997) detectaram o BYDV em 12,5 a 50 ng de tecidos infectados e 0,5 a 2 ng de vírus purificado. Maior sensibilidade foi encontrada por Hu e Wong (1998), que detectaram 50 pg de *Cymbidium mosaic virus* e 250 pg de *Odontoglossum ringspot virus*, respectivamente⁹. Mesmo constatada a sensibili-

dade, essas técnicas não têm sido muito empregadas para diagnose de vírus em sementes verdadeiras, sendo a sorológica ELISA bem mais popular e mais utilizada em testes de rotina.

PCR e RT-PCR

Dentre as técnicas moleculares a PCR (para vírus de DNA) e a RT-PCR são as mais populares, pela sensibilidade, especificidade e facilidade de realização em laboratório. Desde a implementação dessas técnicas, no final da década de 80, têm sido intensivamente empregadas para diagnose de vírus e de viroides e também para distinção entre estirpes estreitamente relacionadas. Essas técnicas baseiam-se no uso de um par de oligonucleotídeos complementares a uma dada região do genoma viral, que são desenhados para gerar um fragmento de DNA de tamanho pré-determinado, com o auxílio de uma enzima termoestável, como a Taq DNA polimerase. Quando o vírus é de RNA, a reação de PCR é feita com o DNA complementar ao RNA viral (RT-PCR), obtido com o auxílio de uma transcriptase reversa.

Diversas variações dessas técnicas têm sido empregadas. Dentre elas podem ser citadas: *nested* PCR, *multiplex* PCR, *fluorescence* RT-PCR e *competitive fluorescent* PCR e combinações com outras técnicas como *immuno capture* PCR e RFLP.

Nested PCR

Essa técnica geralmente é empregada, quando o vírus encontra-se em baixas concentrações na planta ou quando inibidores da DNA polimerase podem estar presentes nos tecidos vegetais a serem analisados. Nesse caso, a PCR é realizada em duas etapas. Na primeira, geralmente empregam-se oligonucleotídeos degenerados ou randômicos, para aumentar a primeira reação de PCR, e, na segunda, emprega-se uma alíquota do DNA obtido para a segunda amplificação.

Multiplex PCR

O objetivo do *multiplex* PCR é detectar diferentes espécies de vírus ou estirpes do mesmo vírus em uma única reação. No caso do *Potato virus Y* (PVY), por exemplo, diversas estirpes e variantes genéticas de uma mesma estirpe podem ocorrer simultaneamente, de modo que o *multiplex* PCR torne-se uma importante alternativa que permita a detecção de mais de uma estirpe/variante numa mesma reação.

RT-PCR fluorescente

Nesse caso, dois oligonucleotídeos flanqueiam a sequência de interesse e um terceiro oligonucleotídeo com marcação fluorescente se anela entre eles. Quando os dois primeiros oligonucleotídeos são estendidos pela DNA polimerase, o terceiro é liberado e a fluorescência ocorre. Uma variação desse método é a PCR competitiva, na qual se utilizam diversos pares de oligonucleotídeos com diferentes marcadores fluorescentes, para detectar infecções múltiplas, com diferentes espécies/estirpes de vírus.

IC-RT-PCR

A técnica de RT-PCR com imunocaptura (*immunocapture*-RT-PCR), para vírus de RNA, e IC-PCR, para vírus de DNA, combina a captura do vírus pelo antissoro específico, que pode ser policlonal, com a técnica PCR. Para isso são empregados microtubos especiais, com capacidade de adsorver as moléculas do anticorpo, da mesma forma que ocorre nas microplacas empregadas para o teste ELISA. Inicialmente é feita a cobertura dos tubos com o anticorpo específico e depois o extrato clarificado da planta é então adicionado a esse tubo, que é incubado por um período apropriado, para que as partículas virais sejam capturadas. Após a eliminação do extrato foliar e a lavagem, inicia-se a transcrição reversa e, em seguida, a amplificação do genoma viral, que é feita no

⁹ μg – Micrograma; ng – Nanograma; pg – Picograma.

mesmo tubo (IC-RT-PCR). Quando o vírus tem como ácido nucleico o DNA, após a captura das partículas, a reação de PCR já pode ser realizada (IC-PCR). Basta adicionar a estes os componentes da reação, que incluem os *primers* também específicos, a enzima Taq DNA polimerase etc. Esses tubos são apropriados para ser colocados diretamente no termociclador para o processo de amplificação. Pode-se empregar mais de um tipo de antissoro ao mesmo tempo, seguido da utilização de mais de um par de *primers*, o que possibilita a detecção de diversos vírus na mesma reação (*multiplex immunocapture* RT-PCR ou PCR). Essa técnica tem sido considerada como bastante sensível, além de evitar a ocorrência de falso-positivos.

RFLP

Trata-se também de uma combinação de técnicas, em que o produto da PCR é submetido a enzimas de restrição, o que permite detectar pequenas diferenças na sequência genômica de isolados virais distintos, pela obtenção de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos.

Microarranjos

Apesar de não serem muito utilizados, os microarranjos têm-se tornado bastante populares. Alguns autores têm destacado as vantagens de seu uso na diagnose de vírus (BYSTRICA et al., 2005; BOONHAM; TOMLINSON; MUMFORD, 2007; ABDULLAHI; ROTT, 2009). Nessa técnica, o RNA é extraído da planta sadia (controle) e da doente, transcrito em cDNA incorporando nucleotídeos marcados com fluorescência (Cy 3 para a planta sadia e Cy 5 para o material em teste). O cDNA é incorporado e hibridizado ao arranjo (previamente disposto em um suporte de vidro, membrana ou polímero). Após a hibridização, esse suporte é lavado e escaneado para detectar os pontos onde ocorreu a hibridização.

Outras técnicas modernas

Com o avanço das técnicas modernas em Biologia Molecular, já se fala na pró-

xima geração de sequenciamento genético, acoplada à metagenômica, como uma nova ferramenta com potencial para a diagnose de vírus (ADAMS et al., 2009). Certamente, novas outras técnicas surgirão, em atendimento à demanda crescente de alimentos e à necessidade de controle gerada pela intensa circulação de materiais vegetais entre países, ocasionando um constante risco de veiculação e introdução de patógenos indesejáveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço da ciência tem permitido o desenvolvimento constante de novas técnicas ou combinações de técnicas que visam à identificação e à caracterização de patógenos em vários níveis taxonômicos. Como é do conhecimento de todos, a sanidade das sementes e das partes propagativas das plantas é um fator fundamental para evitar a disseminação de patógenos e a sua introdução em áreas livres de doenças. Portanto, a aplicação das técnicas moleculares na Patologia de Sementes representa um forte impulso para essa área do conhecimento e com possibilidades ilimitadas de crescimento.

REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, I.; ROTT, M. Microarray immunoassay for the detection of grapevine and tree fruit viruses. *Journal of Virological Methods*, v.160, n.1/2, p.90-100, Sept. 2009.

ADAMS, I.P. et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, v.10, n.4, p.537-545, Jul. 2009.

BARROCAS, E.N. *Efeitos de Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 2008. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *The Annual Review of Phytopathology*, v.45, p.307-328, Sept. 2007.

BORJA, M.J.; PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of *Cherry leafroll virus*. *Journal of Virological Methods*, v.36, n.1, p.73-83, Jan. 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009. 200p.

BYSTRICKA, D. et al. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, v.128, n.1/2, p.176-182, Sept. 2005.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seed using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, n.5, p.1147-1153, May 2006.

CHILVERS, M.I. et al. A real-time, quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Disease*, St. Paul, v.91, n.5, p.599-608, May 2007.

CHITARRA, L. G. et al. The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.31, n.4, p.349-356, jul./ago. 2006.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v.34, n.3, p.475-483, 1977.

CONSOLO, V.F. et al. A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology*, v.38, n.3, p. 222-227, Apr. 2009.

DOMBROWSKI, J.E. et al. A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. *Crop Science*, Madison, v.46, n.3, p.1064-1070, 2006.

FIGUEIRA, A.R.; DOMIER, L.L.; D'ARCY, C.J. Comparison of techniques for detection of *Barley yellow dwarf virus*-PAV-IL. *Plant Disease*, v.81, n.11, p.1236-1240, Nov. 1997.

HU, W.W.; WONG, S.M. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potyvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) in orchids. *Journal of Virological Methods*, v.70, n.2, p.193-199, 1998.

IOOS, R. et al. Development of a PCR test

to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, St. Paul, v.56, n.2, p.209-218, Apr. 2007.

IOOS, R. et al. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. **Phytopathology**, St. Paul, v.99, n.5, p.582-590, May 2009.

JUSTESEN, A.F.; HANSEN, H.J.; PINNSCHMIDT, H.O. Quantification of *Pyrenophora graminea* in barley seed using real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.122, n.2, p.253-263, 2008.

OLIVEIRA, J.R.; MOURA, A.B.; SOUZA, R.M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p.113-134.

PASQUALI, M. et al. Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed roots. **Journal of Phytopathology**, v.154, n.10, p.632-636, Oct. 2006.

RÍOS, M.O.; FERNÁNDEZ, P.; CARMONA, M. Detection of *Rhynchosporium secalis* in barley seeds from Argentina through polymerase chain reaction technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.415-418, set./out. 2007.

SCHAAD, N.W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p.243-248, 1995.

TEBALDI, N. D. **Deteção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crescimento bacteriano comum**. 2005. 102p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TRUJILLO, G.; SAETTLER, A.W. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. **Journal of Seed Technology**, v.4, n.1, p.35-41, 1979.

VECHIATO, M.H.; MARINGONI, A.C.; MARTINS, E.M.F. Desenvolvimento de iniciadores para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.2, p.161-169, Apr./June 2006.

Veja no próximo

INFORME AGROPECUÁRIO

Tecnologias para a agricultura familiar: produção vegetal

- Plano de negócios para a agricultura familiar
- Manejo da fertilidade do solo no agroecossistema
- Insumos alternativos para o controle de pragas e doenças
- Produção de arroz, milho, feijão e hortaliças na agricultura familiar
- Seringueira: alternativa para geração de renda
- Produção de alimentos na agroindústria familiar com foco na higiene

Leia e Assine o INFORME AGROPECUÁRIO
(31) 3489-5002 - publicacao@epamig.br

Aspectos legais da proteção de cultivares transgênicas

Waldênia de Melo Moura¹

Paulo César de Lima²

Ignácio Azpiázú³

Josiane dos Santos⁴

Felipe Rodrigues Reigado⁵

Resumo - As cultivares transgênicas são obtidas pela introdução de genes, oriundos de diferentes espécies e reinos, diretamente no genoma das plantas. Se por um lado essas cultivares representam um grande avanço para o melhoramento genético, por outro podem contribuir para um verdadeiro monopólio no mercado de sementes, em decorrência dos sistemas legais de proteção vigentes. O grande interesse em desenvolver cultivares transgênicas diz respeito ao patenteamento de processos e produtos biotecnológicos pela Lei de Propriedade Industrial (LPI), em que se inserem as patentes. Teoricamente, o detentor da patente de um gene transgênico poderia controlar todas as cultivares nas quais esse gene fosse introduzido. Uma das formas para evitar o apropriação de cultivares por detentores de patentes de gene foi a instituição, no Brasil, da Lei de Proteção de Cultivares (LPC). Ambas as leis conferem aos detentores de patentes e aos titulares das cultivares o direito de receber *royalties* sobre a utilização e/ou comercialização do material protegido ou patenteado. Portanto, as cultivares transgênicas, de certa forma, podem ser resguardadas por duas leis, que, algumas vezes, têm gerado conflitos quanto à sua aplicabilidade. Entretanto, somente podem ser patenteados os processos e produtos biotecnológicos que envolvam organismos geneticamente modificados e nunca a cultivar transgênica obtida. Esta, por sua vez, será protegida apenas por meio da LPC após a emissão de parecer técnico conclusivo emitido pela CTNBio. E, para que as sementes sejam comercializadas no País, é necessário registrá-las no Registro Nacional de Cultivares (RNC).

Palavras-chave: Culturas transgênicas. Lei de Propriedade Industrial. Lei de Proteção de Cultivares. *Royalties*.

INTRODUÇÃO

O uso da biotecnologia na obtenção de plantas transgênicas trouxe uma nova dimensão ao melhoramento genético de plantas, desde o rompimento da barreira de cruzamentos, inclusive entre espécies de diferentes reinos, até a possibilidade de reduzir o tempo de obtenção de novas cul-

tivares. Esse avanço tecnológico apresenta não só inúmeras vantagens, mas também desvantagens e tem gerado polêmicas no mundo inteiro, sendo discutidos desde os riscos da utilização dessas cultivares para a saúde humana, até os eventuais impactos que possam provocar ao meio ambiente. Por trás dessa polêmica, existem

interesses econômicos, já que empresas e países disputam o monopólio dessas novas tecnologias por meio de patentes e do mercado de sementes. Apesar de todo o alvoroço e repúdio de alguns países, principalmente os europeus, o plantio de cultivares transgênicas, principalmente soja, milho e algodão, vem crescendo de forma

¹Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG ZM, Caixa Postal 216, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: waldenia@epamig.ufv.br

²Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG ZM, Caixa Postal 216, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: plima@epamig.ufv.br

³Eng^a Agr^a, D.Sc., Bolsista CBP&D-Café/U.R. EPAMIG ZM, Caixa Postal 216, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: aspiazu@gmail.com

⁴Eng^a Agr^a, B.S., Bolsista CBP&D-Café/U.R. EPAMIG ZM, Caixa Postal 216, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: josisantos22@bol.com.br

⁵Eng^a Agr^a, B.S., Bolsista CBP&D-Café/U.R. EPAMIG ZM, Caixa Postal 216, CEP 36570-000 Viçosa-MG. Correio eletrônico: felipe.reigado@bol.com.br

substancial em diversos países, como nos Estados Unidos, Canadá, China, Argentina e Brasil. As cultivares transgênicas despertam grandes interesses econômicos para o mercado de sementes, em decorrência dos atuais sistemas de proteção vigentes. Estes sistemas possibilitam a proteção de cultivares e as patentes de processos e produtos biotecnológicos relacionados com o desenvolvimento dessas cultivares, por meio da Lei de Proteção de Cultivares (LPC) e da Lei de Propriedade Industrial (LPI), respectivamente. Essas duas leis são distintas, embora exista uma interface entre ambas, quando se trata de cultivares transgênicas. Entretanto, somente podem ser patenteados os processos e produtos biotecnológicos que envolvam organismos geneticamente modificados, enquanto que a cultivar transgênica só poderá ser protegida pela LPC, após a emissão de parecer técnico conclusivo emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Portanto, é de fundamental importância que em programas de melhoramento, que visam à obtenção de cultivares transgênicas, utilizando-se processos ou produtos biotecnológicos patenteados, sejam devidamente realizados contratos de parcerias, registrados em cartórios e averbados no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Com os sistemas legais de proteção, as empresas públicas podem adquirir novas fontes de recursos para a pesquisa, uma vez que estes estão cada vez mais escassos no País. Há também maior competitividade entre os setores público e privado e, com isso, espera-se maior produtividade e qualidade de produtos para o consumidor. É visível o grande interesse do setor privado na área de melhoramento genético, o que pode ser comprovado pelo grande número de cultivares protegidas, fusões de empresas e aquisições de bancos de germoplasma, com crescentes números de depósitos de patentes de genes transgênicos e de processos biotecnológicos associados aos organismos geneticamente modificados (OGMs). Nesse contexto,

este artigo tem como objetivo retratar aspectos importantes dos sistemas legais de proteção que envolvem as cultivares transgênicas.

PROTEÇÃO DE CULTIVARES VERSUS TRANSGÊNICOS

A Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997 (PINHEIRO, 1997), foi regulamentada pelo Decreto nº 2.366, de 5 de novembro de 1997 (BRASIL, 1997). Desde maio de 1999, a proteção de cultivares, no Brasil, é feita em atendimento a essa lei e aos normativos da Ata de 1978 da Convenção da União Internacional para Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV). Uma vez que o Brasil tornou-se membro da UPOV, foi possível proteger cultivares estrangeiras de países membros da UPOV, no Brasil, e vice-versa. A proteção de cultivares assegura ao seu titular o direito de reprodução comercial durante o prazo de proteção. Ficam vedadas a terceiros a venda ou a comercialização do material de reprodução sem a autorização do titular. Porém, a proteção recairá somente sobre o material de reprodução das plantas, ou seja, sementes, tubérculos, estacas etc., e nunca sobre o produto final. O período de proteção é de 15 anos, para espécies anuais, e de 18 anos, para videiras, árvores florestais e ornamentais.

O pedido de proteção de cultivares transgênicas segue os mesmos padrões daqueles aplicados para as cultivares obtidas por métodos de melhoramento tradicionais, diferenciando-se, apenas, quanto ao fato de no primeiro caso ter que apresentar cópia do parecer técnico conclusivo emitido pela CTNBio. A Lei de Biossegurança (BRASIL, 1995) estabelece as normas e os procedimentos para o desenvolvimento, importação, armazenamento e comercialização de OGMs. Até o momento, 151 cultivares transgênicas foram protegidas no Brasil (BRASIL, 2009).

Podem-se proteger, para fins de exploração comercial, a nova cultivar e aquela essencialmente derivada, desde que preenchidos os seguintes requisitos: ser distinta,

diferente de outra cultivar; homogênea, apresentar uniformidade nas suas características; ser estável, manter a homogeneidade durante os sucessivos plantios; fazer parte da lista oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, não poderá ter sido oferecida à venda, no Brasil, há mais de um ano em relação à data do pedido de proteção, e não ter sido oferecida à venda em outros países, há mais de seis anos, para videiras e árvores, e quatro anos para outras espécies, com o conhecimento do obtentor.

Cultivares que já estão sendo comercializadas há mais de um ano antes do pedido de proteção podem também ser protegidas, porém, somente para fins de derivação, isto é, para obtenção de outras cultivares. São, portanto, de domínio público, podendo ser exploradas comercialmente sem o consentimento do titular. A cultivar a ser protegida deve apresentar os seguintes requisitos: ser distinta, homogênea e estável; fazer parte da lista oficial do MAPA e observar os seguintes prazos: o período entre a primeira comercialização e o pedido de proteção deve ter ocorrido até, no máximo, dez anos. O pedido de proteção deve ser feito até, no máximo, um ano após a inclusão da espécie na lista oficial do MAPA. Nesse caso, o período de duração da proteção da cultivar deverá ser abatido do número de anos que a cultivar já se encontra no mercado, quando for emitido o certificado provisório.

O pedido de proteção de cultivares é feito diretamente ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), em Brasília, DF. Esse órgão é responsável pela emissão dos certificados de proteção de cultivares e títulos e está vinculado à Secretaria de Desenvolvimento Rural do MAPA, atualmente Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Para tal, é necessária a realização dos seguintes procedimentos:

- a) formulários preenchidos com informações sobre a origem genética, cultivar, método de melhoramento utilizado, nome do melhorista, obtentor da cultivar (pessoa física

e/ou jurídica), descritores mínimos (características fenotípicas, como altura da planta; resistência à doença etc.) e outras informações;

- b) documento com a denominação da cultivar. O nome da cultivar deve ser genérico e, portanto terá a mesma denominação em todos os países onde for protegida, exceto onde houver problemas com o idioma. Não são permitidas denominações de marcas registradas e é possível o uso de denominações idênticas para cultivares, desde que pertençam a espécies de plantas não afins;
- c) teste para provar a distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade da cultivar (DHE). Orientações de como realizá-lo estão contidas nos formulários;
- d) duas amostras vivas, representadas pelo material de reprodução da planta. Por exemplo, no caso da soja transgênica, devem-se apresentar dois quilos de sementes. Uma amostra será utilizada para testes de germinação e a outra, para compor o Banco de Germoplasma do SNPC;
- e) pagamento de taxas: R\$ 200,00 no requerimento, R\$ 600,00 na expedição do certificado e anuidade de R\$ 400,00, que será paga durante todo o período de proteção. O valor da anuidade pode ser reduzido para R\$ 320,00, desde que o titular assine termo de fiel depositário da amostra viva, ou seja, que se responsabilize pela manutenção desta. Para transferência de titularidade, deve ser paga uma taxa de R\$ 600,00 e, para alteração de denominação, razão social e outras alterações, a taxa é de R\$ 200,00 (valores equivalentes ao ano 2009);
- f) manutenção de amostra viva durante todo o período de proteção da cultivar.

Todos os formulários citados contêm orientações de como preenchê-los e podem

ser obtidos no SNPC, sendo específicos para cada espécie de planta. O pedido de proteção de cultivares no exterior, em países membros da UPOV, ficará sujeito à lei daquele país, tendo de pagar, inclusive, as taxas exigidas e manter as amostras vivas. Essa última exigência não se aplica a cultivares protegidas sem fins de exploração comercial. Portanto, torna-se oneroso protegê-las em vários países.

Uma vez que a cultivar está protegida, é proibida a sua venda, reprodução, importação, exportação etc., sem autorização do titular. Caso isso ocorra, o infrator terá o material apreendido, pagará indenização e multa de 20% do valor da mercadoria. Além disso, responderá por crime de violação dos direitos do melhorista. Caso haja reincidência, o infrator pagará duas vezes o valor da multa.

Não ferem os direitos de propriedade sobre a cultivar protegida:

- a) quando o pequeno produtor, definido na lei, multiplicar a semente para uso próprio ou trocá-la, nunca vendê-la;
- b) na pesquisa, desde que utilizada como fonte de variação genética, exceto o repetido uso da cultivar para formação de híbridos ou para a criação de cultivares essencialmente derivadas. Nesses casos, é necessária a autorização do titular da cultivar protegida, ou mesmo a negociação da porcentagem de *royalties* que venha a receber, caso sejam obtidas novas cultivares.

ALPC também criou mecanismos para punição de abuso do poder econômico ou mesmo para manobras de mercado. Caso tais situações ocorram, o governo pode utilizar de dois mecanismos: emitir licença compulsória a terceiros ou determinar o uso público restrito, também usado em casos de catástrofes. Em ambos os casos, o titular perde o direito de exploração da cultivar protegida por três anos, podendo essa determinação ser prorrogada por mais

três anos. Durante esse período, o titular da cultivar receberá remuneração determinada pelo governo e, após retomar os seus direitos, a duração da proteção será subtraída pelo número de anos de punição.

O direito de proteção pode ser cancelado, quando houver renúncia do titular ou dos seus sucessores, perda da homogeneidade e da estabilidade da cultivar, ausência do pagamento da anuidade, não apresentação da amostra viva, quando requerida e, ainda, caso a cultivar apresente impacto desfavorável. Após o término do período de proteção, o direito do titular será extinto e a cultivar torna-se de domínio público.

NOVA PROPOSTA DA LEI DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES

Diante da necessidade de uma melhor adequação da LPC, que visa contribuir para o combate à pirataria de sementes, diminuir a vulnerabilidade da proteção sobre espécies de propagação vegetativa, dentre outros aspectos, foi encaminhada, pelo MAPA, uma proposta de mudança da LPC à Casa Civil, em junho de 2008. Essa proposta encontra-se em fase de aperfeiçoamento nos ministérios participantes do processo. A seguir, serão abordados alguns pontos da LPC com as propostas de alterações, conforme informações obtidas no MAPA (AVIANI, 2009).

- a) somente as espécies vegetais, com descritores publicados no Diário Oficial, podem ser protegidas no Brasil. Com a nova proposta todas as espécies vegetais serão beneficiadas pela LPC;
- b) atualmente, os direitos do obtentor recaem somente sobre o material propagativo da cultivar protegida, enquanto que na proposta de alteração, os direitos serão extensivos ao produto comercial da colheita ou qualquer produto feito diretamente deste;
- c) dentre as exceções ao direito do obtentor, qualquer agricultor pode produzir material propagativo de

- qualquer espécie protegida para uso próprio. A proposta de mudança é que somente os pequenos agricultores, isentos do imposto de renda, poderão produzir material propagativo para uso próprio ou troca, exceto para plantas ornamentais;
- d) a vigência da proteção é de 15 e 18 anos para espécies anuais e perenes, respectivamente, e passa a contar a partir da publicação do pedido, quando ocorre a emissão do Certificado Provisório. Com a alteração, o período de vigência passará a ser de 20 e 25 anos, o prazo de proteção será contado a partir da emissão do Certificado de Proteção, e a proteção provisória passa a ser garantida a partir da publicação do pedido de proteção;
- e) o teste DHE é realizado pelo obtentor da cultivar a ser protegida e apresentado no momento do pedido de proteção. Na proposta de mudança, poderão ser realizados pelo obtentor ou executores credenciados o pedido de proteção com o teste de DHE completo ou o pedido de proteção com o teste de DHE parcial ou não realizado;
- f) no pedido de proteção de uma cultivar é necessária a entrega de uma amostra viva (material propagativo) para o SNPC ou, nos casos de espécies de propagação vegetativa, deve ser mantida pelo obtentor como fiel depositário nomeado pelo SNPC. Na nova proposta, o obtentor obriga-se a manter uma amostra viva (material genético de propagação da cultivar protegida), à disposição do SNPC, e a proteção será efetivada mediante entrega de material representativo (a ser definido em regulamento, conforme a espécie: semente, ácido desoxirribonucleico (DNA) ou outro tipo de material) da cultivar para o SNPC;
- g) o licenciamento compulsório, atualmente é decidido pelo Conselho

Administrativo de Defesa Econômica (Cade), autarquia vinculada ao Ministério da Justiça. Com a mudança, esse passa a ser decidido por Decreto Presidencial, ouvido o ministro do MAPA e mediante parecer do Cade;

- h) quanto às proibições e sanções da LPC, aquele que vender, oferecer à venda, reproduzir, importar, exportar, bem como embalar ou armazenar para esses fins ou ceder, a qualquer título, material de propagação de cultivar protegida, com denominação correta ou com outra, sem autorização do titular, fica obrigado a indenizá-lo, em valores a serem determinados em regulamento, além de ter o material apreendido. Pagará multa equivalente a 20% do valor comercial do material apreendido, incorrendo, ainda, em crime de violação dos direitos do melhorista, sem prejuízo das demais sanções penais cabíveis. Na proposta de mudança, serão caracterizados os crimes e definidas as penas para atos que violem o direito dos obtentores. Viola o direito de proteção aquele que comercializar ou tiver em estoque, com o propósito de comercialização, cultivar protegida ou suas partes, objetivando plantio ou semeadura, independentemente de utilizar sua denominação correta, com violação dos direitos do titular e reproduzir ou multiplicar, com finalidade de comercializar ou de obter lucro, material propagativo ou produto de colheita de cultivar protegida, com violação dos direitos do seu titular. Será aplicada a pena de detenção de três meses a um ano ou multa. A pena é aumentada, quando a infração for cometida por terceiros com acesso privilegiado à cultivar protegida.

CULTIVARES PROTEGIDAS NO BRASIL

No período de 1ª de janeiro de 1998, até 30 de junho de 2009, foram emitidos 1.228

certificados de proteção de cultivares, incluindo as geneticamente modificadas e as não modificadas. Desses certificados, 1.140 são de caráter de proteção definitiva e 88 de proteção provisória. Dentre as espécies passíveis de proteção no Brasil, a soja, o trigo, a cana-de-açúcar, a roseira, a batata, o algodão e o arroz apresentam o maior número de cultivares protegidas, refletindo importância econômica e o maior dinamismo dessas espécies (Quadro 1). Já o café, um dos principais produtos de exportação do Brasil, apresenta apenas seis certificados de proteção, provavelmente por se tratar de uma cultura perene e com baixo retorno de *royalties*.

A soja apresenta 417 certificados emitidos no País, representando 34% das cultivares protegidas no Brasil, sendo que a maioria dessas estão sob domínio de empresas privadas. Das 151 cultivares transgênicas protegidas no Brasil, 141 (93%) são de soja e 10 (7%) são de algodão (Quadro 1). Existem outras cultivares transgênicas de milho, feijão e arroz que ainda não estão protegidas.

A expansão da área plantada com cultivares transgênicas revela o aumento da importância dessas cultivares na agricultura. No Brasil, ocorreu um aumento de 5,3% na área plantada com transgênicos na safra 2008/2009 em relação à safra do ano anterior, atingindo 15,8 milhões de hectares (JAMES, 2008). Desse total, 14 milhões de hectares são destinados ao cultivo da soja, 400 mil ao cultivo do algodão e 1,4 milhão destinados ao cultivo de milho. Essa será a primeira safra de milho transgênico permitida por lei no País, e esse milho ainda não tem certificado de proteção, provavelmente por possuir uma proteção natural, principalmente os híbridos, que implica na perda de características produtivas de uma geração para a outra, o que inviabiliza o uso de parte da colheita para plantio posterior. Para a safra 2009/2010, há uma perspectiva de aumento da área plantada de cultivares transgênicas, principalmente por causa da expansão da área plantada com milho.

QUADRO 1 - Número de certificados emitidos (NCE) no Brasil, para cultivares protegidas convencionais e transgênicas, no período de janeiro de 1998 a junho 2009 (continua)

Espécies	Cultivares convencionais			Cultivares transgênicas			Total (NCE)
	NCE	Titulares		NCE	Titulares		
		Setor privado (%)	Setor público (%)		Setor privado (%)	Setor público (%)	
Abacaxi	03	67	33	-	-	-	03
Alface	26	96	04	-	-	-	26
Algodão	48	50	50	10	100	0	58
Alstroemeria	12	100	00	-	-	-	12
Antúrio	13	100	00	-	-	-	13
Arroz	58	34	66	-	-	-	58
Aveia	07	71	29	-	-	-	07
Bananeira	01	0	100	-	-	-	01
Batata	64	95	05	-	-	-	64
Begônia	01	100	00	-	-	-	01
Begônia Elatior	17	100	00	-	-	-	17
Braquiária	04	75	25	-	-	-	04
Café	06	0	100	-	-	-	06
Calancoe	37	100	00	-	-	-	37
Cana-de-açúcar	80	64	36	-	-	-	80
Capim-colonião	02	100	00	-	-	-	02
Capim-elefante	01	100	00	-	-	-	01
Cebola	01	0	100	-	-	-	01
Genoura	03	100	00	-	-	-	03
Centeio	01	0	100	-	-	-	01
Cevada	06	33	64	-	-	-	06
Copo de leite	07	100	00	-	-	-	07
Crisântemo	12	100	00	-	-	-	12
Ervilha	02	100	00	-	-	-	02
Eucalipto	28	100	00	-	-	-	28
Feijão	34	21	79	-	-	-	34
Feijão-vagem	02	100	-	-	-	-	02
Gergebra	12	100	-	-	-	-	12
Gramma-esmeralda	02	100	-	-	-	-	02
Guandu	01	-	100	-	-	-	01
Guzmania	04	100	-	-	-	-	04
Gypsophila	02	100	-	-	-	-	02
Lírio	09	100	-	-	-	-	09
Maçã	02	100	-	-	-	-	02
Maçã frutífera	13	85	15	-	-	-	13
Macrotyloma	01	100	-	-	-	-	01
Mamona	01	-	100	-	-	-	01
Milheto	08	100	-	-	-	-	08
Milho	38	11	89	-	-	-	38
Morango	08	100	-	-	-	-	08
<i>Paspalum vaginatum</i>	01	100	-	-	-	-	01

(conclusão)

Espécies	Cultivares convencionais			Cultivares transgênicas			Total (NCE)
	NCE	Titulares		NCE	Titulares		
		Setor privado (%)	Setor público (%)		Setor privado (%)	Setor público (%)	
Pera frutífera	01	100	-	-	-	-	01
Pera porta-exterto	01	100	-	-	-	-	01
Poinsetia	02	100	-	-	-	-	02
Roseira	82	100	-	-	-	-	82
Soja	276	54	46	141	79	21	417
Sorgo	21	09	91	-	-	-	21
Trigo	90	52	48	-	-	-	90
Triticale	04	75	25	-	-	-	04
Videira	13	46	54	-	-	-	13
Violeta africana	09	100	-	-	-	-	09
Total	1.077			151			1.228

FONTE: BRASIL (2009).

No mundo, o aumento da área plantada com transgênicos na safra de 2008/2009 foi de 9,4%, atingindo 125 milhões de hectares em 2008. Os principais países produtores são os Estados Unidos, com 62,5 milhões de hectares, seguido da Argentina com 21 milhões e o Brasil em terceiro, com 15,8 milhões de hectares. A Índia, onde se cultivava algodão, foi o país que apresentou maior expansão da área plantada, 23% em relação à safra anterior, atingindo 7,6 milhões de hectares. Na China, existem 3,8 milhões de hectares plantados com culturas transgênicas, como algodão, tomate, mamão papaya etc. (JAMES, 2008). Na safra 2008/2009, a área total mundial cultivada com soja foi estimada em 95 milhões de hectares, sendo 70% dessa cultivada com soja transgênica. No caso do algodão, a área total estimada foi de 35 milhões de hectares, com 46% destinados às lavouras transgênicas. O milho foi cultivado em 157 milhões de hectares, sendo 24% dessa área cultivada com milho transgênico (Gráfico 1).

Com relação aos titulares de cultivares, observa-se, no cenário nacional, um número bastante representativo de empresas privadas nacionais e transnacionais e pouca expressão do setor público, com exceção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Dos 1.228 certificados de proteção de cultivares emitidos

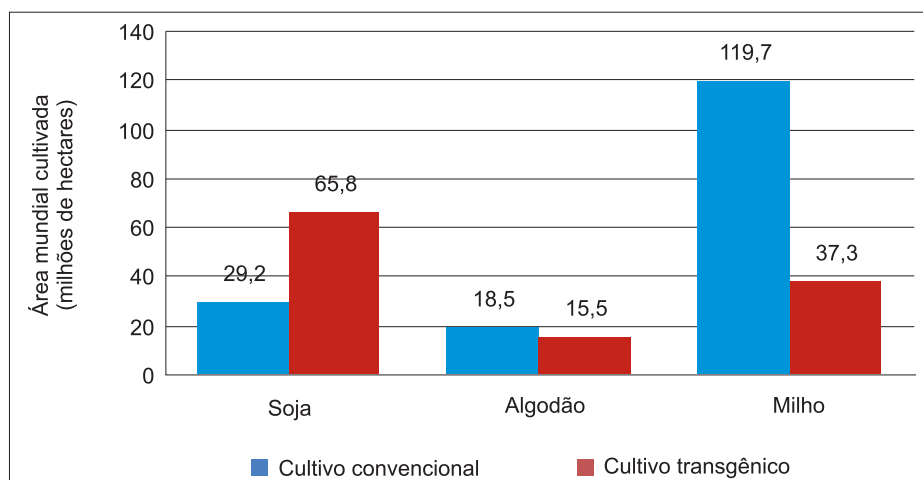


Gráfico 1 - Área mundial cultivada com plantios convencionais e transgênicos, safra 2008/2009

FONTE: JAMES (2008).

no Brasil, 67% estão sob o domínio de empresas privadas, enquanto que os 33% restantes estão sob domínio das empresas públicas. Com relação aos transgênicos, 81% dos certificados estão sob domínio de empresas privadas e 19% em empresas públicas. Todas as cultivares de algodão transgênicas protegidas pertencem à empresa privada Delta & Pine (Gráfico 2). No caso da soja, 79% das cultivares são de empresas privadas e 21% das cultivares pertencem ao setor público. Com relação ao setor privado, as empresas que detêm um maior número de certificados emitidos

são a Monsoy (Monsanto), Fundação MT, Nidera S/A e Dupont do Brasil. Já no setor público, a Embrapa é a empresa com maior número de certificados (Gráfico 3).

CULTIVARES TRANSGÊNICAS VERSUS PATENTES

A Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1999 (BRASIL, 1996), disciplina os direitos e obrigações referentes à propriedade industrial. A proteção dos direitos relativos a essa lei abrange vários aspectos, dentre os quais a concessão de patentes.

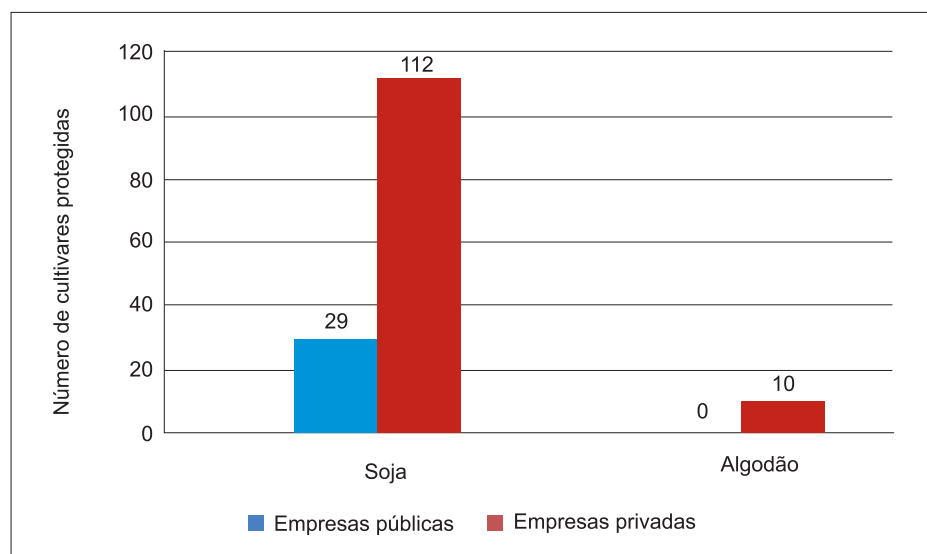


Gráfico 2 - Número de certificados de cultivares transgênicas protegidas e seus titulares no Brasil, 2009.

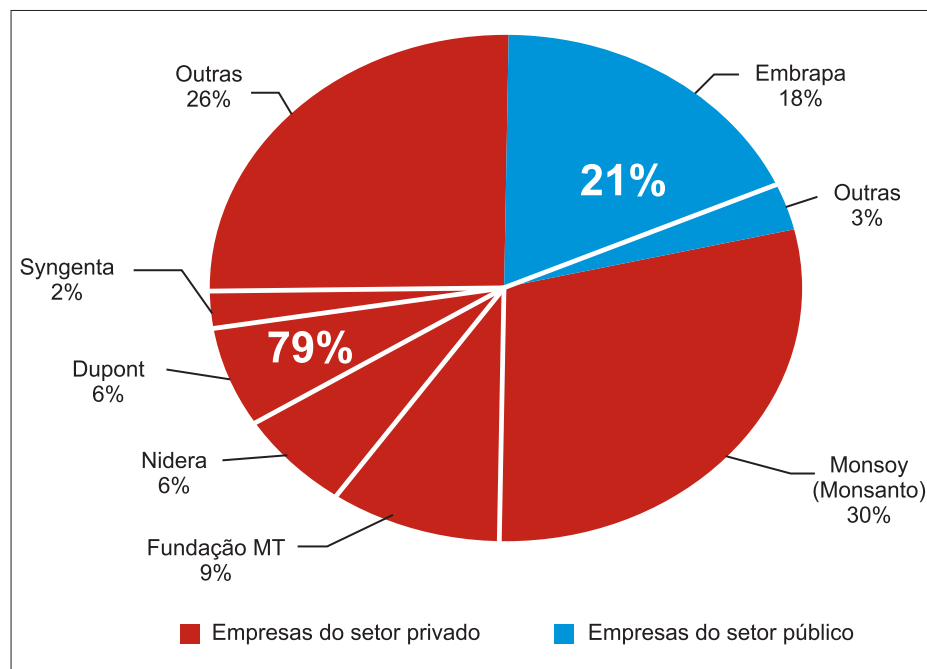


Gráfico 3 - Empresas titulares de cultivares transgênicas de soja protegidas no Brasil, 2009.

Patentes são títulos de propriedade temporários sobre uma invenção, modelo de utilidade ou desenho industrial, concedidos pelo Estado aos detentores de direitos sobre a criação, seja pessoa física ou jurídica. A patente confere ao titular o direito de impedir terceiros, sem que haja consentimento, de produzir, usar, vender ou importar produtos patenteados.

No âmbito da biotecnologia, as patentes têm por objeto os produtos ou processos biotecnológicos que abrangem as áreas de Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Genética. Entretanto, para que seja requerido um pedido de patente, é necessário que o objeto, produto ou processo, atenda aos seguintes requisitos: novidade, utilização ou aplicação industrial e suficiência des-

critiva. Além disso, as invenções devem apresentar atividade criativa e os modelos de utilidade devem decorrer de ato inventivo que resulta em melhoria funcional no seu uso ou fabricação.

Em se tratando de cultivares transgênicas, dois aspectos devem ser considerados: os métodos e os processos tecnológicos e a cultivar propriamente dita. No primeiro caso, enquadram-se as metodologias desenvolvidas para produzir essas cultivares, por exemplo, o isolamento, a clonagem e a transferência de genes modificados para as plantas, etc. Esses processos podem ser patenteados. Já as cultivares transgênicas, obtidas ou não por métodos patenteados, não são passíveis de patente e sim de proteção por meio da LPC.

Os depósitos de pedidos de patentes que envolvam processos de modificações genéticas seguem os mesmos princípios estabelecidos na lei para qualquer invenção. Podem ser efetuados não só na sede do INPI, no estado do Rio de Janeiro, como também nas Delegacias e Representações Estaduais. Já os pedidos de proteção para as cultivares transgênicas somente poderão ser efetuados no SNPC, em Brasília, DF.

Os pedidos de patentes devem ser solicitados em formulários específicos, em três vias, contendo:

- relatório com descrição suficiente, clara e completa do objeto do pedido;
- reivindicação, definindo a matéria para a qual a proteção é solicitada, estabelecendo-se os direitos do inventor/criador;
- desenho, não obrigatório;
- resumo, sumário da descrição técnica do pedido de patente;
- comprovante de recolhimento.

Há ainda o pagamento das seguintes taxas: R\$ 200,00, na solicitação do depósito; no caso de pessoas físicas, microempresas, instituições de ensino e pesquisa, esse valor cai para R\$ 80,00; os mesmos valores

valem para a expedição da carta patente. Além dessas taxas, pagam-se também as anuidades, cobradas a partir do início do terceiro ano de depósito, que variam de R\$ 660,00, no início, a R\$ 1.690,00, nos últimos anos. A patente de invenção vigorará pelo prazo de 20 anos e a de modelo de utilidade, por 15 anos, contados da data do depósito⁶. A manutenção dos direitos do titular da patente depende de uma série de fatores, como o pagamento das anuidades e a exploração efetiva do objeto patenteadado, o que deverá ocorrer num prazo máximo de três anos a partir da concessão. Uma vez iniciada a exploração, não pode haver interrupção por tempo superior a um ano. À patente que não for explorada, poderá ser concedida uma licença compulsória e, caso essa não se revele suficiente por um período de dois anos, poderá ser declarada sua caducidade e sua extinção decorrentes da falta de exploração efetiva do objeto. Portanto, é importante a comercialização da patente feita por meio de licenças. Existem três formas de licenças:

- a) voluntária, que licencia terceiros a fabricar e a comercializar o produto ou o processo;
- b) a compulsória, que é uma forma de evitar abuso de poder e a não exploração de patentes no prazo previsto em lei;
- c) oferta de licença, que é feita pelo INPI, com a autorização do titular.

No Brasil, já existem vários depósitos de patentes de invenção, os quais envolvem processos e produtos biotecnológicos associados aos organismos geneticamente modificados, publicados periodicamente pelo INPI, tais como plantas transgênicas que possuem:

- a) teor aumentado de amido;
- b) fonte alternativa de enzimas degradadoras lignocelulósicas, expressando enzimas celulolíticas;

- c) teor melhorado de aminoácido contendo enxofre;
- d) controle de lagarta-de-milho via formação de limoneno com genes de geminivírus;
- e) resistências múltiplas a vírus e o processo para sua produção;
- f) poli-hidroxicarboatos;
- g) resistência ao glifosato etc.

Além disso, há também a possibilidade de patentear processos e produtos, tais como os envolvidos na obtenção de plantas transgênicas; identificação de promotores; construção de vetores para introdução de genes na planta, produto de expressão e *kits* de expressão etc. (REVISTA PATENTES, 2000). A grande maioria desses depósitos, quase que exclusivamente, foi solicitada por empresas transnacionais, como a Monsanto e a Syngenta.

Assim, as cultivares transgênicas estariam protegidas de duas maneiras, ou seja, indiretamente, pela patente do processo e/ou produto do gene e, diretamente, pela lei de proteção de cultivares. As complexidades dessas leis acabam por provocar dúvidas quanto a sua interpretação, deixando margens para uma série de questionamentos. Pela LPC, o pequeno produtor, definido na lei, pode utilizar e produzir sementes da cultivar de soja transgênica para uso próprio, sem o consentimento do titular, não podendo, de forma alguma, comercializá-las. A pesquisa também foi resguardada por essa lei, portanto, pode-se utilizar a cultivar de soja transgênica como fonte de variação genética, sem o consentimento do titular, exceto no caso de usos repetitivos.

ASPECTOS ECONÔMICOS DA COBRANÇA DE ROYALTIES SOBRE AS CULTIVARES PROTEGIDAS

O *royalty*, no caso de produtos vegetais, é uma taxa cobrada sobre a venda do material de reprodução, semente, estaca,

tubérculo etc., da cultivar protegida, que é repassada ao titular da cultivar, seja pessoa física, seja jurídica. Essa taxa é acrescida ao preço do material de reprodução da cultivar, elevando os custos de produção e, conseqüentemente, o preço do produto final. Com isso, os *royalties* serão pagos pelos consumidores. No entanto, para a comercialização de sementes ou outro material de reprodução, é necessário que a cultivar esteja registrada no Registro Nacional de Cultivares (RNC).

A lei não estabelece valores de *royalties* a serem cobrados. No entanto, tal valor tem variado entre 3% e 5% do custo da semente. O valor dos *royalties* pode ser influenciado por vários fatores, destacando-se a tecnologia empregada na obtenção das cultivares. Por exemplo, cultivares transgênicas de soja terão valores de *royalties* diferenciados de cultivares de soja não transgênicas; atributos que a cultivar venha a oferecer, ou seja, acúmulo de características desejáveis, como resistência a doenças, pragas, melhor qualidade nutricional etc.; oferta de cultivares no mercado, pois, com maior oferta, gera-se competição e, conseqüentemente, há uma tendência de queda nos valores de *royalties*, evitando-se, assim, o monopólio de mercado. Portanto, ao considerarem-se os aspectos apresentados, os valores de *royalties* podem variar não só entre as espécies de plantas, mas também entre cultivares da mesma espécie, independentemente da tecnologia utilizada para sua obtenção. Ressalta-se, ainda, que a LPC estabelece punição para os casos de abuso de poder.

No Quadro 2, é apresentado o efeito da cobrança de *royalties* no custo final de produção de várias espécies de plantas. Observa-se que maiores valores de *royalties* são obtidos para espécies que apresentam a semente com maior participação no custo de produção, o que trará maiores retornos econômicos para os titulares e, certamente,

⁶Valores equivalentes ao ano 2009.

QUADRO 2 - Efeito da cobrança de *royalties* no custo final de produção

Espécies	Participação da semente no custo de produção (%)	Acréscimo no custo final de produção			
		<i>Royalties</i> de 3%		<i>Royalties</i> de 5%	
		%	R\$/ha	%	R\$/ha
Arroz de sequeiro	16,30	0,49	1,46	0,82	2,43
Batata	35,30	1,06	63,00	1,76	104,90
Feijão de sequeiro	19,84	0,6	3,00	0,99	5,00
Feijão irrigado	11,84	0,36	3,00	0,59	5,00
Milho (grão)	4,91	0,15	0,71	0,25	1,19
Soja	11,33	0,34	1,35	0,57	2,35
Cana-de-açúcar	4,54	0,14	1,68	0,23	2,80

FONTE: EMATER-DF (apud PINHEIRO, 1997).

terão programas de melhoramento genético mais fortes.

Dentre as espécies citadas, a batata apresentou o maior retorno econômico e os maiores acréscimos no custo final de produção. Considerando-se a hipótese do *royalty* de 3%, de acordo com Pinheiro (1997), a participação de 35,5% da batata-semente no custo de produção passaria para algo em torno de 36%, significando um aumento de R\$ 63,00 por hectare no custo de produção. Quando tal acréscimo for diluído no custo por quilo do produto final (24 t/ha), no Distrito Federal, haverá um acréscimo entre R\$ 0,10 e R\$ 0,15 por saca de 50 kg. Buso (1998) cita vários exemplos de valores de *royalties* cobrados em diversos países, como seguem: na Holanda, o valor médio do *royalty* é de US\$ 0,02 por quilo de batata-semente, correspondendo, aproximadamente, a R\$ 0,72 por caixa de 30 kg ou a R\$ 45,00 por hectare, o que resulta em um acréscimo em torno de 2% no custo de produção. Já no Chile, o valor do *royalty* é de 5% no preço final da batata-semente. Considerando-se que a participação desse insumo contribui com 30% a 50% do custo de produção, os acréscimos estarão entre 1,5% e 2,5%. No Brasil, para outras hortaliças em que o custo da semente ou outro material de reprodução representa pequena porcentagem no custo final, o aumento seria insignificante. Por exemplo: batata-doce (0,47%); alface (0,62% a

0,66%); cenoura (2,6% a 3,0%); beterraba (4,8% a 5,9%) e abóbora japonesa (7,1%), (BUSO, 1998). A Monsanto, detentora da tecnologia *Roundup Ready*TM (RR), cobra R\$ 0,35 por quilo na compra de semente certificada de soja. A BASF cobra R\$ 0,33 por saca de 50 kg de sementes de arroz transgênico tolerante a herbicida.

IMPACTOS DAS PATENTES E PROTEÇÃO DE CULTIVARES NA PESQUISA

Os impactos esperados com a utilização de tecnologias patenteadas e a proteção de cultivares são vários e destacam-se a seguir.

Maior investimento do setor privado na pesquisa

O interesse do setor privado no melhoramento genético é decorrente dos benefícios advindos da LPC e LPI. Os híbridos já possuem um sistema natural de proteção, entretanto, as cultivares autógamas e de propagação vegetativa dependem fortemente de um estatuto legal de proteção para viabilizá-las economicamente (CARVALHO, 1997). Esse crescimento também tem sido decorrente das aquisições e fusões de empresas que detêm germoplasmas elites pelas gigantes transnacionais, detentoras de patentes de pesquisas genéticas. Nesse contexto, a Dow Agrosciences, subsidiária da The Dow Chemical Company, adquiriu, em

2008, a Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), uma das líderes no mercado de semente de soja no Brasil, com, aproximadamente, 25% do mercado, e a divisão de milho da Agromen Sementes Agrícolas Ltda., que tem cerca de 11% de participação no mercado. A Monsanto adquiriu diversas empresas, tais como Calgene, Asgrow, Dekalb, o setor de sementes da Cargill e Seminis. No Brasil, comprou a Agroceres, maior produtora de sementes de milho do País; o setor de sementes de soja da FT Pesquisas e Sementes Ltda.; a Agroeste e, em 2009, comprou a MDM Sementes de Algodão Ltda. e as empresas de melhoramento genético e biotecnologia de cana-de-açúcar CanaVialis S.A. e Alellyx S.A. do Grupo Votorantim. Além disso, fundiu-se com a gigantesca Holdens Foundation e empresas de biotecnologia como Agracetus, Delta & Pine (GRAIN, 1997 apud KLEBA, 1998), Fontanelle Hybrids, NC+ Hybrids, entre outras. Uniu-se também à Dow AgroSciences para desenvolver o SmartStax, semente de milho com oito combinações de genes, com tolerância a herbicida e a ataque de insetos. A Monsanto, atualmente, disputa o mercado mundial com outras duas gigantes: a DuPont e a Syngenta. A DuPont, por sua vez, adquiriu 20% da Pioneer Hi-Breed, destacada empresa de pesquisa biotecnológica (ALMEIDA, 1998), a AgarCross e a Griffin Ltda. A

Syngenta surgiu no ano de 2000 pela fusão das empresas Astra Zeneca, do México, e Novartis, da Suíça. Adquiriu a Advanta BV, uma das maiores empresas de sementes do mundo. Em 2004, firmou um acordo com a Delta & Pine Land dos EUA, para o desenvolvimento e comercialização de produtos de biotecnologia para algodão. Posteriormente, adquiriu a Emergent Genetics Vegetable A/S, a Zeraim Gedera e a empresa chinesa de sementes Sanbei. Em 2008, realizou uma parceria com a DuPont para desenvolvimento de tecnologias para controle de insetos em milho.

Aumento da parceria de pesquisas entre os setores público e privado

É crescente o número de parcerias já existentes no País entre os setores público e privado após a entrada em vigor do sistema de proteção de plantas. Como exemplo, a Monsanto e a Syngenta têm realizado parcerias com várias universidades e instituições de pesquisas ou mesmo cooperativas. Com isso, cria-se, de um lado, a estrutura em pesquisas biotecnológicas e, do outro, um gigantesco banco de germoplasma. Essas parcerias visam não só o desenvolvimento de pesquisas conjuntas para novas cultivares e realização de testes de plantas transgênicas, mas também o licenciamento de produtos e processos biotecnológicos patenteados.

Ressalta-se que sempre devem ser celebrados contratos entre as partes interessadas, para não haver dúvidas quanto à participação na parceria e no produto final obtido. Em se tratando de transgênicos, é importante que o contrato seja averbado no INPI e registrado em cartório, pois trata-se de um produto ou processo patentado.

Direcionamento do melhoramento genético de plantas

Há de se considerar que as espécies de plantas que trazem maiores retornos econômicos oriundos da cobrança de *royalties*

terão prioridade no melhoramento genético. Esse reflexo é observado pelo grande número de cultivares de soja protegidas nos EUA e, de certa forma, no Brasil, onde já responde por 34% dos títulos emitidos até 2009.

Outro ponto a considerar é o ciclo da cultura. As espécies anuais são mais atrativas que as semiperenes e perenes, pois, no primeiro caso, o produtor pagará *royalties* todo ano ao adquirir sementes para implantar a lavoura. Já no caso das culturas perenes, como fruteiras, espécies florestais, café etc., o produtor pagará *royalties* somente na implantação das lavouras, que serão exploradas por vários anos, ou então, caso resolva aumentá-las ou renová-las. Além desse aspecto, o melhoramento genético das culturas perenes é mais demorado, quando comparado com as culturas anuais e, dependendo do modo de reprodução da espécie, pode-se levar até 30 anos para lançar cultivares no mercado, sendo pouco interessante investir nessas espécies. De certa forma, estas ficaram prejudicadas, até mesmo pelo pouco período de proteção que a lei estabelece para tais espécies. Na verdade, a LPC deixa a desejar em muitos aspectos, ao tratar-se de plantas perenes e de propagação assexuada.

Surgimento de empresas prestadoras de serviço

Já é possível encontrar, no Brasil, empresas e/ou pessoas físicas disponíveis para realizar tanto a patente de produtos e processos, quanto o pedido de proteção de cultivares. Existem, também, serviços para a realização de testes de DHE e manutenção de amostras vivas em bancos de germoplasma, tais como o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias, a Fundação Pró-Sementes de Apoio à Pesquisa, a Fundação Centro-Oeste de Pesquisa e Desenvolvimento e a Fundação Triângulo de Pesquisa e Desenvolvimento. Outro aspecto importante será o desenvolvimento de testes biotecnológicos utilizados na distinção de cultivares.

Incentivo aos pesquisadores

Espera-se que, com a legislação vigente, os pesquisadores sejam mais valorizados e incentivados, uma vez que o produto do seu trabalho poderá trazer grandes benefícios para as empresas, seja pela patente de produtos e/ou processos biotecnológicos, seja pela proteção de cultivares. Entretanto, o pesquisador somente poderá usufruir desses direitos se for estipulado em contrato. Caso contrário, todos os benefícios pertencerão à empresa. Portanto, as instituições devem rever seus contratos ou mesmo realizar contratos específicos. Wolff (1997) comenta o incentivo dado aos pesquisadores nas universidades e centros de pesquisa em diversos países, como na Alemanha, EUA, Japão e Suíça. Nos EUA, foram criados centros de transferências de tecnologia que tratam dos direitos da propriedade intelectual, dando apoio aos pesquisadores. Especificamente na Universidade da Califórnia, onde os *royalties* são divididos em 50% com os pesquisadores e os licenciamentos das patentes respondem por 30% a 40% da receita da universidade. Também no Brasil, várias universidades já dividem os *royalties* com os professores e pesquisadores. Na Universidade de São Paulo (USP), a divisão é feita ao meio, e parte dos recursos destinados à universidade é investida no núcleo de pesquisa do inventor (WOLFF, 1997). Na Universidade Federal de Viçosa (UFV), a divisão é feita da seguinte forma: 50% para a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e 50% para os Departamentos aos quais pertencem os autores e inventores.

Podem-se, ainda, citar outros impactos com esse complexo de leis, tais como a redução na permuta de germoplasma, introdução de cultivares estrangeiras no País, novas fontes de recursos para pesquisa, maior competição entre os setores público e privado e maior produtividade e qualidade de produtos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de todos os benefícios apontados, advindos dos sistemas de proteção de

cultivares transgênicas ou não, em decorrência da globalização, observa-se que os beneficiados serão sempre os que detêm o conhecimento e o poder econômico e político, nos quais a pesquisa tem prioridade no País. Nos países em desenvolvimento, essas leis tornam-se instrumentos poderosos para que empresas transnacionais apoderem-se dos bancos de germoplasma e cultivares nacionais. Essas empresas são também detentoras de patentes de genes transgênicos e processos biotecnológicos, formando um verdadeiro monopólio no mercado de sementes.

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades genéticas de flora e fauna do mundo. Portanto, se não houver atitudes do Governo Federal, o País estará fadado, em um futuro próximo, a pagar *royalties* para empresas transnacionais, para consumir suas próprias cultivares.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.R. de F. A importância dos transgênicos. **Conjuntura Econômica**, Rio de Janeiro, v.52, n.11, p.64-65, nov. 1998.
- AVIANI, D. de M. Avanços da Lei de Proteção de Cultivares. In: SEMINÁRIO: PROTEÇÃO E REGISTRO DE CULTIVARES, 2009, Belo Horizonte. Belo Horizonte: EPAMIG, 2009. Disponível em: <http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=122&Itemid=109>. Acesso em: ago. 2009.
- BUSO, J. A. Os impactos da Lei de Proteção de Cultivares. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 1998, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1998. p. 47-64.
- BRASIL. Decreto nº 2.366, de 5 de novembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997, que instituiu a Proteção de Cultivares, dispõe sobre o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 6 nov. 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/Quadros/1997.htm>. Acesso em: 2009.
- _____. Lei nº 8.974, de 5 de Janeiro de 1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 6 jan. 1995. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/QUADRO/1995.htm>. Acesso em: 25 nov. 1999.
- _____. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 maio 1996. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/9279.htm>. Acesso em: 25 nov. 1999.
- _____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultivar Web**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://masrv103.agricultura.gov.br/proton/cultivarweb/cultivares_protégidas.php>. Acesso em: 2009.
- CARVALHO, S. M. P. de. Proteção de cultivares e apropriabilidade econômica no mercado de sementes no Brasil. **Cadernos de Ciências & Tecnologia**, Brasília, v.14, n.3, p.365-409, set./dez. 1997.
- JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008**. Ithaca, NY: ISAAA, 2008. (ISAAA Brief, 39).
- KLEBA, J. B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciências & Tecnologia**, Brasília, v.15, n.3, p.9-42, set./dez. 1998.
- PINHEIRO, J. **Informações sobre a Lei de Proteção de Cultivares (Lei n. 9.456, de 25 de abril de 1997)**. Brasília: Senado Federal, 1997. 30p.
- REVISTA PATENTES, n. 1520, 2000. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br>>. Acesso em: 24 fev. 2000.
- WOLFF, M. T. A pesquisa científica e as patentes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.16-17, maio 1997.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- INFORMATIVO TÉCNICO. Brasília: SNPC, n.3, jun. 1999.
- KILMAN, S. Biotecnologia revira setor de pesticidas. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 31 jun. 1999. p.14.
- MOURA, W. M. Lei de Proteção de Cultivares: questões práticas aplicadas ao cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Genética e melhoramento do cafeeiro. Lavras: UFLA, 1999. p.11-17.

AVALIAÇÃO DE VARIEDADES MELHORADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Produção de mudas e capacitação técnica para produtores

Avaliação e recomendação de variedades para produção de cachaça, utilização em usinas e alimentação animal.

Unidade Regional EPAMIG Centro-Oeste
Rod. MG-424 km 64 - Caixa Postal 295 - CEP 35701-970 - Prudente de Moraes - MG
Telefax: (31) 3773-1980 - e-mail: ctco@epamig.br

Detecção de produtos e organismos transgênicos

Sandra Rodrigues de Camargo¹

Resumo - Os avanços tecnológicos na agricultura, como a introdução de organismos geneticamente modificados nos campos de cultivo e de seus derivados em alimentos, têm criado a necessidade de técnicas analíticas para identificação de genes e proteínas introduzidos em tais organismos, a fim de assegurar a pureza genética dos produtos derivados. São abordadas várias técnicas de biologia molecular e imunoenaios para detecção de sequências de DNA, RNA ou proteínas exógenas introduzidas nos organismos transgênicos por meio da biotecnologia.

Palavras-chave: Gene. Proteína. DNA. RNA. OGM. PCR. Imunoensaio.

INTRODUÇÃO

Transgênicos ou organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos cujo material genético foi alterado, por meio da biotecnologia, para inserção de um ou mais genes provenientes de um organismo de outra espécie (plantas, vírus, bactérias etc.) e cuja expressão promove uma nova característica na espécie modificada. Os genes são sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA), que contêm as informações necessárias para dar uma característica natural ao organismo, como o formato a uma semente ou resistência a uma praga. A informação contida no gene é transmitida pela expressão na forma de moléculas de ácido ribonucleico (RNA) e, posteriormente, pela tradução na forma de proteínas. Dessa forma, para a criação de um OGM é necessário que o gene responsável por uma determinada característica seja introduzido no genoma do organismo alvo por meio das técnicas de DNA recombinante.

Há várias razões para que os organismos transgênicos sejam bem estudados e, principalmente, possíveis de ser identificados em meio a organismos convencionais. A capacidade de identificação de transgênico está muito relacionada com as

questões de biossegurança animal, humana e ambiental. Dessa maneira, a legislação brasileira – Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003 (BRASIL, 2003) – especifica que os alimentos que contenham quantidade superior a 1% de material derivado de OGM devem ser rotulados, indicando a presença de transgênico em sua composição. O cidadão também pode contar com o Código de Defesa do Consumidor, para assegurar o seu direito de informação adequada sobre produtos e serviços – Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990) – e decidir se quer ou não consumir alimentos e derivados que sejam ou contenham OGMs. No âmbito ambiental, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é o órgão máximo para deliberação sobre OGM, ou seja, para avaliar os riscos dos transgênicos no meio ambiente (como o risco de escape e o fluxo gênico por meio da fecundação cruzada entre uma espécie geneticamente modificada e uma espécie selvagem e/ou convencional) e liberar somente aqueles considerados seguros. A presença de sementes de plantas geneticamente modificadas em lotes de sementes convencionais tornou-se um crescente problema para o comércio internacional, podendo acarretar sérias consequências para as empresas exportadoras.

Para que o cumprimento da legislação e a regulamentação sobre OGMs sejam eficientes, é necessário que processos e técnicas sensíveis e confiáveis para a detecção e quantificação de OGMs estejam validados e disponíveis.

TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE OGMs

A alteração genética provocada em um organismo deve ser bem conhecida para um melhor entendimento de quais técnicas podem ser empregadas na detecção do OGM. A estrutura básica de uma sequência de DNA exógeno inserida em um OGM é formada, segundo Conceição et al. (2004), por três elementos principais:

- a) região promotora, responsável pela transcrição do gene;
- b) gene de interesse, que define a característica desejável;
- c) região terminadora, responsável pela finalização da transcrição.

Todos os sistemas de detecção baseiam-se nos elementos presentes na sequência de DNA inserida no OGM, seja pela detecção direta da molécula de DNA exógena inserida no genoma, seja indiretamente por meio do produto proteico e derivados resultantes da expressão do inserto de DNA.

¹Bióloga, D.Sc., *Pesq. Alellyx Applied Genomics, CEP 13069-380 Campinas - SP. Correio eletrônico: sandra.camargo@alellyx.com.br*

Ensaio direto: detecção a partir da presença de DNA exógeno PCR

A reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) é a principal técnica utilizada em laboratório de biologia molecular para detecção de transgênicos. A técnica aplicada na detecção de OGM consiste na replicação de sequências específicas do DNA exógeno. Para tal, constroem-se pequenos fragmentos de DNA, chamados iniciadores, que serão ligados ao DNA exógeno presente no OGM e durante o processo da PCR, catalisados pela enzima DNA polimerase, produzirão milhares de cópias da sequência específica. As cópias de DNA produzidas pela PCR são facilmente visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose. Um agente intercalante de DNA (por exemplo, brometo de etídeo) é utilizado para visualização das bandas de DNA presentes no gel. Se os mesmos iniciadores forem utilizados em um organismo não transgênico, não haverá a produção de cópias do DNA exógeno, uma vez que este não está presente no organismo selvagem ou convencional e, portanto, nenhuma banda será visualizada no gel de agarose.

A PCR é uma técnica bastante específica, sensível, segura e capaz de detectar, não só os eventos que são geneticamente modificados (BERTHEAU et al., 2002; GIOVANNINI; CONCILLO, 2002), mas também distinguir aqueles que apresentam diferentes construções gênicas, mas que expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI et al., 2003). Entretanto, essa técnica também apresenta algumas limitações:

- a) dificuldade na construção dos iniciadores, pois é necessário conhecimento prévio da sequência genética introduzida no OGM e geralmente essa informação é confidencial (HOLST-JENSEN et al., 2003);
- b) necessidade de equipamentos apropriados e pessoal treinado;

c) custo elevado, uma vez que o ensaio é específico para cada alteração genética introduzida;

d) cuidados especiais para evitar contaminação das amostras (MIRAGLIA et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2003).

A qualidade do DNA extraído a partir do OGM é determinante para o sucesso da PCR. Há vários métodos descritos na literatura para extração de DNA a partir de folhas, sementes e até mesmo de alimentos processados. O método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é bastante empregado nos laboratórios de biologia molecular. Também existem no mercado vários *kits* comerciais que empregam resinas de sílica com alta afinidade pela molécula de DNA. Um DNA de má qualidade, ou seja, não íntegro e de baixa pureza, pode influenciar negativamente para o sucesso da PCR, pois pode impedir que o DNA exógeno seja identificado na amostra. Isso pode ocorrer por causa da presença de inibidores no DNA extraído, como proteínas, polissacarídeos, polifenóis, entre outros, que dificultam o anelamento dos iniciadores ao DNA alvo e/ou inibem a atividade da enzima DNA polimerase (AHMED, 2002). Consequentemente, a reação não irá ocorrer ou ocorrerá com baixa eficiência. Como controle de qualidade da PCR é sempre necessário utilizar uma reação padrão (controle positivo), que avalia a qualidade do DNA extraído e evita resultados falso-negativos. A reação padrão pode ser feita utilizando-se iniciadores específicos para algum gene endógeno conhecido.

O limite de detecção da PCR está entre 20 pg e 10 ng de DNA exógeno², ou seja, é possível detectar uma única semente geneticamente modificada entre mil e 10 mil sementes convencionais (LÜTHY, 1999).

PCR em tempo real

Variações da técnica de PCR são bastante empregadas em análises moleculares de eventos transgênicos, visando diferentes finalidades. Desse modo, a técnica *quantita-*

tive PCR (qPCR) ou PCR quantitativo em tempo real foi recentemente desenvolvida e vem sendo empregada com certa frequência na identificação de produtos e organismos transgênicos. A qPCR em tempo real é empregada não apenas para a detecção, mas para quantificação do número de cópias de uma determinada sequência alvo de DNA (gene) inserida no OGM. A diferença entre a PCR convencional e a qPCR está na especificidade e sensibilidade do método. Na qPCR em tempo real, utilizam-se equipamentos mais sofisticados capazes de detectar a fluorescência emitida pela reação a cada ciclo de amplificação da molécula de DNA alvo, ou seja, enquanto na PCR convencional o resultado é visualizado em gel de agarose após 30-45 ciclos de amplificação, na qPCR em tempo real a reação é monitorada desde o primeiro até o último ciclo de amplificação pela detecção da fluorescência emitida. Dessa maneira, é possível reconhecer o momento exato (ciclo), quando a molécula alvo inicia o processo de amplificação (Gráfico 1). Esse dado permite inferir, com base no controle endógeno de reação, quantas cópias do transgene estão presentes no OGM. Quanto menor o número de ciclos de amplificação para detecção da fluorescência, maior o número de cópias do transgene inserido no OGM. A sensibilidade do método baseia-se não apenas na captação do sinal fluorescente, mas no modo como a fluorescência é emitida durante a reação. A maioria das aplicações de PCR em tempo real requer apenas um agente intercalante fluorescente para cadeia dupla de DNA. Entretanto, algumas aplicações necessitam de maior especificidade.

Na qPCR, utilizando o sistema de detecção TaqMan®, utiliza-se um par de iniciadores e uma sonda marcada com um fluoróforo (marcador que emite fluorescência). Esses três oligonucleotídeos (dois iniciadores e sonda) são específicos para a sequência alvo, contribuindo, assim, para a maior especificidade da técnica. No processo de amplificação, os iniciadores e a sonda ligam-se à molécula de DNA alvo e uma

²pg - Picograma; ng - Nanograma.

enzima DNA polimerase inicia a polimerização da nova molécula. Quando a enzima encontra a sonda ligada ao DNA molde, esta inicia a sua quebra e, desse modo, permite que a fluorescência seja emitida e então detectada pelo equipamento. Assim, o processo de emissão de fluorescência é dependente da ação conjunta de quatro elementos: dois iniciadores, uma sonda e a atividade da enzima DNA polimerase.

Existem fatores relacionados com as condições de amplificação que podem afetar negativamente na obtenção de bons resultados:

- temperatura inapropriada para o anelamento dos iniciadores e sonda;
- baixa especificidade dos iniciadores e da sonda para a ligação ao DNA molde;
- condições inapropriadas para a atividade da enzima polimerase (concentração de sais e o pH do tampão não ajustados).

Southern blot

A técnica de *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) é utilizada em laboratório para detecção de fragmentos específicos de DNA exógenos integrados ao DNA genômico do evento transgênico. A técnica consiste basicamente de cinco etapas:

- extração e digestão do DNA genômico com uma ou mais enzimas de restrição;
- separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose;
- transferência e fixação do DNA presente no gel para uma membrana de nitrocelulose ou náilon;
- hibridização do DNA presente na membrana contra uma sonda de DNA que possui homologia à sequência de DNA alvo;
- revelação da hibridização por autoradiografia ou colorimetria.

A análise por *Southern blot* é muito confiável e considerada uma prova molecular da integração de elementos exógenos

no genoma de OGMs. Além de comprovar a integração do transgene, dependendo das enzimas e da sonda utilizada, com esse método também é possível estimar o número de cópias que foram introduzidas no genoma do organismo receptor (Fig. 1).

No entanto, essa técnica possui como limitante a grande quantidade necessária de DNA genômico, que deve ser entre 20 e 40 μg , o que às vezes é difícil de obter, dependendo do tipo de amostra utilizada³. Outras limitações relacionadas com essa técnica

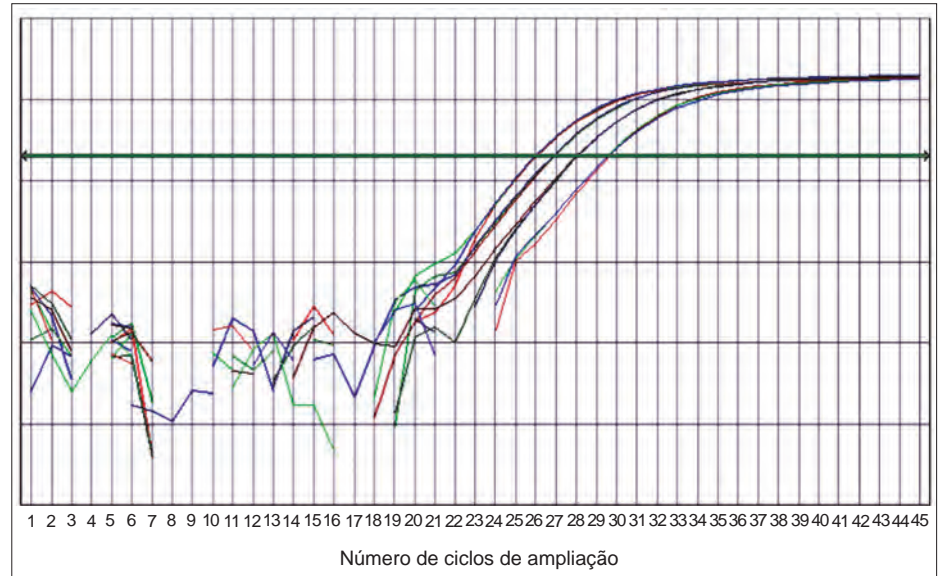


Gráfico 1 - qPCR em tempo real

NOTA: As curvas do gráfico mostram o progresso de amplificação de moléculas alvo, a partir da captação de sinal fluorescente, ao longo dos ciclos da PCR.

PCR - Polymerase chain reaction; qPCR - Quantitative PCR.

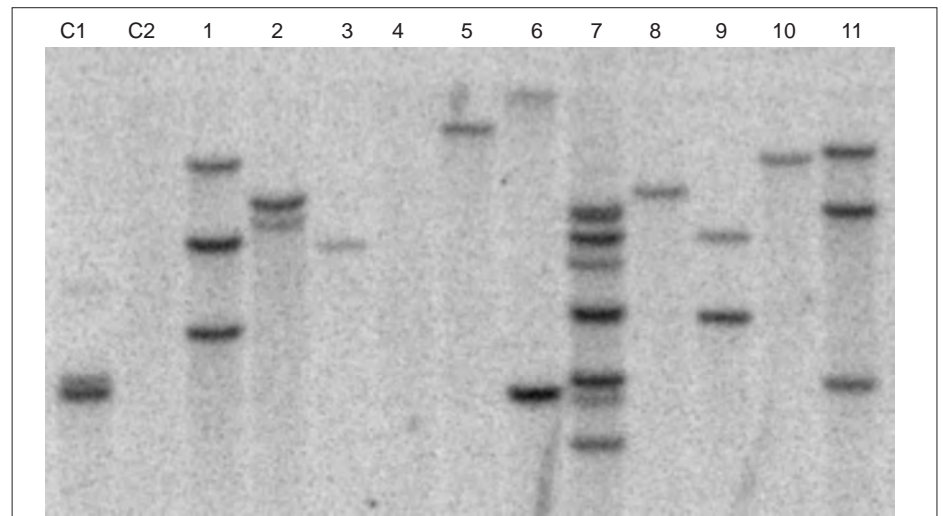


Figura 1 - Southern blot

NOTA: Resultado de análise de eventos transgênicos utilizando a técnica de *Southern blot*.

C1 - Controle positivo (evento transgênico); C2 - Controle negativo (planta selvagem); 1 a 11 - eventos transgênicos.

O número de bandas refere-se ao número de cópias do DNA alvo presente no genoma de cada evento analisado.

³ μg - Micrograma.

são o elevado custo de implementação, a alta complexidade operacional, o longo período de trabalho e a espera até a obtenção dos resultados e, no caso de utilização de sondas radioativas, há a necessidade de infraestrutura e capacitação adequada para manipulação e armazenamento de produtos radioativos.

Ensaio indireto: detecção a partir da presença de RNA

A informação genética contida no DNA precisa ser traduzida em proteína para que seja efetiva e promova reações em todo o organismo. Essa transferência de informação, DNA-proteína, só ocorre por causa da transcrição do DNA em moléculas de RNA mensageiro (mRNA). A síntese de mRNA pode ser considerada como a fase intermediária do processo de transferência da informação contida no DNA e reflete o nível de atividade deste, uma vez que a presença de mRNA está diretamente relacionada com a expressão gênica.

Existem diferentes técnicas moleculares para estudos de expressão gênica, nas quais genes em processo de transcrição podem ser detectados. Entre essas técnicas destaca-se a de *northern blot* e *reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR) ou transcrição reversa, seguida por reação em cadeia da polimerase. Essas técnicas podem ser empregadas para determinação da expressão gênica em diferentes tecidos e/ou diferentes estádios de desenvolvimento do organismo em estudo, bem como para monitorar a expressão gênica de DNA exógeno em OGMs.

Northern blot

A técnica de *northern blot*, também chamada RNA blot, foi desenvolvida para estudo da expressão gênica por meio da detecção de moléculas de RNA presentes na amostra (ALWINE; KEMP; STARK, 1977). A execução da técnica de *northern blot* é bastante semelhante à técnica de *Southern blot* e consiste basicamente de cinco etapas:

- extração do RNA total;
- separação dos fragmentos de RNA por eletroforese em gel de agarose;
- transferência e fixação do RNA presente no gel para uma membrana de nitrocelulose ou náilon;
- hibridização do RNA presente na membrana contra uma sonda de DNA ou RNA marcada, que possui homologia à sequência de RNA alvo;
- revelação da hibridização.

A etapa de extração de RNA total da amostra é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento da técnica, pois, para a obtenção de resultados confiáveis, é necessário que o RNA esteja intacto, puro e íntegro. Os cuidados durante o desenvolvimento da técnica são bem maiores que aqueles utilizados em *Southern blot*, uma vez que o RNA degrada mais facilmente. Para evitar a degradação, é preciso tratar todos os objetos com soluções específicas, a fim de eliminar ou minimizar a presença de RNases.

RT-PCR

A técnica de RT-PCR é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, por meio da detecção de moléculas de mRNA. Essa técnica baseia-se na transcrição reversa do mRNA seguida de uma reação de PCR, ou seja, primeiramente é produzida uma molécula de DNA complementar (cDNA) à molécula de mRNA (usando a enzima transcriptase reversa e iniciadores) e, então, utiliza-se esse cDNA produzido como molde para a PCR. O produto dessa amplificação é visualizado em gel de agarose. A intensidade das bandas visualizadas no gel pode indicar a quantidade do mRNA alvo presente na amostra. Dessa forma, considera-se que é uma técnica semiquantitativa.

Uma variável da técnica de RT-PCR é a RT-PCR quantitativa (qRT-PCR). O princípio dessa técnica é o mesmo da RT-PCR convencional, produção de cDNA seguido de PCR, porém mais robusta,

específica, sensível e, consequentemente, com resultados quantitativos. Na técnica de qRT-PCR, o progresso de amplificação da molécula alvo é visualizada em tempo real por meio da captação de sinal de moléculas fluorescentes e termocicladores mais sofisticados, como aqueles descritos anteriormente na técnica de qPCR.

Ensaio indireto: detecção a partir da presença de proteína

Bioensaios

Na maioria das plantas geneticamente modificadas, comercializadas até o momento, foram introduzidos genes que conferem tolerância a herbicidas e/ou resistência a vírus, fungos ou insetos (MARIOTTI; MINUNNI; MASCINI, 2002). A técnica de bioensaio para detecção de transgênicos nesses casos é relativamente simples, de baixo investimento e prática de ser estabelecida, tanto em laboratório, quanto em estufas de contenção, porém requer um tempo relativamente longo para obtenção dos resultados, que, geralmente, são conseguidos após uma ou mais semanas.

O bioensaio para tolerância a herbicida pode ser conduzido com a planta já desenvolvida ou mesmo com as sementes. No caso da planta, quando esta já se encontra desenvolvida, uma dose do herbicida é pulverizada sobre as folhas. Após a aplicação, as plantas são monitoradas diariamente para verificar a presença ou não de algum fenótipo (sintomatologia) decorrente da aplicação do herbicida. As folhas das plantas que não apresentam tolerância ao herbicida ficam inicialmente amareladas e então secam (o tecido sofre necrose) (Fig. 2). As folhas das plantas tolerantes ao herbicida simplesmente não apresentam sintoma de necrose ou apresentam pouco e as plantas continuam com o mesmo aspecto que apresentavam antes da aplicação do herbicida. No caso do bioensaio realizado com sementes, estas são colocadas para germinar em um meio contendo uma solução diluída do herbicida. Se a semente for



Figura 2 - Bioensaio para tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (PPT) em plantas de milho geneticamente transformadas com o gene *bar* que codifica a enzima phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT)

NOTA: A - Planta transformada de milho apresentando fenótipo de tolerância ao herbicida PPT após 10 dias de aplicação; B - Planta transformada de milho apresentando sintomas leves de clorose e necrose provocado pelo herbicida PPT após 10 dias de aplicação; C - Planta de milho convencional (não transformada), apresentando sintomas severos de clorose e necrose provocados pela aplicação de PPT.

tolerante ao herbicida, ocorrerá a germinação e a planta desenvolverá normalmente, como ocorre com as sementes do milho transgênico *Liberty Link*TM e da soja transgênica *Roundup Ready*TM (RR), tolerantes ao herbicida glifosato. Caso as sementes sejam sensíveis ao herbicida, não haverá a germinação. Atualmente, o bioensaio para tolerância a herbicida é comumente utilizado pelas companhias exportadoras de sementes e grãos, para comprovar a autenticidade e a qualidade dos produtos (TORRES et al., 2003).

Plantas resistentes a insetos também podem ser analisadas pelo método de bioensaio. Nesse caso, o bioensaio pode ser realizado colocando os insetos ou a sua forma larval, de acordo com o ciclo de desenvolvimento daquele inseto que ataca a planta, sobre as plantas a serem analisadas ou mesmo sobre discos foliares retirados dessas plantas. Dois tipos de informações podem ser obtidos a partir do ensaio: a mortalidade da praga e o dano causado pelas pragas no tecido analisado. A análise conjunta dessas informações indica se a planta é resistente ou não ao inseto em estudo.

O bioensaio baseia-se na expressão do gene de interesse e no fenótipo apresentado pelo OGM. Entretanto, uma desvantagem do método é que, geralmente, os resultados de bioensaio não são suficientes como provas definitivas da integração do DNA exógeno no genoma do organismo transgênico e outras evidências (resultados provenientes de outras técnicas) são necessárias para sua comprovação.

Imunoensaios

Os imunoensaios são métodos ideais para detecção qualitativa e/ou quantitativa de proteínas específicas produzidas a partir da sequência de DNA exógeno introduzida no OGM.

Os principais imunoensaios utilizados na detecção e quantificação das proteínas alvo, presentes nos OGMs, são o ensaio imunoenzimático – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *western blot* e imunoensaio de fluxo lateral (IFL).

Fotos: Geraldo M. A. Cançado

ELISA

O método ELISA permite identificar uma proteína alvo presente em um extrato proteico, contendo uma população de outras proteínas, por meio de anticorpos específicos que se ligam a essa proteína. Essa reação antígeno-anticorpo permite identificar a presença de proteína exógena de forma qualitativa e até mesmo quantitativa.

Existem vários tipos de ELISA, entre eles o ELISA-direto, ELISA-indireto, ELISA-sanduíche e ELISA-competitivo. O método ELISA-sanduíche, no qual se utilizam dois anticorpos (Ac) específicos para a proteína alvo, é o mais sensível e utilizado para detecção de OGMs (YATES, 1999). Nesse tipo de imunensaio são empregados dois tipos de anticorpos específicos para a proteína alvo: Ac primário ou de captura, utilizado para sensibilização da microplaca, que visa à captura da proteína alvo (antígeno - Ag) presente na amostra; Ac secundário ou conjugado, geralmente conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que atua sobre um determinado substrato, produzindo cor (ensaio colorimétrico) ou fluorescência, quando submetida a determinados comprimentos de onda (ensaio fluorimétrico).

A intensidade da cor produzida está diretamente ligada à quantidade de antígeno presente na amostra, uma vez que a coloração apenas ocorrerá quando a proteína alvo ligar-se ao anticorpo de captura presente na microplaca e, então, o anticorpo conjugado à enzima ligar-se à proteína alvo imobilizada (Fig. 3). Anticorpos e proteínas livres, ou seja, que não formaram o complexo Ac-Ag-Ac, são descartados durante as etapas de lavagem da microplaca. Dessa forma, não há a possibilidade de ocorrer resultados falso-positivos. Para ensaios quantitativos, utiliza-se uma curva de proteína padrão, cuja concentração é conhecida.

Os ensaios de ELISA-direto e ELISA-indireto são semelhantes ao ELISA-sanduíche, porém com algumas etapas modificadas. No ensaio de ELISA-direto, utiliza-se apenas o anticorpo específico para a proteína alvo, conjugado à enzima (Ac secundário). O extrato proteico é colocado na microplaca e, então, o anticorpo conjugado. Na etapa seguinte, o substrato é adicionado para que a enzima atue sobre este e a reação seja revelada. No ELISA-indireto, utiliza-se o Ac primário específico para a proteína alvo e o Ac secundário conjugado à enzima, porém específico para o Ac primário (anti-IgG dos organismos em que o Ac primário foi produzido,

geralmente em coelho ou camundongo). Nesse caso, o extrato proteico é colocado na microplaca e, a seguir, coloca-se o Ac primário. O Ac secundário é então adicionado à reação, reconhecendo o Ac primário, ligando-se ao complexo Ac-Ag. A etapa de revelação ocorre da mesma maneira como no ELISA-direto. Em muitos casos, o ensaio de ELISA-sanduíche é cerca de duas a cinco vezes mais sensível que os ensaios do tipo direto e indireto.

Uma variação do ELISA é o ensaio competitivo, no qual a proteína alvo, presente na amostra, e uma proteína padrão, conjugada a uma enzima competem pela ligação do anticorpo de captura. Nesse tipo de ensaio, a quantidade de proteína alvo é inversamente proporcional à intensidade colorimétrica produzida, pois, quanto mais proteínas padrão se ligarem ao anticorpo, mais intensa será a cor produzida pela reação. Por utilizar apenas um anticorpo específico, o ensaio competitivo é menos sensível que o método de ELISA-sanduíche.

O tipo de anticorpo utilizado nos imunoenaios também pode contribuir para uma maior sensibilidade ou especificidade do ensaio. Anticorpos monoclonais contribuem para uma maior especificidade da técnica, enquanto anticorpos policlonais

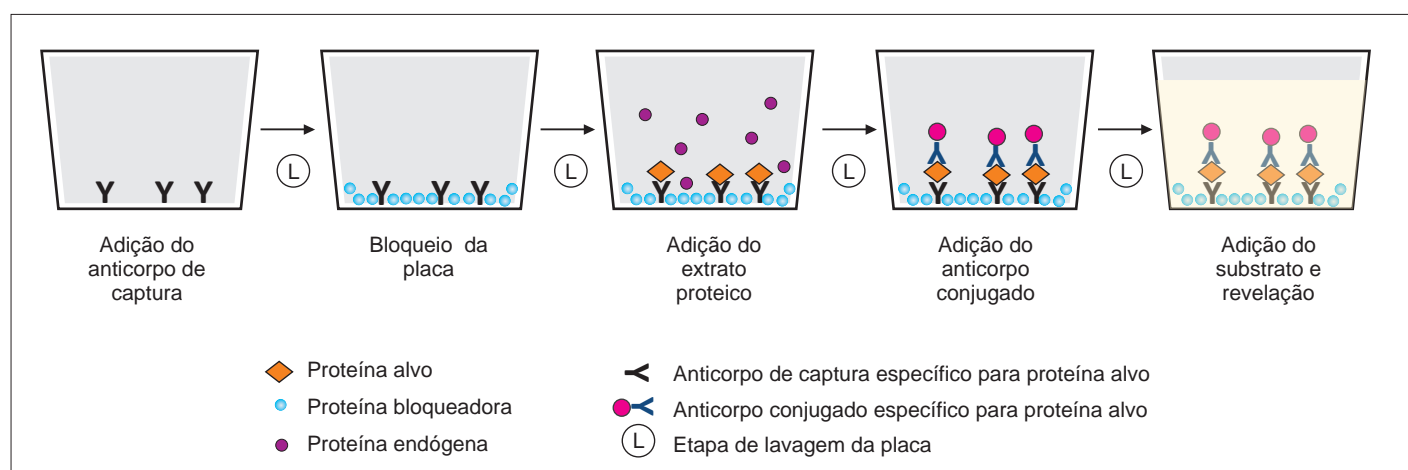


Figura 3 - Etapas do ensaio de ELISA-sanduíche

NOTA: Inicia-se com a sensibilização da microplaca com o anticorpo de captura. Após a lavagem da microplaca, faz-se o seu bloqueio. Em seguida, adiciona-se o extrato vegetal. A lavagem da placa é feita novamente e, posteriormente, é adicionado o anticorpo conjugado. Após incubação, a microplaca é lavada e então revelada pela adição do substrato.

umentam a sensibilidade, uma vez que podem reconhecer diferentes epítomos da proteína alvo (AHMED, 2002).

ELISA é uma técnica bastante sensível, específica, robusta, segura e rápida para a detecção de OGM em laboratório. Além disso, é ideal para a análise simultânea de um grande número de amostras em condições de rotina.

Western blot

A técnica *western blot* baseia-se na separação das proteínas presentes no extrato proteico da amostra em gel de poli-acrilamida não-desnaturante e posterior transferência para membranas de náilon ou nitrocelulose. A detecção da proteína alvo é feita por meio de anticorpos específicos que reconhecem os epítomos da proteína de interesse. A revelação do ensaio ocorre por reação colorimétrica ou radiográfica. Dessa maneira, o *western blot* combina a resolução de uma eletroforese com a especificidade da detecção imunológica (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

A separação eletroforética das proteínas presentes na amostra usualmente ocorre sob condições desnaturantes. Desse modo, problemas de solubilização, agregação e coprecipitação da proteína alvo com as outras proteínas presentes na amostra são eliminados (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Entretanto, anticorpos contra epítomos conformacionais da proteína alvo podem não reconhecê-la, quando desnaturada.

A técnica de *western blot* é semiquantitativa, específica e bastante sensível para detecção de proteínas (BRETT et al., 1999). O limite de detecção da proteína alvo depende de uma série de fatores, entre estes, o tipo de membrana e o sistema de detecção utilizados. Na maioria dos casos, esse limite corresponde a cerca de 20 fM (10^{-15} moles), ou seja, é possível detectar cerca de 1 ng de uma proteína, cujo peso molecular seja de 50 KDa (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998)⁴. Em análises de sementes, o limite mínimo de detecção é de 0,25% (YATES,

1999). Por ser uma técnica bastante laboriosa e capaz de analisar poucas amostras simultaneamente, o *western blot* é pouco utilizado na rotina de análise de OGMs. Geralmente, a técnica é empregada para confirmação de resultados preliminares gerados por outras técnicas de detecção.

Imunoensaio de fluxo lateral

O imunoensaio de fluxo lateral (IFL) é muito utilizado para análise de material ainda em campo e em triagens de produtos por ser um teste prático, não dispendioso e rápido. Os resultados são obtidos em um tempo que pode variar de 5 a 15 minutos. Outra vantagem desse método é que não necessita de equipamentos especiais e pessoal treinado. Entretanto, essa técnica não é robusta o suficiente para quantificação do material transgênico presente na amostra, mas é uma técnica bastante sensível para detecção qualitativa de OGMs (URBANEK - KARLOWSKA et al., 2001).

O princípio do IFL é semelhante à técnica de ELISA-sanduíche. O anticorpo de detecção está na extremidade da fita que é inserida na amostra em solução. A proteína alvo presente na amostra liga-se ao anticorpo presente na fita e então o complexo Ag-Ac migra por capilaridade até a outra extremidade da fita, onde existem duas zonas de captura. Nessas zonas de captura existem anticorpos específicos para a proteína alvo ou para o anticorpo de detecção. Quando o complexo Ag-Ac passa pelas zonas de captura, ocorre uma reação colorimétrica (Fig. 4). A presença de duas bandas coloridas na fita indica que o teste é positivo, ou seja, há presença da proteína transgênica na amostra analisada. A presença de apenas uma banda indica que a amostra é negativa, ou seja, não possui traços da proteína transgênica, porém o teste foi realizado corretamente (CONCEIÇÃO et al., 2004).

As fitas de IFL são produzidas comercialmente para detecção de uma vasta

gama de proteínas utilizadas na produção de OGMs. Plantas de soja, milho, canola, algodão e beterraba, geneticamente modificadas para conter a endotoxina Cry(Ab) de *Bacillus thuringiensis* ou as proteínas EPSPS-CP4 de *Agrobacterium thumefasciens*, podem ser facilmente analisadas, utilizando essa técnica (LIPTON et al., 2000).

Além da detecção de OGMs, os imunoensaios são poderosas ferramentas para a avaliação de expressão de um transgene. É possível identificar o local de expressão do transgene na planta, ou seja, em quais tecidos há presença da proteína (raiz, folha, semente, etc.) e a relação de expressão entre os diferentes tecidos que apresentam maior ou menor expressão do transgene.

TÉCNICAS ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DE OGMs

Em razão do crescente número de OGMs e da complexidade de modificações genéticas que estão surgindo, novas técnicas estão sendo desenvolvidas ou aprimoradas para acompanhar essa demanda. Metodologias estas com maior sensibilidade, confiabilidade, capacidade de análises simultâneas e baixo custo. Nessa linha, destacam-se os microarranjos de DNA (DNA *microarrays*), a cromatografia e a espectrometria de massa.

PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

A otimização e a validação das técnicas são importantes aspectos para a sua padronização como tecnologias de detecção de OGMs. Segundo Sutula (1996), os fatores que afetam a otimização incluem:

- a) determinação dos parâmetros internos: qualidade do material e reagentes, tempos de incubação, equipamentos;
- b) seleção do limiar: limites para resultados positivos e negativos;
- c) seleção de controles: positivo e negativo;

⁴fM - Femtomoles; ng - Nanograma; KDa - Quilodalton.

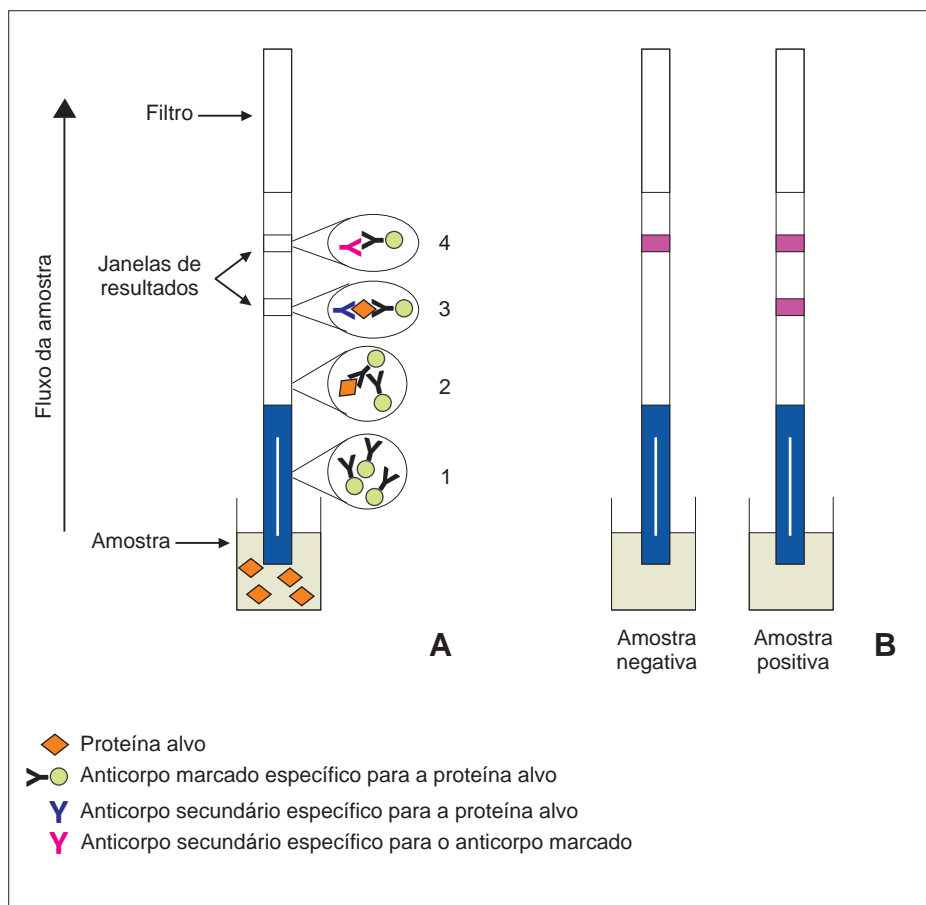


Figura 4 - Esquema do imunoenensaio de fluxo lateral (IFL)

NOTA: A - Uma das extremidades da fita de IFL é inserida no recipiente contendo a amostra vegetal. Por capilaridade, a amostra percorre a fita em direção à outra extremidade. Durante esse trajeto, a amostra passa pela região onde estão os anticorpos de captura (1) e a proteína alvo se liga. Anticorpos de captura complexados com a proteína alvo ou livres (2) migram e ligam-se a anticorpos específicos para a proteína alvo (3) ou a anticorpos específicos para os anticorpos de captura (4), respectivamente; B - Uma banda revelada na janela de resultado indica que a amostra é negativa (ausência da proteína alvo) e duas bandas indicam que a amostra é positiva (presença da proteína alvo).

d) ambiente de trabalho: capacitação técnica e experiência na execução de testes laboratoriais, problemas de contaminação ambiental ou pela pessoa que está executando o ensaio.

Os fatores que podem afetar a validação do método incluem:

- eficiência de extração em amostras;
- acurácia dos resultados;
- precisão;
- sensibilidade (limite de detecção);
- especificidade;

f) reprodutibilidade;

g) consistência e confiabilidade da detecção.

Um bom entendimento dessas características é essencial para a escolha do método de detecção, ou seja, aquele que terá o melhor desempenho e resultado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Processos de regulamentação de cultivares transgênicos requerem um amplo estudo do organismo modificado. Informações como o número de cópias do DNA exógeno inserido no genoma, nível de

expressão da proteína de interesse, partes da planta em que a proteína está sendo expressa, entre outras. Por essas e outras razões já descritas, numerosas técnicas para detecção de OGMs são normalmente utilizadas ou estão sendo desenvolvidas para ajudar na identificação, na determinação da taxa de pureza de lotes de sementes, na avaliação dos riscos à saúde e ao meio ambiente e na aprovação do cultivo de transgênicos.

O conhecimento sobre a constituição genética do OGM e as características principais de cada uma das técnicas é fundamental para a execução dos ensaios e obtenção de resultados precisos e confiáveis na detecção e avaliação do organismo transgênico. Muitas vezes, a simples integração do DNA exógeno no genoma hospedeiro não significa que o gene esteja sendo expresso e que a proteína alvo esteja sendo produzida. Dessa maneira, a combinação de mais de uma técnica de detecção pode ser necessária para a avaliação completa do OGM.

Diferentes entidades espalhadas pelo mundo estão envolvidas no desenvolvimento, validação e utilização de metodologias para detecção de OGM e seus produtos, de acordo com o foco e as preocupações regulatórias locais. Muitas dessas metodologias acabam sendo implementadas isoladamente, no local onde foram desenvolvidas, e não passam por avaliação de desempenho em outros laboratórios (validação interlaboratorial). Os testes interlaboratoriais fornecem dados de validação que proporcionam o estabelecimento de parâmetros de avaliação e constituem uma ótima base para comparação de dados. O desenvolvimento isolado das técnicas de detecção de OGM é um dos motivos que levam à necessidade de harmonização de metodologias e análise de amostragem entre as diversas entidades de pesquisa. A colaboração conjunta de organizações internacionais seria de grande importância para aprovação de tais metodologias e sua harmonização entre os laboratórios de análise.

REFERÊNCIAS

AHMED, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.5, p. 215-223, May 2002.

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hibridização with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n.12, p.5350-5354, Dec. 1977.

BERTHEAU, Y. et al. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, v. 85, n.3, p. 801-808, 2002.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 abr. 2003. Seção 1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4680.htm>. Acesso em:2009.

_____. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 set. 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078.htm>. Acesso em: 2009.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T de C. (Ed.). **Manual de transformação gené-**

tica de plantas. Brasília, EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 309p.

BRETT, G.M. et al. Design and development of immunoassays for detection of proteins. **Food Control**, v.10, n.6, p.401-406, Dec. 1999.

CONCEIÇÃO, FR. et al. Detecção de organismos geneticamente modificados. In: BINSFELD, P.C. **Biossegurança em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. p. 145-169.

GIOVANNINI, T.; CONCILLO, L. PCR detection of genetically modified organisms: a review. **Starch**, v.54, n.8, p.321-327, 2002.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.375, n.8, p.985-993, 2003.

LIPTON, C.R. et al. Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. **Food and Agricultural Immunology**, v.12, n.2, p.153-164, June 2000.

LÜTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**, v.10, n.6, p.359-361, Dec. 1999.

MARIOTTI, E.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detections. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, n. 2, p. 165-172, Feb. 2002.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food Chemical**

Toxicology, v. 42, n. 7, p. 1157-1180, July 2004.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed.). **Recombinante DNA: part F**. San Diego: Academic Press, 1987. p. 335-350. (Methods in Enzimology, 155).

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n.3, p. 503-517, Nov. 1975.

SUTULA, C.L. Quality control and cost effectiveness of indexing procedures. **Advances in Botanical Research**, v.23, p.280-292, 1996.

TORRES, A.C. et al. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1053-1057, set. 2003.

URBANEK-KARLOWSKA, B. et al. Usefulness of an immunoassay test trait for detection of genetically modified Roundup ready soybean in food products. **Rocz Panstwowy Zaklad Higieny**, v.52, n.4, p.313-320, 2001.

YAMAGUCHI, H. et al. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v.14, n.3, p.201-206, Apr. 2003.

YATES, K. Detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. **Food Control**, v.10, n.6, p.339-414, Dec. 1999.

Mudas de frutíferas

● morango ● laranja ● limão ● manga



Informações e aquisição:
 UNIDADE REGIONAL EPAMIG NORTE DE MINAS
 Rodovia MGT 122, Km 155 - Caixa Postal 12 - CEP 39525-000 - Nova Porteirinha - MG
 Telefax: (38) 3834-1760 - ctnm@nortecnet.com.br - ctnm@epamig.br




Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas

Lisete Chamma Davide¹

Vânia Helena Techio²

Roselaine Cristina Pereira³

Bárbara Dantas Fontes-Soares⁴

Giovana Augusta Torres⁵

Resumo - A Citogenética é considerada ferramenta de suporte indispensável nas etapas de planejamento, coleta e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de qualquer programa de melhoramento genético e conservação do germoplasma. As diferentes técnicas citogenéticas podem ser usadas estrategicamente na produção de dados para subsidiar decisões dos melhoristas e de pesquisadores durante a implantação do programa de melhoramento de plantas e animais. Entre as informações geradas podem-se citar a caracterização da ploidia, a determinação da frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, bem como a ocorrência de irregularidades espontâneas ou induzidas e as possíveis causas de irregularidades na segregação cromossômica que levam à produção de gametas inviáveis.

Palavras-chave: Cromossomo. Ciclo celular. Meiose. Viabilidade polínica. Hibridização *in situ*. Germoplasma.

INTRODUÇÃO

A ciência que estuda os cromossomos é denominada Citogenética. Teve a sua origem entre 1902-1903, quando Sutton e Boveri anunciaram a Teoria Cromossômica da Herança. A Citogenética preocupa-se com o número, a forma, a organização, a função e o comportamento dos cromossomos. Os primeiros citogeneticistas realizavam estudos descritivos que apresentavam somente o número de cromossomos em células somáticas e germinativas. Posteriormente, com o refinamento das técnicas citogenéticas e dos microscópios, foi possível realizar medições em cromossomos individuais e observar detalhes morfológicos em um dado complemento cromossômico. Com essas informações,

os citogeneticistas passaram a construir kariogramas (imagens dos cromossomos alinhados em um complemento) e a fazer comparações dentro e entre espécies, bem como a entender o comportamento dos cromossomos nos processos de divisão celular e reprodutivos.

Com o advento das técnicas de bandeamento, que evidenciam regiões diferencialmente coradas, passou-se a caracterizar o cromossomo não só pelo seu tamanho, posição do centrômero e constrições secundárias, mas também pela presença ou ausência de bandas mais ou menos intensamente coradas em regiões específicas. As técnicas de bandeamento, incluindo a utilização de fluorocromos e outros corantes, juntamente com várias modificações em pré-tratamentos, permitiram a identifi-

cação confiável de cromossomos e, a partir do final da década de 1960, a citogenética entrou em uma nova era.

O emprego de sinais fluorescentes marcou o início da citogenética molecular, que resulta da interação entre as técnicas da citogenética clássica, biologia celular e molecular. Essa classe de metodologias facilita a identificação de genomas específicos, cromossomos individuais, segmentos cromossômicos ou sequências específicas. Quando o DNA genômico é utilizado como sonda, o processo é denominado hibridização genômica *in situ* – *genomic in situ hybridization* (GISH) e possibilita a identificação de genomas parentais e o entendimento da sua organização. No entanto, quando segmentos de DNA, marcados com fluorocromos, são utilizados como sondas,

¹Bióloga, D.Sc., Prof. UFLA - Dep^{ta} Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: lcdavide@dbi.ufla.br

²Bióloga, D.Sc., Prof. UFLA - Dep^{ta} Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: vhtechio@dbi.ufla.br

³Eng^a Agr^a, Pós-Doc, UFLA - Dep^{ta} Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: rcristinapereira@yahoo.com.br

⁴Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: barbarafontes@epamig.br

⁵Eng^a Agr^a, D.Sc., Prof. UFLA - Dep^{ta} Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: gatorres@dbi.ufla.br

o processo é denominado hibridização fluorescente *in situ* – *fluorescent in situ hybridization* (FISH) e favorece o estudo de cromossomos individuais.

É relevante frisar que, mesmo antes de ser reconhecida como ciência, no período entre 1870 e 1890, a citogenética forneceu informações que constituíram a base para o entendimento dos fenômenos genéticos, por meio dos estudos sobre o comportamento dos cromossomos na mitose, meiose e fertilização. Os cromossomos foram reconhecidos como as entidades portadoras dos genes e a estrutura e o comportamento dos cromossomos como determinantes dos fenômenos genéticos e, conseqüentemente, dos mecanismos de herança. Por meio da citogenética, foi possível correlacionar a presença e a transmissão de uma dada característica (por exemplo: alteração morfológica na folha ou presença ou ausência de sementes em frutos) a uma entidade física, o cromossomo.

A confiabilidade nos dados citogenéticos está no fato de as características cromossômicas não serem influenciadas pelos fatores ambientais e isso contribuiu para que a citogenética estabelecesse interações com outras áreas do conhecimento, como: Taxonomia e Evolução, Medicina Clínica, Melhoramento Genético, entre outras.

No que diz respeito às contribuições da citogenética para os programas de melhoramento genético de plantas, destaca-se a caracterização do genoplasma disponível. Nesse contexto, entre as informações geradas, podem-se citar a caracterização da ploidia, a determinação da frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, bem como a ocorrência de irregularidades espontâneas ou induzidas e as possíveis causas de irregularidades na segregação cromossômica, as quais levam à produção de gametas inviáveis. Isto é, o melhorista precisa de informações gerais e específicas a respeito do material botânico que irá manipular. Essas informações devem ser obtidas no período do pré-melhoramento, que se trata de um elo entre os recursos genéticos e os programas de melhoramento.

Além da caracterização do germoplasma, as técnicas citogenéticas oferecem informações relevantes, quando são utilizados haploides na produção de híbridos, trissômicos terciários balanceados na produção de sementes híbridas e a utilização de variação genética exótica para a transferência de características de espécies silvestres para plantas cultivadas.

Neste artigo, serão descritas técnicas de citogenética e suas aplicações em programas de melhoramento de plantas.

TÉCNICAS DE ESTUDO E MANIPULAÇÃO DOS CROMOSSOMOS

Obtenção de células em mitose, meiose e viabilidade do pólen

O conhecimento da estrutura, morfologia e o comportamento dos cromossomos durante a mitose é fundamental para o entendimento da citogenética e dos princípios da genética. O estudo da mitose é importante, porque fornece informações, por meio do cariótipo, sobre o número e a morfologia dos cromossomos que compõem o genoma das espécies. A partir do cariótipo, é possível caracterizar e comparar espécies ou híbridos e estabelecer relações de parentesco, identificar alterações numéricas e estruturais dos cromossomos e correlacioná-las com alterações fenotípicas e, ainda, avaliar o efeito de substâncias e/ou do estresse ambiental sobre o ciclo celular.

O cariótipo de uma espécie é obtido a partir da observação de células meristemáticas no estágio da metáfase, momento quando os cromossomos estão bem condensados e visíveis ao microscópio de luz. Pontas de raízes ou gemas apicais são boas fontes de tecido meristemático, pela facilidade de obtenção e por apresentarem abundância de células em divisão, as quais absorvem rapidamente as soluções antimitóticas e os fixadores (Fig. 1).

Metáfases adequadas para análise e contagem de cromossomos indivi-

dualizados podem ser obtidas após pré-tratamentos realizados com agentes inibidores da formação do fuso mitótico, dentre eles, a colchicina, a 8-hidroxiquinoleína; o bromonaftaleno, a ciclohexamida e o tratamento a frio ou, ainda, a combinação de um ou mais compostos. Imediatamente após realizado o pré-tratamento, o material deve ser fixado em solução ácido-alcóolica, cujo objetivo é conservar a célula e suas estruturas em condições adequadas para análise. Para contagem de cromossomos, geralmente, utilizam-se técnicas de coloração convencional, pois constituem procedimentos rápidos, simples e com boa repetibilidade. Os corantes mais indicados para observação de cromossomos metafásicos são os que permitem um bom contraste entre o citoplasma e a cromatina, tais como, o Giemsa, a orceína e o carmim acético, o reativo de Schiff e a hematoxilina.

Na meiose, a fase ideal para o estudo cromossômico é a prófase I, especialmente durante o diplóteno, a diacinese e a metáfase I, quando se deseja determinar o número cromossômico, a frequência de quiasmas (que denota a ocorrência de permuta genética) e a relação de parentesco entre espécies, por meio da análise do pareamento dos cromossomos homólogos.

Para a maioria das plantas, o estudo da meiose masculina é mais frequente, em razão das facilidades com a técnica e com a obtenção de meiócitos a partir de anteras coletadas em botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 2). Quando o objetivo é avaliar somente os grãos de pólen para testes de viabilidade, devem ser coletados botões florais mais maduros. Na meiose feminina, é necessária realização de cortes anatômicos do ovário/saco embrionário, o que torna o procedimento mais complexo e demorado.

Após a fixação em solução ácido-alcóolica, segue-se a coloração dos meiócitos, cujos corantes mais utilizados são o carmim e a orceína.

Na avaliação da viabilidade do pólen, podem ser utilizados métodos de coloração e germinação. A coloração é um procedimento bastante simples, barato e que for-

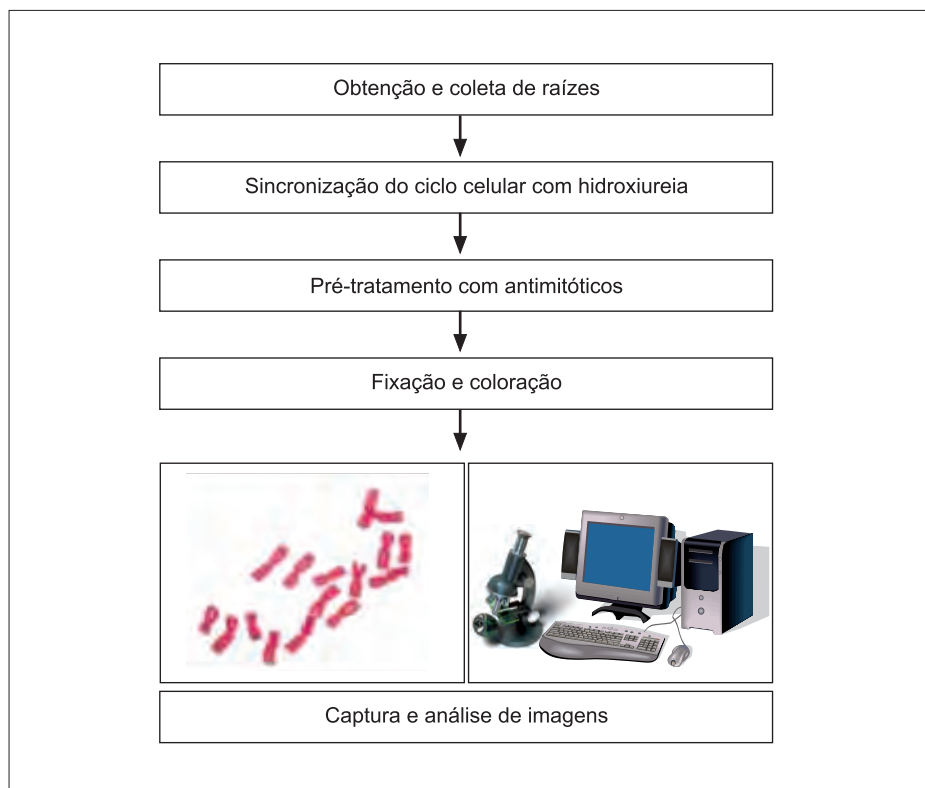


Figura 1 - Metodologia para a obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos

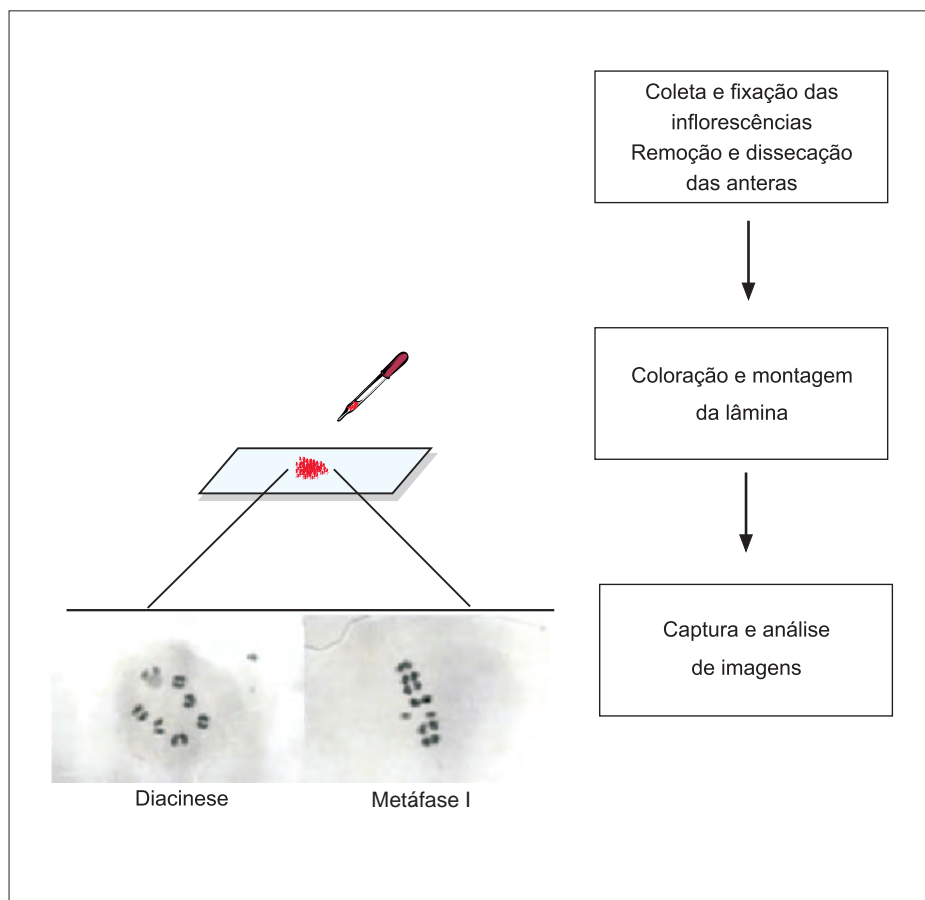


Figura 2 - Metodologia para obtenção de cromossomos meióticos

nece resultados rápidos. Considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, a estimativa é dada pela contagem dos pólenes não abortados e abortados, que se mostram com coloração diferenciada. Vários são os corantes empregados com essa finalidade, dentre esses o carmim, a orceína e o verde malaquita associado com fucsina ácida. A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não é totalmente confiável para todas as espécies, pois pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade. Nesse caso, pode-se optar pela observação da capacidade germinativa *in vivo* ou *in vitro* dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que se correlaciona diretamente com a habilidade para fertilização. Nos testes de germinação *in vivo*, deposita-se o grão de pólen no estigma receptivo. Após um determinado tempo, o estigma é removido para fazer a contagem do número de tubos polínicos emitidos. Nos testes de germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura que, geralmente, contém sacarose e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico.

No processo de montagem das lâminas do ciclo celular e de meiose, a técnica de esmagamento é a mais difundida entre os citogeneticistas. Mais recentemente, tem sido empregada a técnica de secagem ao ar, extensamente utilizada na citogenética animal e adaptada por Carvalho e Saraiva (1993), para observação de cromossomos de plantas.

Cortes histológicos do ovário podem ser utilizados para análises da estrutura do saco embrionário com o objetivo de fazer inferências sobre o modo de reprodução das plantas. Os diferentes tipos de saco embrionário que caracterizam a reprodução sexuada ou a apomixia podem ser analisados a partir da observação, em microscopia de interferência, de ovários fixados, desidratados e clareados ou, ainda, por meio de cortes ultrafinos seccionados com micrótomo, corados e visualizados em microscopia de luz de campo claro.

Os procedimentos apresentados para obtenção de células em mitose e meiose necessitam de modificações para diferentes genótipos. As lâminas obtidas com cromossomos bem definidos são necessárias para o emprego das técnicas que seguem.

Bandeamento cromossômico

As técnicas de bandeamento cromossômico consistem no uso de tratamentos e coloração diferenciais que permitem a discriminação dos cromossomos ou dos cariótipos que não são identificados por meio de coloração homogênea dos cromossomos. Essas técnicas evidenciam aspectos da organização e da morfologia cromossômica. Dentre as várias técnicas de bandeamento disponíveis, destacam-se o bandeamento C e suas modificações, a coloração com fluorocromos e a localização das regiões organizadoras do nucléolo por meio da impregnação pela prata.

O bandeamento C é usado para localização da heterocromatina constitutiva. Essa técnica é referida como um procedimento de desnaturação e renaturação, que se baseia na remoção diferencial do DNA presente nas regiões eucromáticas e heterocromáticas dos cromossomos, promovendo eliminações significativas de DNA e proteínas, principalmente nas regiões eucromáticas. Após a determinação do padrão de bandas C, essas podem ser caracterizadas por apresentar maior frequência de pares de bases guanina/citosina (GC) ou adenina/timina (AT) por meio do bandeamento fluorescente. A manipulação no protocolo básico do bandeamento C, especialmente em relação às etapas de desnaturação e renaturação, resultou no desenvolvimento das técnicas de bandeamento CT e CD, as quais evidenciam o centrômero, e HKG, que revela um padrão de bandas heterocromáticas diferenciadas daquelas produzidas pelo bandeamento C.

Com a aplicação dos fluorocromos, surgiu o bandeamento fluorescente, que, pela especificidade de ligação com as sequências de bases nitrogenadas do DNA, permitiu uma caracterização mais precisa dos diferentes segmentos cromossômicos.

Os fluorocromos mais utilizados em vegetais são a cromomicina A₃ (CMA), que evidencia sequências repetitivas ricas em GC, e o 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que identifica sequências repetitivas ricas em AT. Outros corantes, como o Hoechst 33258 e a quinacrina, apresentam propriedades semelhantes ao DAPI. A mitamicina e a olivomicina, que são isômeros da cromomicina e marcam regiões ricas em GC, também, são utilizadas.

Outra técnica de bandeamento é a que utiliza o nitrato de prata (AgNO₃) para a marcação das regiões organizadoras do nucléolo ou RONS, denominada banda Ag-NOR. Essa banda revela sítios de DNA ribossômico que estiveram ativos na interfase e, muitas vezes, localizam-se na constrição secundária do cromossomo. Quando esses sítios formadores de nucléolo são identificados por hibridização *in situ*,

todas as RONS, ativas ou não, são identificadas.

Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é uma técnica desenvolvida há mais de 30 anos para localizar sequências de ácidos nucleicos diretamente nos cromossomos e vem sendo extensivamente usada na citogenética.

O princípio da técnica de hibridização *in situ* baseia-se no fato de que a molécula de DNA é formada por duas fitas complementares que podem ser facilmente separadas em fitas simples (Fig. 3). Sob condições adequadas, é possível promover a renaturação do DNA, que volta ao estado de fita dupla. Portanto, se durante a renaturação do DNA houver sondas disponíveis, com sequências complementares marcadas em torno do cromossomo, as cópias da sonda

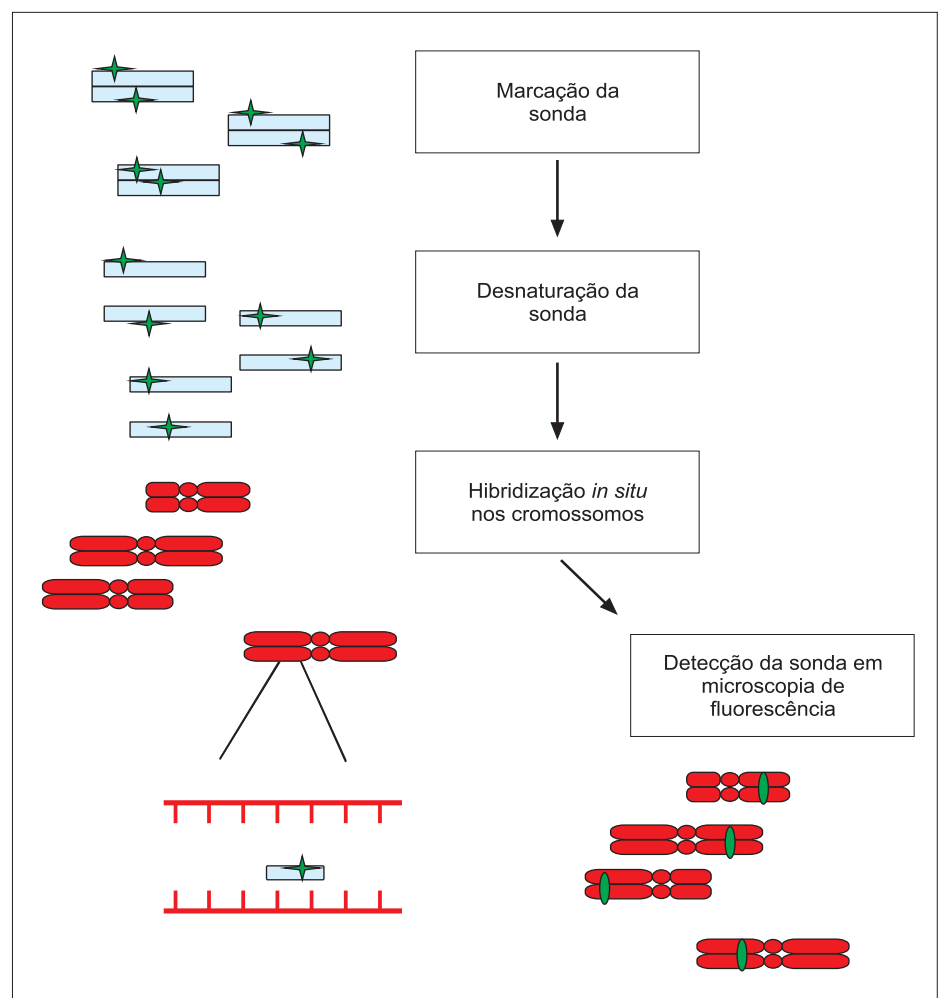


Figura 3 - Etapas da hibridização *in situ*

competirão com fitas de DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no local em que aquela sequência ocorre naturalmente. Há duas técnicas de hibridização *in situ* empregadas na citogenética, a FISH e a GISH.

Na FISH, a sonda é uma sequência de ácido nucleico, marcada com fluorocromos, como por exemplo um transgene, genes para DNAr 45S e 5S, sequências teloméricas e centroméricas. A marcação da sonda pode ser feita pela substituição de alguns de seus nucleotídeos por nucleotídeos idênticos conjugados a fluorocromos ou a moléculas marcadoras localizadas posteriormente, utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos. Nesse caso, as moléculas mais utilizadas são a biotina e a digoxigenina, enquanto que os fluorocromos mais usados para sinalizar a presença de sondas são o isotiocianato de fluoresceína (FITC), de cor verde, e a rodamina ou o vermelho texas, ambos de cor vermelha. Como contracorante usam-se mais comumente o Hoechst, o DAPI ou o iodeto de propídio. Essa técnica auxilia na identificação e caracterização de bandas específicas nos cromossomos, auxiliando na elaboração de mapas físicos, e também permitindo a identificação do padrão de inserção de transgenes no genoma de plantas transformadas (Fig. 4).

Na GISH, a sonda é o DNA genômico de uma espécie e vem sendo aplicada para análise de híbridos interespecíficos e no estudo evolutivo de diversas espécies poliploides. As sondas são marcadas de forma semelhante ao FISH e permitem distinguir complementos cromossômicos inteiros.

Em ambas, a análise da coloração e a identificação dos sinais fluorescentes são feitas em microscópio de fluorescência.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência), radiação laser ou fluxo hidrodinâmico de partículas biológicas (células, núcleos, cromossomos, organelas), associadas a fluorocromos que fluem numa suspensão líquida isotônica

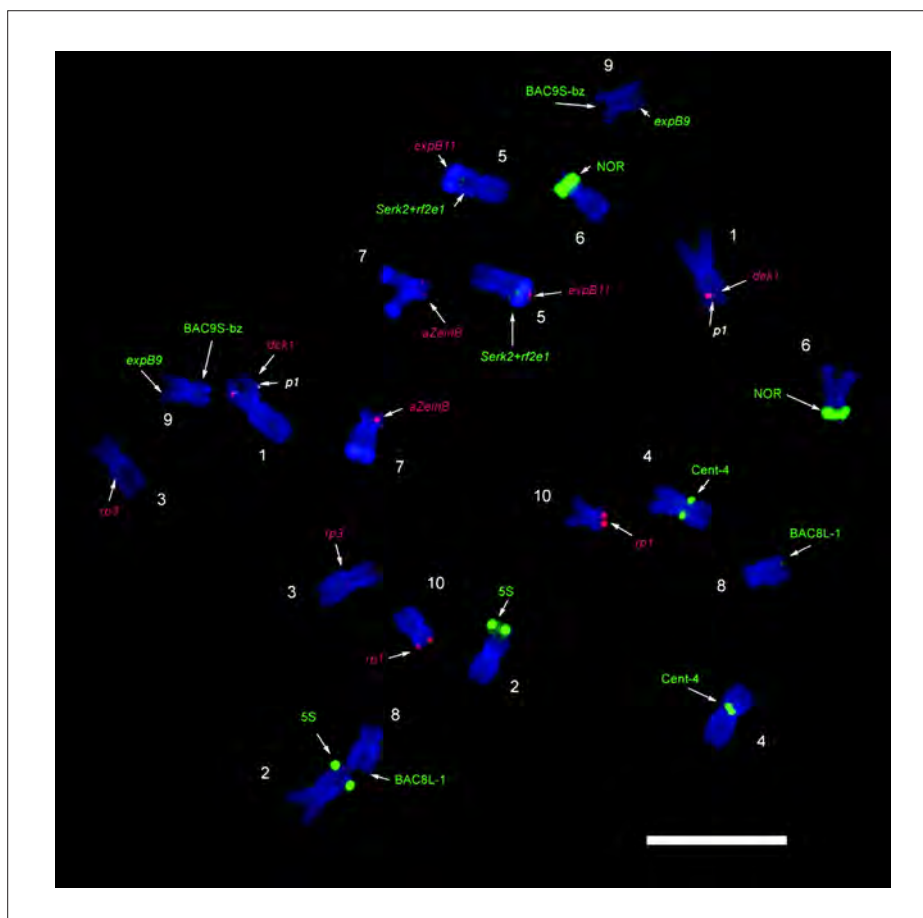


Figura 4 - Técnica FISH em cromossomos de milho identificando vários genes pela hibridização *in situ* de sondas fluorescentes

FONTE: Lamb et al. (2007).

NOTA: FISH - fluorescent *in situ* hybridization.

em um equipamento chamado citômetro de fluxo. Os dados obtidos permitem a determinação de algumas características estruturais e funcionais das partículas analisadas. A quantificação de DNA nuclear, muitas vezes com alta resolução, tem sido usada com sucesso na avaliação de ploidia e na comparação de cariótipos em diferentes espécies de plantas.

Na citometria de fluxo, as partículas em suspensão líquida são aspiradas e hidrodinamicamente contidas no centro de uma câmara de fluxo, que se encontra envolta por um fluido contínuo, cuja velocidade é muito maior do que aquela apresentada pela suspensão líquida. As partículas presentes nessa suspensão saem dessa câmara uma por vez, passando por um foco de luz intensa com uma ou mais fonte de iluminação (laser e/ou lâmpada

de vapor de mercúrio). Os fluorocromos presentes nas partículas são excitados e emitem luz de acordo com suas características fluorescentes. Os pulsos de luz e de fluorescência gerados são colhidos por um sistema de detecção ótica, separados por filtro e convertidos em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescência captada por fotomultiplicadores. Esses sinais elétricos são amplificados e convertidos em pulsos analógico-digitais que, por sua vez, são processados por analisadores em vários canais. Os sinais de cada partícula acumulam-se em tempo real na forma de histogramas, que são visualizados no monitor de um computador (Fig. 5).

Esse procedimento permite verificar, simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de

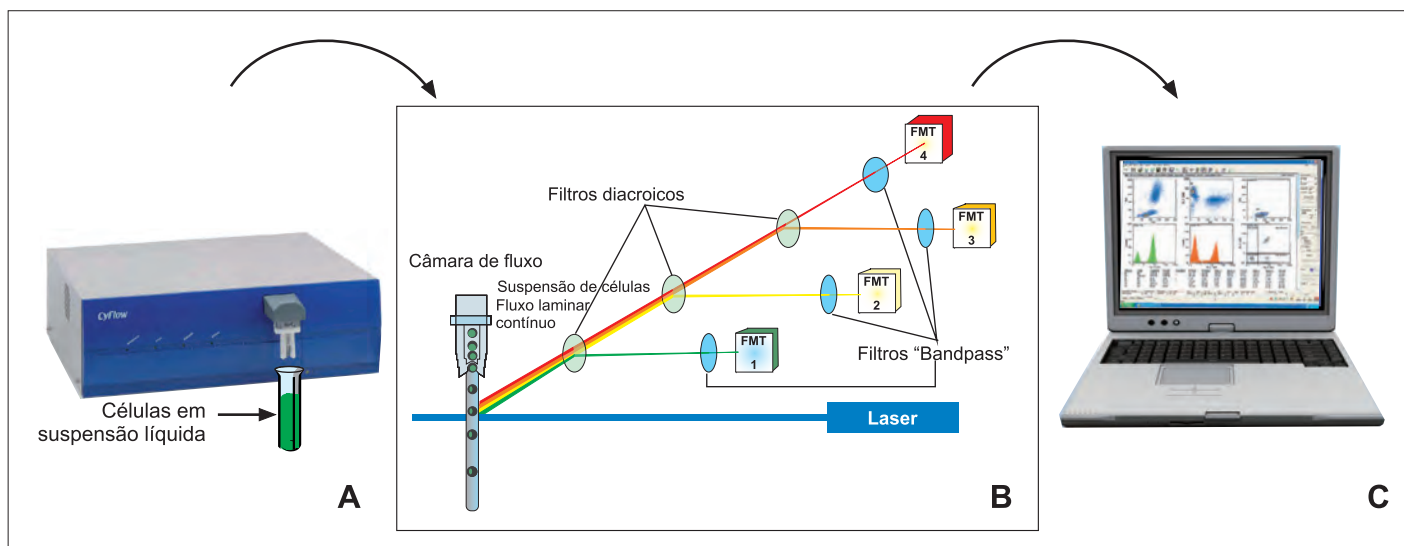


Figura 5 - Funcionamento de um citômetro de fluxo

FONTE: A e C – FK-Biotec (2009); B - Santa (2006).

NOTA: A - Citômetro de fluxo modelo CyFlow SL Blue; B - Partículas suspensas e centralizadas em um fluxo contínuo que permite que cada partícula passe individualmente pelo feixe de laser que excita os fluorocromos presentes, emitindo luz e fluorescência que é captada, filtrada por sistema óptico e transmitida para sistema eletrônico, que converte estes sinais em valores analógico-digitais, disponibilizando-os para análise em computador; C - Computador em que *software* específico permite originar diagramas de acordo com o número de parâmetros, analisar e armazenar dados gerados.

cada parâmetro. A amostragem dos dados, as análises e a interpretação podem ser realizadas por *softwares* específicos. As partículas são analisadas individualmente a uma velocidade elevada, permitindo que populações numerosas de células e organelas possam ser medidas num espaço de tempo relativamente curto, com elevada sensibilidade e precisão.

APLICAÇÕES DA CITOGENÉTICA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

A citogenética é considerada ferramenta de grande valor nas etapas de planejamento, coleta e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de qualquer programa de melhoramento genético e conservação do germoplasma.

As diferentes técnicas citogenéticas podem ser usadas estrategicamente na produção de dados para subsidiar decisões dos melhoristas e pesquisadores durante a implantação do programa de melhoramento, pois permitem o conhecimento da diversidade genética, o entendimento da

estrutura citogenética e nível de ploidia e das relações filogenéticas entre as espécies, contribuindo para redução de tempo na seleção de genótipos para cruzamentos.

Caracterização de germoplasma

O estabelecimento de uma coleção de germoplasma requer a caracterização dos genótipos/acessos quanto aos aspectos agrônomo, botânico, molecular e citogenético. Nesse sentido, a citogenética oferece inúmeras opções de análise e diagnóstico que podem ser empregadas, tais como: análise cariotípica (número e morfologia dos cromossomos) por coloração convencional; padrão de bandeamento cromossômico e localização de sequências via FISH e GISH, para comparações mais refinadas e conteúdo de DNA, que permite averiguar as variações no tamanho do genoma de espécies e de híbridos diploides e poliploides.

Um dos exemplos bem-sucedidos da interação dos conhecimentos produzidos pela citogenética e a caracterização de germoplasma é o dos estudos com o gê-

nero *Pennisetum*. As análises realizadas permitiram estabelecer e/ou confirmar o número de cromossomos para acessos de capim-elefante (*P. purpureum*), milheto (*P. glaucum*), *P. setosum* e *P. nervosum*, híbridos interespecíficos e hexaploides. Para alguns desses acessos, também foi possível estabelecer a identificação botânica. Dos acessos caracterizados, mais de 30% estavam erroneamente denominados no banco ativo de germoplasma. Além disso, foram feitas descrições de complementos cromossômicos de famílias completas, envolvendo parentais e híbridos entre capim-elefante e milheto, as quais permitiram estabelecer as relações cariotípicas (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003; TECHIO et al., 2002). As análises mitóticas confirmaram a natureza híbrida de acessos e permitiram reconhecer alguns cromossomos das espécies parentais nesses híbridos.

Utilizando o bandeamento C, Badaeva et al. (2007) estudaram a diversidade cromossômica e a presença de alterações estruturais em acessos de trigo e triticale de diferentes regiões da Europa, Ásia e EUA. Cerca de 70% dos acessos de trigo e

92% dos acessos de tritcale apresentaram cariótipos normais, sem grandes rearranjos cromossômicos. Os acessos que diferiram apresentaram polimorfismo para a distribuição das regiões de heterocromatina e, em alguns casos, pequenas alterações estruturais. Em outro estudo, Shelukhina et al. (2007), usando simultaneamente bandeamento C e hibridização *in situ*, compararam as espécies de aveia tetraploides (*Avena insularis*, *A. magna* e *A. murphyi*) com genomas A e C. De acordo com os dados obtidos nesse trabalho, os autores concluíram que *A. insularis* e *A. magna* são espécies próximas, enquanto *A. murphyi* encontra-se mais distante das duas. Provavelmente, as três espécies apresentam um ancestral tetraploide comum e a divergência ocorreu por causa de rearranjos cromossômicos, sendo que a evolução da espécie *A. murphyi* foi independente das outras duas.

Exemplos semelhantes de aplicações da citogenética na taxonomia e no melhoramento de plantas foram obtidos para espécies dos gêneros *Brachiaria* (MENDES-BONATO et al., 2002) e *Arachis* (PEÑAZOLA, 2006), entre outros.

Determinação do nível de ploidia como base para cruzamentos

Os programas de melhoramento genético e as coleções de germoplasma geralmente dispõem de vários genótipos/acessos, que apresentam diferentes números básicos de cromossomos, quantidade de DNA e níveis de ploidia. O conhecimento dessas características citogenéticas é um pré-requisito para realização de introgressões e cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Algumas dessas informações podem ser obtidas por meio da quantificação de DNA, certificação do número de cromossomos e também determinação do número de sítios de DNAr com uso da FISH.

A ampliação da base genética da espécie em estudo pode ser obtida recorrendo-se a genótipos exóticos e silvestres. Em geral, espécies silvestres e exóticas

são menos produtivas que as cultivadas, entretanto, podem conter alelos importantes relacionados com a resistência a fatores bióticos e abióticos que podem ser transferidos para as espécies cultivadas. No caso da batata cultivada (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), um dos problemas encontrados em relação à transferência de genes é a diferença de ploidia entre os genótipos silvestres, que são diploides ($2n=2x=24$), e a espécie cultivada que é tetraploide ($2n=4x=48$). Esse cruzamento pode ser viabilizado a partir da produção de dihaploides da espécie cultivada. Os híbridos obtidos são geralmente vigorosos, apresentam pareamento cromossômico e recombinação efetivos e são férteis. No entanto, apesar de vigorosos, geralmente possuem muitos caracteres indesejáveis herdados dos materiais silvestres. Isso é contornado realizando-se retrocruzamentos com cultivares de *S. tuberosum*, para produzir progênies tetraploides. Para isso, torna-se necessário que o híbrido diploide produza gametas não reduzidos (pólen $2n$). Esses gametas também transferem níveis variáveis de heterozigiosidade à progênie, de acordo com o seu mecanismo de formação. Dessa forma, averiguações citogenéticas tornam-se necessárias em várias etapas do programa de melhoramento genético da batata. É preciso certificar-se de que a indução da dihaploidia ocorreu e se os dihaploides estão produzindo pólen em abundância e com alta viabilidade. A certificação da ploidia pode ser feita por meio de contagens cromossômicas ou citometria de fluxo, e a abundância e viabilidade dos grãos de pólen por testes de coloração e germinação. Outro ponto importante é a necessidade da avaliação da produção de pólen $2n$ e dos mecanismos pelos quais os clones obtidos do cruzamento interespecífico os formam. Essas avaliações são feitas por meio de medições dos grãos de pólen e análises meióticas (TOMÉ et al., 2009).

No melhoramento do capim-elefante, a manipulação da ploidia tem sido empregada para restaurar a fertilidade dos híbridos triploides ($2n=3x=21$, genoma AA'B), en-

tre o milheto ($2n=2x=14$ e os genomas AA) e o capim-elefante ($2n=4x=28$ e genoma A'A'BB). Embora estéreis, esses híbridos apresentam caracteres de importância forrageira superiores aos encontrados nos genitores, o que os torna um material atrativo para o melhoramento genético. A superação da barreira da esterilidade tem sido obtida com a utilização de agentes antimitóticos, para promover sua duplicação cromossômica. Várias metodologias foram empregadas gerando, na maioria das vezes, plantas mixoploides com número de cromossomos variando entre 14 e 42. Híbridos hexaploides artificiais nacionais foram obtidos recentemente, produzindo grãos de pólen viáveis, os quais estão sendo empregados no programa de melhoramento do capim-elefante (BARBOSA et al., 2007).

O interesse na obtenção desses hexaploides, além da restauração da fertilidade, reside na possibilidade de obtenção de novas combinações gênicas ou raças cromossômicas a partir do retrocruzamento desses com seus parentais tetraploide (capim-elefante) e diploide (milheto). Espera-se que do cruzamento do hexaploide com o capim-elefante sejam produzidos híbridos pentaploides com $2n = 5x = 35$ cromossomos (genomas AA'A'BB) e quando cruzado com o milheto produzam híbridos tetraploides com $2n = 4x = 28$ cromossomos (genomas AAA'B). Após a indução realiza-se a certificação da duplicação cromossômica.

Na cultura do cafeeiro, a quantificação de DNA tem-se mostrado útil na identificação dos parentais de híbridos interespecíficos. Fontes (2003), utilizando citometria de fluxo, investigou a origem de híbridos naturais em café, identificando-os como triploides (3C) e, pelo monitoramento do conteúdo de DNA, determinou que esses híbridos resultaram do cruzamento entre *Coffea racemosa* (2C) e *C. arabica* (4C). A citometria de fluxo também permitiu determinar a quantidade de DNA do híbrido de Timor (4C), resultante do cruzamento natural entre *C. arabica* (4C) e *C. canephora*

(2C), que, por apresentar baixo teor de cafeína, valoriza extraordinariamente esse material como germoplasma básico para o melhoramento de *C. arabica*. Clarindo e Carvalho (2009) associaram dados cariotípicos e de citometria de fluxo para obter o conteúdo de DNA de cada cromossomo de *C. arabica* e *C. canephora*, confirmando que *C. arabica* é um alotetraploide originado do cruzamento entre espécies diploides de *Coffea* e que *C. canephora* é um dos seus possíveis genitores.

Outra forma de inferir o nível de ploidia pode ser pela identificação do número de sítios de DNAr definidos por FISH ou por meio de coloração com nitrato de prata (banda NOR). Utilizando FISH, Melo e Guerra (2003) analisaram espécies silvestres e cultivadas de *Passiflora* com números cromossômicos predominantes de $n=6$ e $n=9$. Os resultados mostraram que o número de sítios de DNAr 5S e 45S é mais alto nos grupos com $n=9$, reforçando a hipótese da origem desse grupo por poliploidia.

Aspectos reprodutivos

Metodologias citogenéticas podem ser empregadas para gerar informações sobre os aspectos reprodutivos das espécies. Análises do comportamento dos cromossomos durante a meiose podem fornecer explicações para a ocorrência de infertilidade total ou parcial encontradas em diferentes espécies de plantas e de híbridos. A presença de configurações cromossômicas univalentes e diferentes tipos de multivalentes nos meiócitos são algumas das características usadas para diagnóstico da homologia cromossômica. Essas configurações podem ser observadas nas diacineses e metáfases e também nas anáfases e telófases, por meio da segregação irregular. Ao final da meiose, nos estádios de tétrade e micrósporos, a ocorrência de micronúcleos é reflexo do comportamento irregular dos cromossomos, indicando que estes não foram incorporados aos núcleos em formação, o que resulta na formação de grãos de pólen inviáveis.

Estudos meióticos, realizados em *Pennisetum*, descreveram o comportamento cromossômico e a viabilidade do pólen por meio de coloração e germinação nos genótipos parentais milheto e capim-elefante e seus híbridos correspondentes (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). De modo geral, o milheto e o capim-elefante apresentaram meiose regular e alta viabilidade do pólen, demonstrada por meio de coloração. Para os híbridos interespecíficos e para os hexaploides nacionais e americanos, diferentes tipos de anormalidades meióticas, principalmente relacionadas com a segregação irregular dos cromossomos, resultaram na formação de grãos de pólen aneuploides e inférteis. Os resultados permitiram verificar alta correlação negativa entre a fertilidade do pólen e as irregularidades meióticas e uma correlação alta e positiva entre fertilidade-estabilidade meiótica.

Outras informações sobre o modo de reprodução e período que os gametas se mantêm viáveis, após armazenamento, também podem ser obtidas por meio de análises citogenéticas.

Em relação ao modo de reprodução, o maior interesse é na identificação de genótipos apomíticos, os quais já foram descritos para um grande número de espécies, tais como em *Citrus*, maçã e gramíneas. Quando introduzida em cultivares importantes, a apomixia pode tornar-se um meio econômico para perpetuar um genótipo conhecido, preservando características como heterose, por meio de sucessivas gerações, via sementes. As plantas apomíticas podem também fornecer uma fonte constante renovável de sementes capazes de proporcionar uma alta produção de grãos.

O gênero *Brachiaria* reúne espécies diploides com reprodução sexual e poliploides apomíticas. Esta característica é interessante, porque possibilita a realização de experimentos, visando à transferência dos genes responsáveis pela apomixia de variedades apomíticas para espécies sexuais relacionadas. Estudos conduzidos para

identificar plantas apomíticas e sexuais a partir de análises citológicas, fenotípicas e moleculares foram realizados por Valle e Savidan (1996). Dentre os 251 acessos de 14 espécies de *Brachiaria* analisadas, os autores verificaram que ocorre tanto apomixia, quanto sexualidade dentro da mesma espécie. Para inferir o modo de reprodução nesse grupo, foram analisados ovários fixados, desidratados e clareados, visando identificar a estrutura do saco embrionário do tipo Polygonum ou Panicum.

O armazenamento de pólen justifica-se, quando se deseja realizar hibridações entre parentais que não apresentam sincronismo no florescimento ou estão em regiões geográficas distintas. Essa prática confere maior plasticidade para a realização das polinizações. Além disso, o pólen armazenado pode ter sua viabilidade testada previamente pelo uso de corantes ou testes de germinação *in vitro*, que garante o sucesso das polinizações. Em *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* foi possível armazenar pólen por até três meses sem que houvesse queda da viabilidade, a ponto de impedir o seu uso nas hibridações controladas. Esse tempo é mais do que suficiente para dar maior flexibilidade às atividades de hibridação dos programas de melhoramento dessas espécies (PEREIRA et al., 2002).

Os métodos de avaliação da viabilidade do pólen também podem ser empregados para identificar indivíduos machos estéreis. Essa identificação elimina o processo de emasculação, tornando os procedimentos de polinização mais rápidos e menos dispendiosos.

Análise genômica

A análise genômica, por meio de estudos meióticos clássicos ou por citogenética molecular (FISH e GISH), constitui um excelente recurso de análise citogenética com aplicabilidade direta nos programas de melhoramento de plantas, pois a estimativa da afinidade genética fornece um indicativo da melhor combinação para troca de alelos entre as espécies.

A análise genômica, em seu sentido mais restrito, inclui o estudo do pareamento cromossômico na metáfase I da meiose em híbridos, com o propósito de estabelecer relacionamentos filogenéticos entre um grupo de organismos. A metodologia baseia-se no pressuposto de que somente cromossomos similares (homólogos) pareiam na meiose e que o grau de pareamento nos híbridos reflete o grau de relacionamento entre as espécies parentais. As análises genômicas com FISH e GISH possibilitam detalhar melhor a estrutura do genoma, identificar regiões homólogas e duplicadas nos cromossomos e, no caso da GISH, elucidar a origem de complementos cromossômicos. Em ambas as análises, é possível estimar o pareamento cromossômico e o grau de relacionamento genético entre parentais de híbridos poliploides, usando modelos matemáticos.

Resultados aplicáveis ao Programa de Melhoramento Genético do Capim-elefante foram obtidos a partir de análises meióticas convencionais em híbridos triploides entre capim-elefante (*P. purpureum*) e o milheto (*P. glaucum*). Usando modelos matemáticos, foi possível demonstrar quantitativamente a proximidade genética em diferentes combinações híbridas, envolvendo acessos de milheto e capim-elefante. Esses dados associados às informações de fertilidade, irregularidades e estabilidade meióticas fornecem subsídios úteis, quando o objetivo é a transferência de alelos (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005).

As técnicas GISH e GISH multicolor foram utilizadas por Han et al. (2004) na determinação da constituição citogenética de cinco linhagens anfignoides obtidas a partir de cruzamentos entre trigo x *Thinopyrum intermedium*. Os dados obtidos permitiram verificar que ocorre transferência intergenômica de segmentos de cromossomos e/ou introgressão de sequências nos anfignoides sintetizados independente do seu comportamento diploide e herança dissômica. Outro estudo que envolve o uso de GISH, associado à

imunolocalização, foi conduzido por Leflon et al. (2006) com híbridos de *Brassica napus* (genoma AAC) x *Brassica rapa* (genoma AA). Na maioria dos meiócitos, os cromossomos homólogos do genoma A parearam regularmente, enquanto os cromossomos do genoma C permaneceram como univalentes, mas também estavam envolvidos em pareamentos homeólogos. A taxa de transmissão dos cromossomos C dependeu de um cromossomo particular e da forma como o híbrido foi cruzado, como parental masculino ou feminino, para *B. napus* ou *B. rapa*. As transferências de genes nos híbridos triploides foram favorecidas entre os genomas A e B das duas espécies, mas também ocorreram entre A e C em taxas menores.

Obtenção de linhas de adição e substituição

Os programas de melhoramento genético muitas vezes defrontam-se com problemas para transferência de genes de interesse, encontrados nos genótipos silvestres para cultivados, pela baixa capacidade de cruzamento entre ambos. A superação dessa barreira pode ser feita por meio da produção de linhas de adição e de substituição.

É preciso considerar também que nem sempre interessa introgridir todo o genoma silvestre na espécie cultivada. Ao contrário, se for possível fazer um cruzamento mais seletivo, isso se torna vantajoso para o programa. As linhas de adição consistem na introdução de um ou dois cromossomos da espécie silvestre para a cultivada, constituindo, respectivamente, linhas monossômicas e dissômicas. Resumidamente, o procedimento envolve a produção de um híbrido interespecífico ou intragenérico e a duplicação de seus cromossomos. Posteriormente, deve ser feito um retrocruzamento com a planta receptora e o isolamento de monossômicos em um segundo retrocruzamento, seguido da seleção de linhas de adição dissômica após a autofecundação de linhas monossô-

mic. A citogenética permite identificar os cromossomos adicionados por meio da morfologia e tamanho do cromossomo, principalmente com técnicas de bandejamento e FISH. Análises meióticas também podem contribuir para identificação desses cromossomos adicionados, pois em linhas monossômicas, permanecem como univalentes e, nos dissômicos, como bivalentes na diacinese e metáfase I. Os níveis de fertilidade dessas linhas de adição são variáveis, mas os dissômicos tendem a ser mais férteis, pois se espera que os bivalentes apresentem um comportamento meiótico normal.

As linhas de substituição podem envolver um genoma inteiro, cromossomos ou segmentos cromossômicos e são boas alternativas para ampliar a variabilidade genética. O procedimento para substituição genômica envolve o cruzamento entre a espécie cultivada e a silvestre, seguida por retrocruzamentos recorrentes para eliminar os caracteres indesejáveis da espécie cultivada, originando uma cultivar modificada denominada aloplásmica. Geralmente, essas linhas aloplásmicas são resgatadas por cultura de embriões. A substituição cromossômica pode ser feita entre genótipos com proximidade genética, promovendo a substituição de um cromossomo ou um par de cromossomos no genoma da espécie cultivada. Esse procedimento prevê, inicialmente, o cruzamento de uma linha de adição monossômica de uma espécie com uma linha dissômica da outra espécie. A completa substituição de um par cromossômico é obtida após a seleção e autofecundação de plantas F1. A substituição de um segmento cromossômico pode ser obtida por translocação induzida com mutágenos ou naturalmente. Da mesma forma, as análises citogenéticas possibilitam a identificação dos cromossomos substituídos.

Linhas de adição e substituição cromossômicas têm sido estudadas em trigo e várias espécies de gêneros relacionados. Translocações e recombina-

ções também têm sido identificadas em híbridos. Brasileiro-Vidal et al. (2005) identificaram por GISH a introgressão de um braço cromossômico de centeio em uma cultivar de trigo resultante de uma translocação entre os cromossomos dessas duas espécies.

Variabilidade genética em fitopatógenos

Um dos objetivos dos programas de melhoramento é obter cultivares resistentes a fitopatógenos, uma vez que perdas enormes na produção podem ocorrer, em decorrência da presença desses microrganismos na planta. A dificuldade para a obtenção de cultivares resistentes está diretamente relacionada com o potencial de variabilidade genética do fitopatógeno. No programa de melhoramento do feijoeiro, um dos problemas enfrentados é a suscetibilidade de cultivares ao fungo causador da antracnose, cujo agente causal é o *Colletotrichum lindemuthianum*. As perdas causadas por esse patógeno podem ser totais, quando utilizadas sementes infectadas e condições ambientais favoráveis a tais patógenos, sendo que mais de 50 raças já foram identificadas no Brasil. Por meio de metodologias citogenéticas, foi possível explicar a alta variabilidade genética encontrada nesse patógeno. Entre os mecanismos que contribuem para o aumento da variabilidade, foram descritos o polimorfismo cromossômico, atribuído à ocorrência de irregularidades nas divisões mitótica e meiótica e a transferência *in vivo* de material citoplasmático e nuclear por meio de anastomoses entre conídios (ISHIKAWA, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A citogenética, por meio de suas diferentes metodologias simples e de baixo custo, pode oferecer aos programas de conservação do germoplasma e de melhoramento genético uma série de informações úteis para a condução dos experimentos.

Essa parceria inicia-se com a identificação dos genótipos e estabelecimento da coleção de trabalho, durante os testes de pré-seleção e seleção dos materiais. À medida que o programa prossegue, as informações sobre o modo de reprodução, quantificação da variabilidade e determinação do nível de ploidia são importantes para a definição das estratégias a serem seguidas, ajudando a definir os modos de propagação e manutenção dos genótipos. Quando genótipos de interesse são obtidos e a introdução de características é desejada, o conhecimento das relações genômicas fornece subsídios para a determinação das afinidades de cruzamento e escolha de parentais. Quando há dificuldades na incorporação de alelos de interesse pela recombinação genética, as metodologias citogenéticas podem ser utilizadas para acompanhar os procedimentos para obtenção de linhas de adição e substituição.

Mesmo quando a transgenia é empregada, a citogenética fornece subsídios para visualização e certificação da presença e do funcionamento do transgene, pois a análise dos cromossomos constitui a forma de avaliar o material genético da maneira como este se apresenta na célula, isto é, o cromossomo não é somente um portador dos genes, mas um determinante ativo dos mecanismos de herança.

Além disso, as informações obtidas pela citogenética podem ser associadas aos conhecimentos advindos dos estudos moleculares, morfológicos, bioquímicos e evolutivos, de modo que forneça uma caracterização ampla e integrada da biologia das espécies.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

- BADAEVA, E.D. et al. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, Toronto, v.50, n.10, p.907-926, Oct. 2007.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.3, p.365-372, 2007.
- _____; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumak x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.27, n.1, p.26-35, jan./fev. 2003.
- BRASILEIRO-VIDAL, A.C. et al. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, v.28, n.2, p.308-313, 2005.
- CARVALHO, C.R. de; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biothechnic and Histochemistry*, Louisville, v.68, n.3, p.142-145, 1993.
- CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R. de. Comparison of *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, v.28, n.1, p.73-81, Jan. 2009.
- FK-BIOTEC. Porto Alegre, [2009]. **Citômetro de fluxo**. Disponível em: <<http://www.fkbiotec.com.br/index.php?act=citometro>>. Acesso em: 4 set. 2009.
- FONTES, B.P.D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em Coffea spp.** 2003. 130f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.
- HAN, F. et al. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat - *Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.109, n.5, p.1070-1076, Sept. 2004.
- ISHIKAWA, F.H. **A função das anastomoses entre conídios na recombinação genética em Colletotrichum lindemuthianum.** 2009. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LAMB, J.C. et al. Single-gene detection and karyotyping using small-target fluorescence *in situ* hybridization on maize somatic chromosomes. **Genetics**, v.175, n.3, p.1047-1058, Mar. 2007.

LEFLON, M. et al. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) x *Brassica napus* (AACC) hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, n.8, p.1467-1480, Nov. 2006.

MELO, N.F. de; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, Oxford, v.92, n.2, p.309-316, 2003.

MENDES-BONATO, A.B. et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, Dordrecht, v.125, n.3, p.419-425, 2002.

PEÑAZOLA, A.P.S. Citogenética e citotaxonomia do gênero *Arachis*-I: importância e avanços recentes. In: MARIATH, J.E. de A.; SANTOS, R.P. dos (Org.). **Os avanços da botânica no início do século XXI: morfologia,**

fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 2006. p.142-146.

PEREIRA, R.C. et al. Alternativas para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento de eucalipto. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.60-69, 2002.

SANTA, H.S.D. **Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido.** 2006. 192f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SHELUKHINA, O. Y. et al. A comparative cytogenetics study of the tetraploid oat species with the A and C genomes: *Avena insularis*, *A. magna*, and *A. murphyi*. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v.43, n.6, p.613-626, June 2007.

TECHIO, V.H. et al. Cytotaxonomy of some species and interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics**

and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.203-209, 2002.

_____; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* x *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Firenze, v.58, n.1, p.28-33, 2005.

_____; _____. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.353-362, 2006.

TOMÉ, L.G.O. et al. Pólen 2n e mecanismos meióticos de formação em *Solanum commersonii* ssp. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.473-477, mar./abr. 2009.

VALLE, C.B. do; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement.** Cali: CIAT: Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p.147-163. (CIAT. Publication, 259).

Av. Ricarti Teixeira, 1364
Andradas, MG
(35) 3731-1649

Despachamos para todo o Brasil

Multiplanta

Tecnologia Vegetal





Desde 1991

Matrizes de Morangueiro
Mudas de Bananeira
Batata-Semente



www.multiplanta.com.br

Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações

Geraldo Magela de Almeida Cançado¹

Ana Paula Ribeiro²

Gustavo de Faria Freitas³

Maria Eugênia Lisei de Sá⁴

Hélio Evaldo da Silva⁵

Moacir Pasqual⁶

Aurinete Daienn Borges do Val⁷

Claudinéia Ferreira Nunes⁸

Resumo - A propagação de plantas *in vitro* é um ramo da biotecnologia que vem sendo estudado há bastante tempo, com relatos de trabalhos desenvolvidos desde o início do século passado. Inúmeros avanços foram obtidos e, atualmente, seu emprego, nas mais diversas áreas de pesquisa, ocorre de forma corriqueira. Essas áreas vão desde o desenvolvimento de novas cultivares em processos de fusão de protoplastos e transformação genética de plantas, até a limpeza clonal, com a propagação de plantas isentas de vírus e outras doenças. Esta última alcançou enorme destaque na produção comercial de mudas de melhor qualidade fitossanitária.

Palavras-chave: Micropropagação. Cultura de tecido. Melhoramento genético. Limpeza clonal.

INTRODUÇÃO

Os princípios teóricos da cultura de tecidos de plantas foram propostos ainda no século 19, com as teorias de totipotência de células vegetais. Mas só no início do século 20, em 1902, é que realmente apareceram os primeiros trabalhos de Haberlandt, com o cultivo de tecidos somáticos de várias espécies de plantas (KERBAUY, 1997). Haberlandt não obteve sucesso com seus experimentos, porém previu o uso de cultura de células como um meio elegante para o estudo de

problemas fisiológicos e morfológicos (KRIKORIAN; BERQUAM, 1969).

Hanning (1904 apud TORRES; CALDAS, 1990), ao utilizar algumas espécies de crucíferas, foi o primeiro a descrever na literatura o cultivo de embriões imaturos *in vitro*. Mais tarde, Knudson (1922) também obteve sucesso com embriões de orquídeas e, em 1925, Laibach (apud TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998), conseguiu recuperar embriões de híbridos incompatíveis de plantas do gênero *Linum*, dando os primeiros passos para a utilização da téc-

nica no melhoramento genético de plantas e, desde então, inúmeras outras conquistas foram alcançadas. White (1934), em seus estudos, elaborou um meio líquido para o cultivo de ápices radiculares de tomate que permitia o cultivo por longos períodos. Esse meio tinha em sua composição sais inorgânicos, sacarose e extrato de levedura, que eram responsáveis pela manutenção do desenvolvimento das plantas. Ainda hoje, apesar de ter sofrido algumas modificações em sua composição inicial, como a troca do extrato de levedura por

¹Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM-FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: cancado@epamig.br

²Biotecnologista, Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM-FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: anapaula@epamigcaldas.gov.br

³Eng^a Agr^a, Doutorando UFLA - Dep^o Agricultura, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: freitasgf@yahoo.com.br

⁴Bióloga, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG TP-FEGT, Caixa Postal 351, CEP 38001-970 Uberaba-MG. Correio eletrônico: eugenia@epamiguberaba.com.br

⁵Biólogo, M.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG TP-FEGT, Caixa Postal 351, CEP 38001-970 Uberaba-MG. Correio eletrônico: helio@epamig.br

⁶Eng^a Agr^a, D.Sc., Prof. UFLA - Dep^o Agricultura, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: mpasqual@ufla.br

⁷Eng^a Agr^a, Doutoranda UFLA - Dep^o Agricultura, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: aurineteval@yahoo.com.br

⁸Eng^a Agr^a, Doutoranda UFLA - Dep^o Agricultura, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: nunesfcr@yahoo.com.br

vitaminas, o meio White (WHITE, 1937) é utilizado em vários trabalhos de cultura de tecidos de plantas. Murashige e Skoog (1962) desenvolveram um meio nutritivo denominado MS, em que os níveis de nutrientes inorgânicos tiveram como base a constituição do extrato de folha de fumo. Dessa forma, esses autores conseguiram reproduzir com maior fidelidade os níveis de nutrientes naturalmente necessários para o desenvolvimento das plantas. Atualmente, o MS é um dos meios mais utilizados em trabalhos de cultura de tecidos, mostrando-se adequado para as mais diversas finalidades. O descobrimento e a utilização de reguladores de crescimento, tais como as auxinas e citocininas, também tiveram papel preponderante para o avanço da cultura de tecidos (KOGH;

HAAGENS MIT; ERXLEBEN, 1934; MILLER et al., 1955). Essas substâncias, como foi observado mais tarde, possuíam grande influência no padrão de desenvolvimento de órgãos, tecidos e células vegetais. Hoje, sabe-se que o correto balanço desses reguladores de crescimento, assim como o fornecimento adequado de nutrientes, pode determinar o sucesso ou o fracasso de um cultivo em particular (HUANG; MURASHIGE, 1976).

Com o passar dos anos, a função de cada constituinte do meio nutritivo foi intensamente estudada, sendo bem conhecida atualmente. Apesar da existência de diversas formulações de meios, utilizadas de forma geral em cultura de tecidos vegetais, a composição dos meios nutritivos pode variar enormemente, dependendo

da proposta a que se destina o cultivo *in vitro*. Sendo assim, estudos prévios sobre as exigências nutritivas das plantas são necessários, sobretudo quando se trata do cultivo *in vitro* de novas espécies.

A possibilidade de multiplicar e manter populações de plantas idênticas, conferida pela descoberta da totipotência celular, estabeleceu uma ligação entre a cultura de tecidos e a genética. A partir desses conhecimentos, novas técnicas como a androgênese, produção de compostos metabólicos de interesse econômico, fusão de protoplastos e produção de embriões somáticos (Fig. 1) foram desenvolvidos e novos aspectos como a variação somaclonal e tumores causados pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* passaram a ser

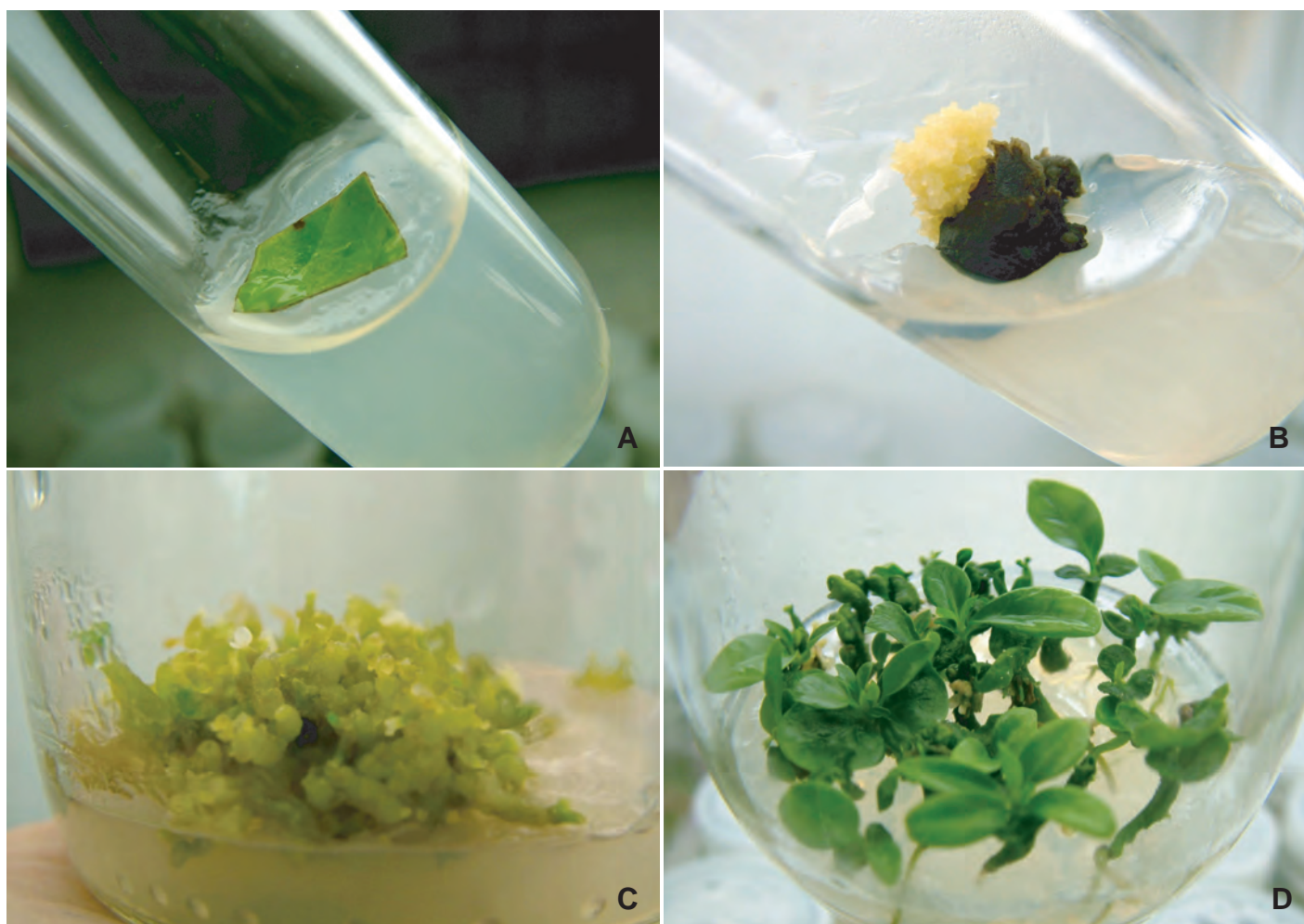


Figura 1 - Embriogênese somática de café

NOTA: A - Explante inicial – tecido foliar; B - Processo de calogênese; C - Desenvolvimento de embriões somáticos; D - Desenvolvimento de plântulas de café.

Fotos: Heilo Evaldo da Silva (U.R. EPAMIG TP-FEET)

estudados. Durante a década de 1990, foi vista uma expansão na aplicação da técnica *in vitro* para um número maior de espécies. Nesse período, a técnica permaneceu como uma importante ferramenta nos estudos de áreas básicas da biologia e bioquímica vegetal e tem assumido maior importância em estudos de biologia molecular e biotecnologia agrícola (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

No Brasil, os primeiros trabalhos de cultura de tecidos foram realizados na década de 1950, no Instituto Biológico de São Paulo e, em seguida, na Universidade de São Paulo (USP). Entre os anos de 1975 e 1980, novos laboratórios foram criados na Universidade de Campinas (Unicamp), no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e em alguns centros de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Atualmente, o País conta com vários laboratórios de cultura de tecidos distribuídos em universidades, institutos de pesquisa e em empresas privadas.

APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

Dentre todas as aplicações da cultura de tecidos de plantas, as de maior impacto foram as de utilização no melhoramento genético de plantas e na recuperação de genótipos livres de vírus e outros agentes fitopatogênicos. No primeiro caso, a utilização da cultura de tecidos no desenvolvimento de novas cultivares tem ocorrido das mais diversas formas. Algumas vezes, é responsável diretamente pelo processo de melhoramento e, em outras, apenas contribui em alguma etapa do processo. Já a utilização da micropropagação para limpeza clonal ganhou força ainda na década de 1960, principalmente pela inexistência de produtos que pudessem controlar viroses de plantas. No passado, muitos genótipos de plantas de grande potencial agrônomo caíram em desuso, em razão da baixa produção ocasionada pelas altas taxas de contaminação por vírus, principalmente em espécies propagadas vegetativamente.

Avaliações comparativas realizadas com plantas de uma mesma cultivar de moranginho, infectadas com vírus, mostraram que aquelas livres desses patógenos, via cultura de ápices meristemáticos, eram duas vezes mais produtivas (KERBAUY, 1997). Atualmente, a produção de matrizes, a partir de meristemas e embriões isolados, em conjunto com o uso de cultivares resistentes, é a forma mais efetiva de evitar danos causados pelas viroses (Fig. 2).

O cultivo *in vitro* também tem sido utilizado para formação e intercâmbio de germoplasmas, produção de sementes sintéticas, microenxertia, estudo de biologia vegetal, além de outras inúmeras aplicações.

MICROPROPAGAÇÃO COMERCIAL DE PLANTAS

A produção comercial de plantas *in vitro* é uma prática já bastante utilizada em diversos países da Europa, Ásia, Estados Unidos e, mais recentemente, no Brasil. A técnica da clonagem tem-se mostrado de enorme importância prática e potencial na agroindústria de flores, espécies frutíferas,

florestais e olerícolas. O método baseia-se na produção de plantas mais uniformes, sadias e a uma velocidade muito maior do que os métodos convencionais, sem considerar a manutenção de quantidades consideráveis de plantas por metro quadrado, dentro dos frascos em laboratórios, protegidas do ataque de pragas, doenças e intempéries (LEE et al., 1995; KERBAUY, 1997). Laboratórios que se dedicam à multiplicação *in vitro*, em larga escala, de plantas de importância econômica são denominados biofábricas. O processo de biofabricação de plantas envolve basicamente as etapas descritas na Figura 3.

Na área de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas, grábera, cravo, tulipa, orquídea etc., a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas tem permitido a compatibilização de demandas específicas dos mercados interno e externo, com atributos importantes, como época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, número de flores/plantas, comprimento e resistência das hastes florais, tamanho e vigor das plantas (KERBAUY, 1997).

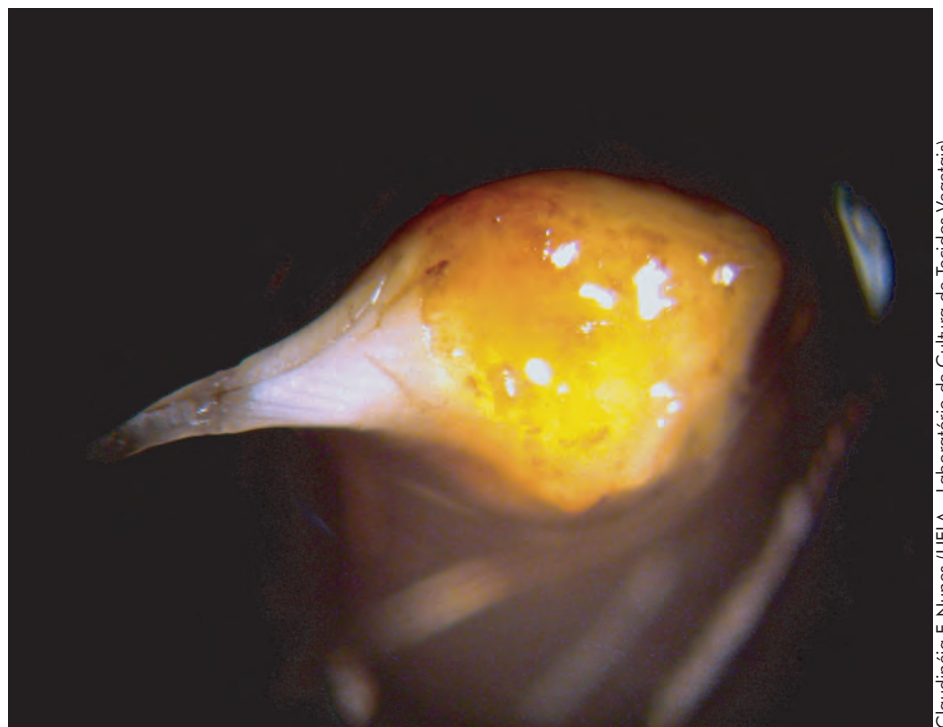


Figura 2 - Meristema de cana-de-açúcar cultivado *in vitro*

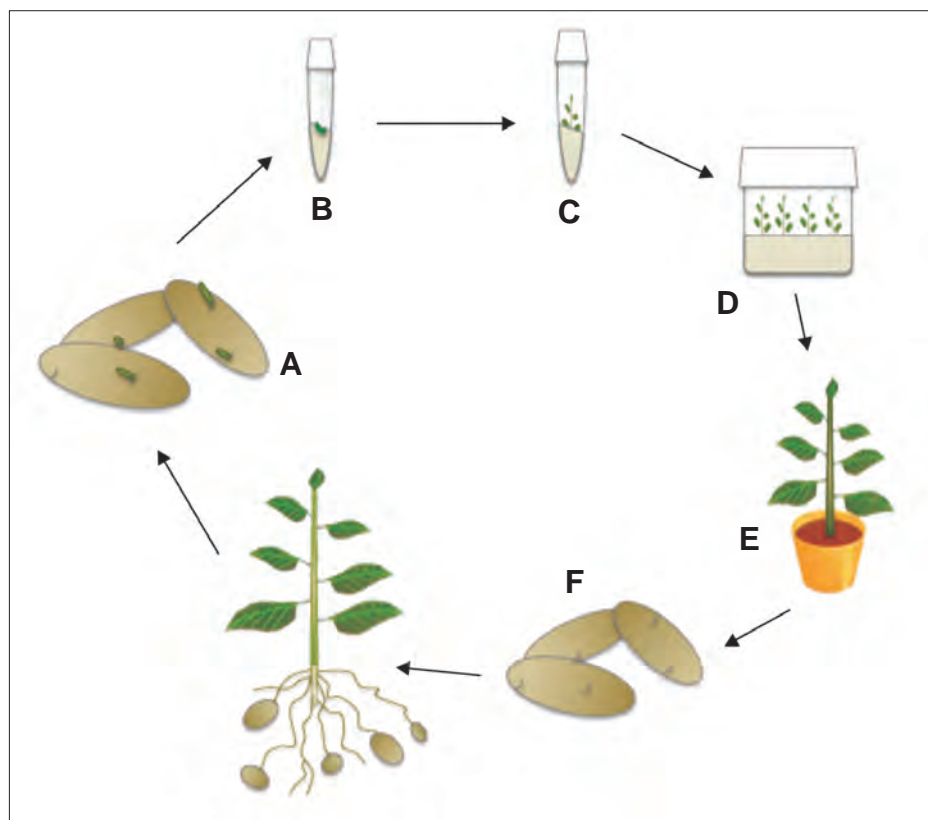


Figura 3 - Esquema de produção de tubérculos de batata

NOTA: A - Seleção e desinfestação das brotações que servirão como fonte de explante; B - Estabelecimento do explante em meio de cultura; C - Multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos; D - Alongamento e enraizamento das plântulas *in vitro*; E - Transplante para casa de vegetação e aclimação; F - Produção de novos tubérculos.

No caso das espécies frutíferas, particularmente abacaxi e banana, a expansão para novas áreas de cultivo tem sido limitada, principalmente pela oferta insuficiente de mudas, assim como pelo baixo padrão fitossanitário (BORGES et al., 1997; REINHARDT, 1998).

O processo de biofabricação de plantas enfrenta desafios relacionados com a necessidade de mão-de-obra qualificada, baixo nível de automação, tática de produção e logística de comercialização de plantas que agregam valores relacionados com a qualidade e redução do tempo para a produção, tornando-se barreiras que podem inviabilizar iniciativas nessa área. Estratégias de como aplicar corretamente as informações técnicas, a fim de expor um produto inovador e de qualidade na vitrine comercial e consolidar uma imagem de confiabilidade e segurança aos públicos

interno e externo, podem aumentar as chances de sucesso.

UTILIZAÇÃO DIRETA DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Uma grande vantagem da cultura de tecidos é a possibilidade que oferece ao melhorista de plantas de explorar melhor a variabilidade genética. A utilização em programas de melhoramento da variação somaclonal e da mutação induzida *in vitro* pode facilitar a obtenção de indivíduos com melhor vantagem adaptativa a vários estresses bióticos e abióticos. Aliado a isso, em muitos casos existe a vantagem de poder exercer a pressão de seleção no próprio ambiente de cultivo, culminando numa economia de espaço e de tempo para o melhorista.

Variação somaclonal e mutação induzida

Um problema comumente observado em plantas cultivadas *in vitro*, principalmente quando sofrem excessivo número de repicagens ou quando passam pela fase de calo, é o surgimento de plantas com características morfológicas distintas da planta-matriz. O cultivo *in vitro* ocasiona uma condição de estresse nas plantas, o que provoca distúrbios durante a divisão celular, denominados variações somaclonais. A princípio, o fenômeno foi encarado como um problema para a produção de mudas micropropagadas, no qual se deseja que todos os clones preservem com fidelidade as características da planta-matriz. Porém, mais tarde, a variação somaclonal foi vista pelos melhoristas de plantas como uma forma de explorar melhor sua variabilidade genética. As cultivares comerciais de tomate 'DNAP9', com alto teor de sólidos solúveis, e a cultivar de pimentão 'Bell Sweet', com menor número de sementes no fruto, são exemplos típicos de seleção de variantes somaclonais obtidos *in vitro* (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). Em ambas as cultivares, apesar da ocorrência da variação genética em seu genoma, todas as características agronômicas originais foram preservadas.

A maioria das variações somaclonais origina-se de distúrbios ocorridos durante o processo de separação dos cromossomos duplicados na anáfase mitótica, ocasionando poliploidias, aneuploidias, quebras e pontes cromossômicas. Entretanto, algumas vezes, essas alterações não são herdáveis, por não se manterem estáveis durante as divisões mitóticas, sendo denominadas alterações epigenéticas. Alterações na sequência de nucleotídeos na fita de DNA, denominadas mutação de ponto, também já foram descritas como sendo fruto da variação somaclonal (EVANS; SHARP, 1983). Da mesma forma que o cultivo *in vitro* proporciona o aparecimento de variantes genéticas, mutações podem ser induzidas artificialmente por outros fatores. A incidência de raios ultravioletas e de substâncias mutagênicas, diretamente

sobre células, tecidos ou órgãos de plantas, pode elevar consideravelmente a taxa de mutações gênicas, cromossômicas e extranucleares.

Apesar de a indução artificial de mutações estar sendo utilizada *in vivo* há bastante tempo, sua aplicação *in vitro* mostrou-se mais atraente, pois permite manipular em pequenos espaços grandes quantidades de células vegetais, o que reduz consideravelmente os riscos dessa prática, visto que agentes mutagênicos podem causar câncer em humanos, além disso, soma-se o fato de reduzir a chance de aparecimento de quimeras, presença no mesmo indivíduo de tecidos geneticamente distintos.

É interessante ressaltar que mesmo a ocorrência de mutações deletérias pode ser de grande valia, quando utilizadas em estudos de metabolismo vegetal e de expressão de genes. O uso de agentes mutagênicos combinado com sistemas de seleção em cultura de tecidos vegetais, seja para localizar mutações em cadeias biossintéticas específicas, seja para identificar genótipos resistentes ou tolerantes a fatores causadores de estresse, oferece amplas perspectivas para reduzir os custos de determinados programas de melhoramento.

Isolamento e fusão de protoplastos

Uma variação bastante interessante da técnica de cultura de tecidos vegetais é a

regeneração de plantas a partir de protoplastos. O protoplasto nada mais é do que a célula vegetal individualizada, desprovida das paredes celulares. *A priori*, protoplastos podem ser isolados de qualquer tecido vegetal, mas, geralmente, a preferência é dada aos tecidos como os do mesófilo foliar ou de calos friáveis. Em tecidos tenros, não lignificados, há uma maior facilidade de isolamento, obtendo-se um maior rendimento no número de protoplastos viáveis (NAGATA; TAKEBE, 1970; NAGAO, 1978). A eliminação das paredes celulares dá-se pela ação de enzimas pectocelulolíticas, que digerem os componentes das paredes celulares, liberando a célula vegetal que fica envolta apenas pela membrana celular. As células vegetais, nessa condição, podem ser manipuladas de várias formas, com aplicações em diversas áreas da pesquisa em vegetais. Mas é principalmente no melhoramento de plantas que vislumbram as maiores potencialidades da utilização de protoplastos. A variação somaclonal, descrita anteriormente, também é observada nas culturas de protoplastos, pois o próprio fato de manter em cultura um tecido desorganizado, durante um longo período, favorece o surgimento de variações genéticas (CARNEIRO; CONROI, 1990). Nesse caso, a seleção de determinada característica torna-se mais simples, pela facilidade de impor uma pressão seletiva mais homogênea. Fica fácil, portanto, selecionar em

meio de cultura, linhagens de células tolerantes a herbicidas, patógenos ou outros estresses, tais como toxidez provocada por alumínio ou baixa disponibilidade de nutrientes. A mutação artificial também pode ser empregada em protoplastos, da mesma forma que é utilizada em tecidos e órgãos, sendo que, nesse caso, praticamente ficam anuladas as chances de surgir quimeras, já que as novas plantas originam-se de uma única célula.

Uma utilização de protoplastos no melhoramento de plantas, extremamente elegante, tem ocorrido na produção de híbridos somáticos entre espécies diferentes (VIEIRA, 1997). Inúmeros mecanismos naturais impedem a formação de híbridos entre espécies por cruzamento sexual. Com a possibilidade de fundir duas células distintas, originando uma nova célula que contenha a carga genética de ambas, todas as barreiras pré e pós-zigóticas são eliminadas. A fusão de protoplastos cria a possibilidade de formação de híbridos até entre gêneros diferentes. No Quadro 1, estão relacionados exemplos de hibridações interespecíficas e intergenéricas, que foram realizadas com sucesso.

Para que ocorra a fusão de protoplastos, podem ser utilizados diferentes mecanismos, quer seja por choques de corrente elétrica, eletrofusão, quer seja mediado por um agente químico, como polietilenoglicol (VIEIRA, 1997). No caso da eletrofusão,

QUADRO 1 - Híbridos somáticos produzidos por fusões de protoplastos

Entre gêneros	Entre espécies
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. repanda</i>
<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium padagraria</i>	<i>N. tabacum</i> + <i>N. rústica</i>
<i>D. carota</i> + <i>Petroselinum hortense</i>	<i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. nigrum</i>
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Datura innoxia</i> + <i>D. discolor</i>
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Sinapis túrgida</i>	<i>Brassica oleracea</i> + <i>B. campestris</i>
<i>B. oleracea</i> + <i>Moricandia arvensis</i>	<i>B. napus</i> + <i>B. campestris</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Oryza sativa</i> + <i>O. officinalis</i>
<i>Lycopersicon peruvianum</i> + <i>Petunia hybrida</i>	<i>O. sativa</i> + <i>O. eichingeri</i>
<i>Oryza sativa</i> + <i>Echinochloa oryzicola</i>	<i>O. sativa</i> + <i>O. brachyantha</i>

FONTE: Dados básicos: Carneiro et al. (1998).

os protoplastos são submetidos a um campo elétrico de corrente alternada de alta frequência, que promove uma polarização, isto é, um hemisfério positivo e um outro negativo, criando uma força de atração entre as células adjacentes. Uma vez alinhados, os protoplastos podem-se fundir, por causa do surgimento de poros na membrana plasmática, ocasionado pela aplicação de pulsos rápidos de corrente contínua de alta voltagem, 500 V/cm (CARNEIRO; CONROI, 1990). A Figura 4 ilustra um exemplo hipotético da fusão de protoplastos de tomate com protoplastos de batata, ambas espécies da família das solanáceas. Embora essa fusão já tenha sido descrita na literatura, até o momento, não se conseguiu um híbrido entre as duas espécies que seja capaz de produzir tomates e batatas ao mesmo tempo. Outra forma usada para promover a fusão de protoplastos é a utilização de soluções com elevada concentração de cátions, 50 a 100 mM de Ca^{2+} , e polietilenoglicol (PEG). A solução salina neutraliza a repulsão causada pelas cargas negativas da membrana, enquanto o PEG aumenta a viscosidade do meio, promovendo a agregação dos protoplastos. Após a fusão dos protoplastos, obtêm-se vários tipos de células em cultura: protoplastos não fundidos, híbridos entre dois tipos de células e fusões de células idênticas (CARNEIRO; CONROI, 1990). Por meio de corantes específicos, podem-se separar os híbridos de interesse dos outros protoplastos.

Mesmo que a técnica de hibridação somática seja bastante promissora, ainda apresenta limitações que inviabilizam seu uso de forma generalizada. Para muitos dos cruzamentos testados, verificam-se dificuldades para a regeneração do híbrido e para manter a estabilidade genética. Além disso, muitos dos híbridos regenerados são estéreis, só se multiplicando vegetativamente (PELLETIER et al., 1988). De modo geral, as limitações tendem a ser maiores, à medida que aumenta a divergência genética entre os indivíduos envolvidos.

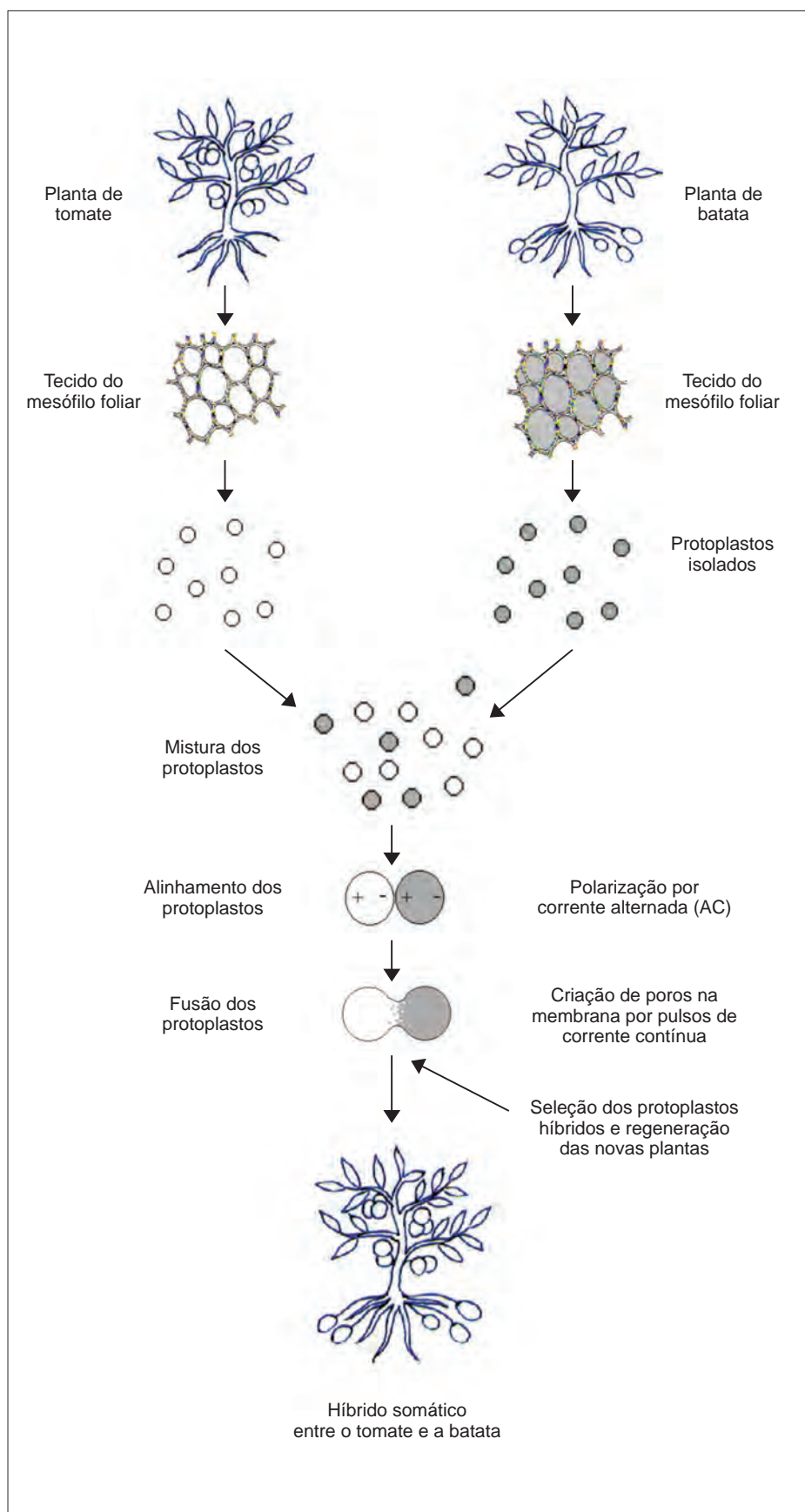


Figura 4 - Demonstração esquemática da fusão de protoplastos de mesófilo foliar de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) com protoplasto de mesófilo foliar de batata (*Solanum tuberosum* L.), com a formação do híbrido interespecífico

APLICAÇÃO DA CULTIVAR DE TECIDOS VEGETAIS NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Foi descrita a utilização direta da técnica de cultura de tecidos de plantas para gerar variabilidade genética em programas de melhoramento. Será abordado o seu emprego como ferramenta auxiliar, para geração de novas cultivares.

Resgate de embriões raros

Uma das aplicações da cultura de tecidos, que tem auxiliado muitos programas de melhoramento de plantas, é a de resgate de embriões. Por causa do intenso processo de domesticação imposto pelo homem às espécies de plantas cultivadas, muitos dos genes que conferiam tolerância e resistência a estresses bióticos e abióticos foram perdidos. Uma das consequências da redução da variabilidade genética foi a dificuldade, por parte dos melhoristas, em localizar fontes de resistência ou tolerância em acessos da mesma espécie. Frequentemente, é necessário que o melhorista recorra à variabilidade existente em espécies silvestres para obter novos genes de tolerância e resistência. Muito embora, em alguns casos, o cruzamento sexual entre espécies diferentes seja possível, ocorrendo a fusão dos gametas e a formação do embrião, não é raro o abortamento desse embrião, pela má-formação do endosperma, como barreira pós-zigótica. A técnica de resgate de embriões em meio de cultura permite que estes se desenvolvam normalmente, o que possibilita a obtenção de híbridos interespecíficos, intraespecíficos, intergenéricos e, em alguns casos, até mesmo entre espécies de famílias distintas, facilitando, sobremaneira, a busca do melhorista por genes de interesse.

Para que o meio artificial utilizado em cultura de tecidos possa substituir o endosperma, na sua função de nutrir o embrião, é necessário que todas as exigências nutricionais sejam bem conhecidas. Dependendo do estágio de desenvolvimento, o embrião pode requerer apenas os nutrientes inorgânicos e uma fonte de carboidrato no

meio de cultura, mas para aqueles muito jovens, frequentemente há necessidade de suplementação do meio com reguladores de crescimento, antioxidantes, vitaminas, além de outras substâncias necessárias ao desenvolvimento. O cultivo de embriões em meio artificial também é utilizado frequentemente, quando existem dificuldades na ocasião da fecundação. Nesse caso, a fertilização se dá *in vitro*, com a eliminação das barreiras pré-zigóticas, eliminação do estigma e deposição do pólen diretamente sobre o saco embrionário. O óvulo fecundado é, então, cultivado artificialmente dando origem ao embrião. De modo geral, o que se observa com mais frequência é o cultivo do óvulo fecundado em associação ao ovário ou parte dele. O tecido do ovário é responsável pela produção e fornecimento em quantidade adequada de várias substâncias essenciais para o desenvolvimento do embrião. Dessa forma, evitam-se que sejam testadas composições de meio.

Produção de linhagens duplo-haploides

A produção de linhagens superiores para formação de híbridos necessita de um longo período para que se possa atingir a condição de homozigose. Essa homozigose, geralmente, é alcançada após sete a nove gerações de autofecundação, correspondendo de sete a nove anos de trabalho para o melhorista (BORÉM, 1998). Isso quando se trata de espécies anuais, pois em espécies perenes a expectativa de tempo para obtenção de linhagens em homozigose é muito maior.

Uma forma de acelerar a produção de linhagens em homozigose seria por meio da produção de plantas haploides seguidas da duplicação dos cromossomos, num processo denominado haplodiploidização (BUYSER; HENRY; TALEB, 1985). Com o uso dessa técnica, a partir de uma população F1, podem-se obter, em apenas uma geração, populações de linhagens em homozigose perfeita, ou seja, que apresentam todos os seus *loci* em homozigose (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Isso corresponde a um ganho de tempo fantástico para o melhoramento, facilitando enormemente a obtenção de novas cultivares (Fig. 5).

A aquisição do tecido haploide dá-se pelo cultivo de células germinativas, que apresentam apenas a metade da constituição genética da espécie. No caso de uma planta diploide, como o milho, cujo genoma é composto por 20 cromossomos, suas células germinativas só apresentam metade desse número, ou seja, dez cromossomos. Consequentemente, as plantas haploides, originadas dessa célula germinativa, também terão apenas dez cromossomos. Após a obtenção da planta haploide, o restabelecimento da diploidia ocorre de forma natural ou por indução com colchicina, substância que inibe a polimerização das fibras do fuso durante a divisão mitótica, impedindo a migração dos cromossomos (NITSCH, 1983).

Dessa forma, plantas haploides podem-se originar por dois processos diferentes: processo gimnogenético, quando se originam de células reprodutivas do sistema feminino, e processo androgenético, quando se originam de células reprodutivas do sistema masculino (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1999).

Para a produção de plantas haploides, o cultivo de anteras é mais utilizado do que o de ovários. As anteras possuem um grande número de micrósporos, podendo gerar centenas de novos indivíduos a partir de uma única antera, enquanto os óvulos apresentam apenas um saco embrionário, podendo gerar apenas um indivíduo por óvulo. Além disso, a resposta *in vitro* da cultura de óvulo ou ovário é menos eficiente do que a cultura de anteras e micrósporos (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1999).

Produção de sementes sintéticas

A possibilidade de produção de sementes sintéticas foi encarada com maior seriedade, a partir do momento que os estudos de embriogênese somática *in vitro* começaram a evoluir. O termo embriogê-

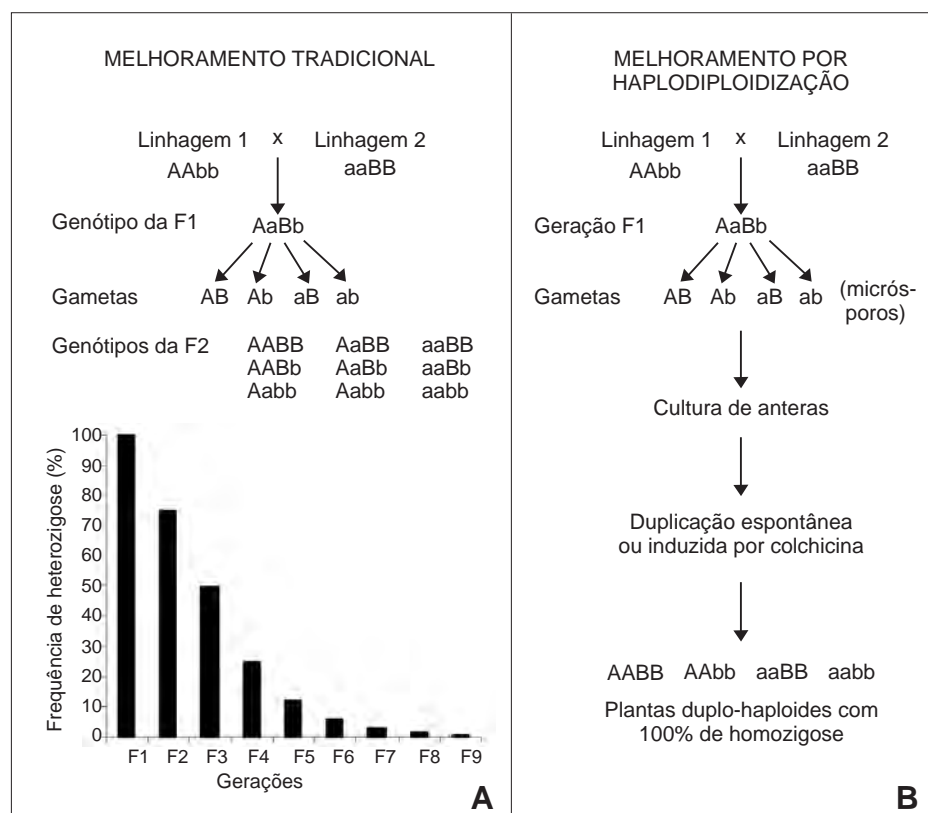


Figura 5 - Comparação entre processos de produção de linhagens homozigotas

FONTES: Dados básicos: Moraes-Fernandes et al. (1999).

NOTA: A - Autofecundações; B - Haplodiploidização de microsporos.

Pelo método convencional são necessárias sete a nove gerações de autofecundação para se alcançar a homozigose, embora sempre permaneça uma pequena proporção de heterozigose residual. Já no método de haplodiploidização, linhagens com 100% de homozigose são obtidas logo após a geração F1, proporcionando economia de tempo e de custos.

nese somática é utilizado para descrever o processo de formação de embriões a partir de células somáticas ou haploides. De forma semelhante aos embriões zigóticos, embriões somáticos apresentam uma estrutura bipolar, constituída de um ápice caulinar e de um ápice radicular, além de um sistema vascular fechado, sem conexão com o tecido do explante inicial. Essas características diferenciam embriões somáticos dos propágulos resultantes do processo de micropropagação e de organogênese (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Entretanto, embriões zigóticos diferem de embriões somáticos pela ausência nestes últimos da recombinação genética proporcionada pela união dos gametas e pela ausência do endosperma. Dessa forma, a embriogênese somática caracteriza-se

por ser uma propagação vegetativa. A formação de embriões somáticos ocorre de forma natural, e um exemplo típico é a formação de embriões nucelares em citros. Esses embriões, por serem, geneticamente idênticos à planta que lhes deu origem, permitem a perpetuação de populações clonais por meio de sementes (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

No processo de fabricação de sementes sintéticas, os embriões somáticos são encapsulados em hidrogel. A Figura 6 ilustra um esquema de produção de sementes sintéticas, com o processo de embriogênese direta, em que os embriões surgem diretamente do tecido original, e a embriogênese indireta, na qual os embriões originam-se do tecido que se diferenciou na forma de calos (PEREIRA et al., 2008).

O material mais utilizado para encapsular os embriões é o alginato de sódio, por suas propriedades gelificantes, baixo custo, facilidade de uso e ausência de fitotoxidez (REDENBAUGH et al., 1986). Há ainda, a possibilidade de adicionar vários componentes ao gel, tais como sais minerais, carboidratos, reguladores de crescimento, pigmentos opacos etc., simulando a constituição do endosperma. Como vantagens ao uso de sementes sintéticas, podem-se destacar a produção de um grande número de embriões somáticos dentro de um curto período, a necessidade de um espaço físico reduzido, a manutenção da identidade clonal, a produção das sementes, independente de efeitos sazonais, e a ausência de estruturas para aclimação de plântulas. Entretanto, a técnica ainda possui algumas limitações, tais como a baixa resistência à dessecação, não-tolerância ao dano mecânico e a baixa difusão de oxigênio e CO₂ (REDENBAUGH et al., 1986).

Seleção *in vitro*

O estudo das interações planta-patógeno e a seleção *in vitro* de materiais resistentes ou tolerantes a agentes causadores de estresses bióticos e abióticos são possíveis por meio do cultivo de tecidos vegetais e plântulas em ambiente artificial e estéril. Essa abordagem de pesquisa apresenta as seguintes vantagens: as unidades experimentais são mantidas em meio definido e condições controladas, permitindo a seleção de genótipos que obtiveram incrementos em resistência a determinadas condições de estresse; as células cultivadas podem ser expostas ao agente seletivo de maneira uniforme e isolada, reduzindo a possibilidade de escapes e interações indesejáveis; sistemas de cultivos mantidos em pequenos espaços podem potencialmente substituir a infraestrutura onerosa de pesquisa (casas de vegetação ou campos de teste); o agente causador da doença ou outro fator permanece confinado no laboratório, sem risco de contaminação do ambiente externo. Os principais usos dessa técnica são: seleção

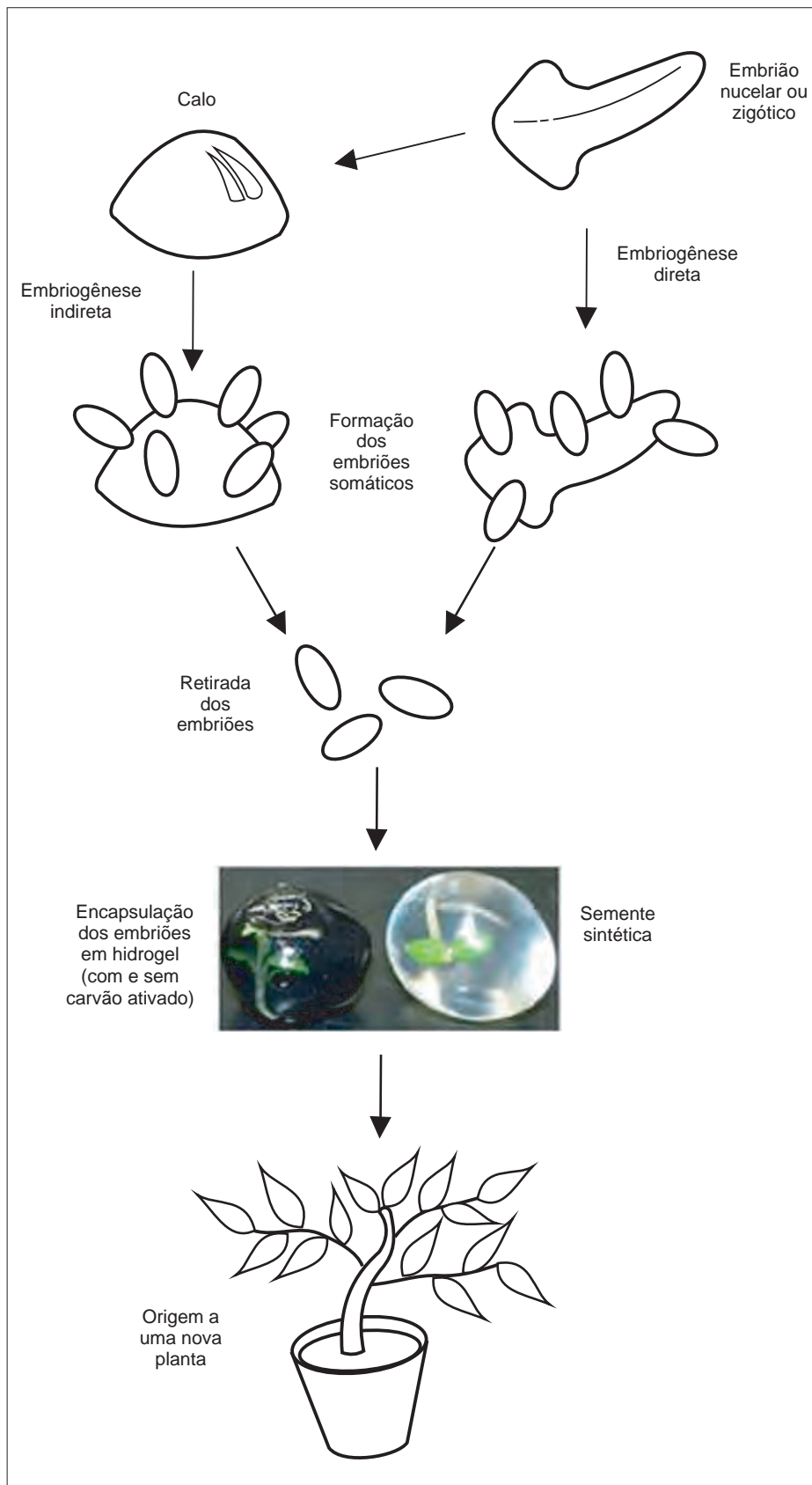


Figura 6 - Produção de semente sintética pelos processos de embriogênese somática direta e indireta, a partir de embrião nucelar ou zigótico

FONTE: Pereira et al. (2008).

NOTA: A Fonte refere-se à fotografia.

para resistência a doenças e a herbicidas e tolerância a estresses abióticos, tais como estresse hídrico, deficiência de nutrientes e elementos tóxicos tal como o alumínio (CANÇADO et al., 2009).

Conservação e intercâmbio de germoplasma

As técnicas de cultura de tecidos de plantas *in vitro* podem contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena, multiplicação, caracterização, avaliação, armazenamento e distribuição (WHITERS, 1980). Para espécies que se propagam vegetativamente, a preservação de germoplasma requer altos custos com mão-de-obra e disponibilidade de grandes áreas. Além disso, essas coleções estão sujeitas ao ataque de pragas e doenças. Para espécies que se propagam por sementes, apesar de ser a maneira mais eficiente de conservação, esta não é sempre adequada, segundo Kartha (1981), pelo fato de:

- algumas plantas não produzirem sementes férteis;
- algumas sementes permanecerem viáveis por apenas um curto período;
- algumas sementes serem altamente heterozigotas e, dessa forma, não serem adequadas para a manutenção dos mesmos genótipos;
- sementes de algumas espécies deteriorarem-se rapidamente, pela ocorrência de patógenos internos.

Embora para algumas culturas essa seja uma alternativa adequada, para outras a conservação de germoplasma *in vitro* talvez não seja uma boa opção. Os problemas vão desde o custo e o volume de trabalho elevado até o comprometimento da integridade genética, pela ocorrência de variações somaclonais. Entretanto, em consequência dos grandes benefícios que esta técnica oferece, um intenso volume de pesquisa, na área de recursos genéticos, está sendo desenvolvido unicamente com

o objetivo de viabilizar a conservação de germoplasmas *in vitro* por longos períodos e com menor custo (Fig. 7).

Transformação genética de plantas

A cultura de tecidos também é um passo quase que obrigatório para a obtenção de plantas geneticamente modificadas. Apesar de atualmente estarem sendo desenvolvidos métodos de transformação que não necessitam passar pela cultura de tecidos, até o momento, a grande maioria das plantas geneticamente manipuladas, que já estão sendo utilizadas pelo homem, fez uso da cultura de tecidos. No caso de transformação via bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, há uma etapa de cocultivo

do tecido vegetal, de discos foliares ou de embriões, com a bactéria que contém o gene a ser transferido (GANDER; MARCELLINO, 1997). A bactéria infecta o tecido e transfere o DNA plasmidial, contendo o gene de interesse para o genoma da planta. Posteriormente, o tecido vegetal é regenerado em meio de cultura na presença de antibióticos ou herbicidas que permitem apenas o crescimento das plantas transformadas. No caso da transformação por biobalística, partículas microscópicas de ouro ou tungstênio, com DNA aderido a sua superfície, são disparadas a grande velocidade contra o tecido vegetal. Posteriormente, as células que tiveram as moléculas de DNA incorporadas ao seu genoma são recuperadas em meio de

cultura seletivo. No processo de transformação por eletroporação em protoplastos ou micrósporos, célula precursora do grão de pólen, pulsos elétricos ou uma solução de PEG proporcionam o aparecimento de poros na membrana plasmática, permitindo que moléculas de DNA penetrem no interior celular (GANDER; MARCELLINO, 1997).

AGRADECIMENTO

Os autores deste artigo agradecem o apoio financeiro da International Foundation for Science, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).




Figura 7 - Cultivo *in vitro*

NOTA: A e B - Genótipos de videira (*Vitis* spp.); C e D - Genótipos de oliveira (*Olea europaea*).

REFERÊNCIAS

- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 1998. 453p.
- BORGES, A.L. et al. **O cultivo da banana**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1997. 109p. (EMBRAPA-CNPMP Circular Técnica, 27).
- BUYSER, J.de; HENRY, Y.; TALEB, G. Wheat androgenesis: cytological analysis and agronomic performance of doubled haploids. **Journal of Plant Breeding**, Berlin, v.95, n.1, p.23-34, 1985.
- CANÇADO, G.M.A. et al. E. Evaluation of aluminum tolerance in grapevine rootstocks. **Vitis**, v.48, n.4, p.167-173, 2009.
- CARNEIRO, V.T. de C.; CONROI, T. Protoplastos de células vegetais. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPMP: ABCPT, 1990. p.171-200.
- _____. et al. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1998. v.1, p.413-458.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. **Science**, Washington, v.221, n.4614, p.949-951, Sept. 1983.
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1998. v.1, p.21- 43.
- GANDER, E.S.; MARCELLINO, L.H. Plantas transgênicas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.34-37, maio 1997.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1999. v.2, p.533-568.
- HUANG, L.; MURASHIGE, T. **Plant tissue culture media**: major constituents, their preparation and some applications. Rockville: Tissue Culture Association, 1976. (TCA Manual, v.3, n.1).
- KARTHA, K.K. Meristem culture and cryopreservation: methods and applications. In: THORPE, T.A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p.181-211.
- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas "in vitro": uma realidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v.73, n.1, p.1-25, 1922.
- KOGH, F.; HAAGENS MIT, A. J.; ERXLEBEN, H. Über ein neues auxin ("Hetero auxin") aus harn. **Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, v.228, p.90-103, 1934.
- KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Harberlandt. **The Botanical Review**, New York, v.35, n.2, p.59-88, 1969.
- LEE, T.S.G. et al. Biofábrica: produção industrial de plantas "in vitro". In: _____. (Ed.). **Biofábrica: produção industrial de plantas "in vitro"**. Araras: UFSCar, 1995. p.9-17.
- MILLER, C. O. et al. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal American Chemical Society**, v.77, p.1392, 1955.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. de et al. M.F. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1999. v.2, p.613-650.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAGAO, T. Somatic hybridization by fusion of protoplasts - I: the combination of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*. **Japanese Journal of Crop Science**, v.47, p.491-498, 1978.
- NAGATA, T.; TAKEBE, I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. **Planta**, v.92, n.4, p.301-308, Dec. 1970.
- NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture technique. In: WORKSHOP COSPONSORED BY THE INSTITUTE OF GENETICS ACADEMIA SINICA AND THE INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1983, Beijing, China. **Proceedings...** Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Beijing: Science Press, 1983. p.1-10.
- PELLETIER, G. et al. Use of protoplasts in plant breeding: cytoplasmic aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.12, n.2, p.173-180, Jan. 1988.
- PEREIRA, J.E.S.; GUEDES, R. da S.; COSTA, F.H. da S.; SCHMITZ, G.C.B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimentalonga. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.26, n.1, p.93-96, jan./mar. 2008.
- _____. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimentalonga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p.93-96, jan./mar. 2008.
- PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haploides e duplohaploides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1999. v.2, p.569-611.
- REDENBAUGH, K. et al. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. **Nature Biotechnology**, v.4, n.9, p.797-801, 1986.
- REINHARDT, D.H.R.C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**. Abacaxi: tecnologia de produção e comercialização, Belo Horizonte, v.19, n.195, p.13-19, 1998.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Histórico da cultura de tecidos de plantas. In: _____. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPMP: ABCPT, 1990. p.15-18.
- _____.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: _____.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPMP, 1998. v.1, p.11-20.
- VIEIRA, M.L.C. Híbridação somática em plantas: a importância das espécies selvagens como fonte de genes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.3, p.36-40, nov./ dez. 1997.
- WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, Bethesda, v.9, p.585-600, 1934.
- _____. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, Bethesda, v.12, p.803-811, 1937.
- WITHERS, L.A. Preservation of germplasm. **International Review of Cytology**, v.11B, p.101-136, 1980.



Para conhecer um bom vinho, é preciso mais do que saber abri-lo.

CURSOS REGULARES DO NÚCLEO TECNOLÓGICO EPAMIG UVA E VINHO

- Iniciação ao vinho e à degustação
- Elaboração de vinhos
- Plantio e tratos culturais em videiras



Inscrições e informações
Fone: (35) 3735 1101
fecd@epamig.br ou
epamig@epamigcaldas.gov.br

Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho
Fazenda Experimental de Caldas
Av. Santa Cruz, 500 • Caldas • MG • CEP: 37 780-000

Realização



Apoio



Decifrando o genoma em grande escala

*Sylvia Morais de Sousa*¹
*Andréa Almeida Carneiro*²
*Newton Portilho Carneiro*³

Resumo - A determinação das funções gênicas tem demandado um grande avanço das ciências genômicas, cujas tecnologias concentram-se, principalmente, na geração e no estudo de uma grande quantidade de dados. O ponto de apoio para o entendimento da função gênica e da estrutura do genoma tem sido o sequenciamento de genomas completos e do genoma expresso em grande escala. Mapas físicos e genéticos têm sido integrados com informações genômicas e de expressão, resultando em bancos de dados públicos altamente informativos para diferentes espécies animais e vegetais. Tais informações auxiliam em vários aspectos a análise de expressão gênica, a determinação dos efeitos de processamento de éxons e do número de cópias gênicas e cromossômicas, culminando na determinação das funções biológicas e do mecanismo de ação de vários genes. São descritos o surgimento de novas tecnologias e a evolução de algumas inovações já existentes, voltadas para a identificação de funções gênicas.

Palavras-chave: Sequenciamento de DNA. Genômica funcional. Microarranjo de DNA. Mutagênese. Fenotipagem.

INTRODUÇÃO

A melhoria e a redução no custo das tecnologias de genotipagem e fenotipagem, associadas a estudos de genoma em grande escala, rapidamente estão-se tornando a abordagem preferida para dissecar a genética de caracteres complexos. O sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) teve dois grandes momentos tecnológicos na história que trouxeram um enorme avanço para a ciência. Um deles ocorreu em 1977 com o aparecimento do método de Sanger. Desde o surgimento dessa técnica, houve modificações que ajudaram a

aperfeiçoar o processo. Uma delas foi o uso de dioxinucleotídeos marcados com fluorescência, capazes de ser visualizados por laser; a segunda foi o uso de capilares em substituição a placas, os quais auxiliaram na automatização do processo de carregamento de amostra no gel e número de amostras feitas por dia. O segundo grande momento do sequenciamento ocorreu próximo a 2005, com o surgimento do sequenciamento por síntese. Esse processo, apesar de bastante inovador (um aumento de cerca de cem vezes em comparação com o obtido pelo método Sanger), não anulou o primeiro, pelo fato de fazer leituras cur-

tas (cerca de 200 pb)⁴. Dentre os métodos novos de sequenciamento encontram-se as plataformas 454 da Life Science, Illumina® e SOLiD™ da Applied Biosystems™⁵. Essas novas tecnologias deram oportunidades de estudos mais complexos de organismos poliploides, com grande quantidade de sequências repetitivas, genomas comparativos, identificação de polimorfismos e genes diferencialmente expressos (que atualmente são muito estudados usando microchips de DNA também conhecidos como microarranjos). Os microarranjos, estudo de expressão gênica em grande es-

¹*Bióloga, D.Sc., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. Correio eletrônico: smsousa@cnpms.embrapa.br*

²*Bióloga, D.Sc., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. Correio eletrônico: andreac@cnpms.embrapa.br*

³*Biólogo, D.Sc., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. Correio eletrônico: newtonc@cnpms.embrapa.br*

⁴*pb – Pares de bases.*

⁵*Disponíveis respectivamente nos sites: <http://www.454.com>; <http://www.illumina.com> e <http://www3.appliedbiosystems.com>*

cala, têm três grandes grupos no mercado: Affymetrix, NimbleGen e a Agilent⁶.

A função de um dado gene não necessariamente representa o que está descrito no banco de dados. Muitas vezes é necessário verificar sua função bioquímica em um contexto biológico. Um dos processos mais bem-aceitos é a modificação da expressão do gene em sistemas heterólogos. Isso pode ser inicialmente feito por meio da identificação de mutantes obtidos por mutagênese química como é o caso da tecnologia *targenting induced local lesions in genomes (Tilling)* e *transposon* ou transgenia, utilizando construções gênicas que se baseiam em RNA de interferência – RNA *interference* (RNAi). Os processos de relacionar gene e função têm sido feitos em grande escala por companhias que têm otimizado desde a identificação de genes de interesse (por estudos genômicos), passando pela montagem de cassetes gênicos, transformação de plantas modelos (como tabaco, *Arabidopsis*, arroz e milho), até a análise fenotípica.

Tecnologias têm direcionado o sequenciamento de um genoma completo custar abaixo de mil dólares, contudo vários outros aspectos estão envolvidos no entendimento da relação gene e função. O conhecimento mais aprofundado dessa função gênica e a sua inter-relação (também conhecida como metabolômica), tanto em nível micro (célula) como macro (planta), têm como objetivo final o entendimento e o desenvolvimento de plantas cada vez mais produtivas e adaptadas às mais diversas condições de cultivo.

SEQUENCIAMENTO EM GRANDE ESCALA

Em 1977, foram publicados dois artigos metodológicos para a determinação rápida de seqüências de DNA (SANGER et al., 1977; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), que iriam transformar a biologia como um todo, fornecendo

uma ferramenta poderosa para decifrar genes completos, que, mais tarde, seriam a base para o sequenciamento de genomas completos. O método sofreu uma série de melhorias, estabelecendo-se como o único de sequenciamento de DNA usado nos 30 anos seguintes. Com a meta de decifrar o genoma humano, houve um aumento, sem precedentes, na escala do sequenciamento de DNA, levando ao desenvolvimento de sequenciadores automáticos por capilaridade. A automação de laboratórios e a paralelização de processos resultaram em centros de sequenciamento com centenas de instrumentos. No entanto, mesmo com dois genomas humanos sequenciados e de outras tantas espécies, o desejo por uma tecnologia mais eficiente e barata continuou impulsionando as pesquisas na área (SCHUSTER, 2008).

Centenas de instrumentos, com base em sequenciamento capilar de 96 amostras, foram substituídos por poucos aparelhos capazes de fazer sequenciamento de milhões de pares de bases, paralelamente, em uma única corrida. Além disso, essa nova geração de sequenciadores utiliza fragmentos que não são sujeitos ao sistema convencional de clonagem em vetores de *Escherichia coli*.

Os primeiros sinais de que o mercado de sequenciamento poderia ser revolucionado apareceram em 2005, com a publicação da tecnologia sequenciamento por síntese, desenvolvida pela 454 Life Sciences (MARGULIES et al., 2005) e pelo protocolo multiplex de colônia de polimerase do laboratório de George Church da Escola de Medicina de Harvard, EUA (SHENDURE et al., 2005). Ambos os grupos usaram a estratégia de reduzir o volume necessário de reação, enquanto aumentavam dramaticamente o número de reações de sequenciamento por corrida. A estratégia consistia em colocar em uma matriz centenas de milhares de moldes em uma placa do tipo picotítulo (PTP) ou

finas camadas de agarose, para que estas seqüências pudessem ser analisadas em paralelo. Tais modificações culminaram em um aumento gigantesco de informações, quando comparadas com as 96 seqüências obtidas pelo método Sanger em capilar (SCHUSTER, 2008).

O pirosequenciamento é um método para determinar a ordem dos nucleotídeos do DNA, com base na detecção da liberação de pirofosfato no ato da incorporação dos nucleotídeos, ao invés da terminação em cadeia com dideoxynucleotídeos, daí o nome sequenciamento por síntese. Nesse método, a detecção da atividade da DNA polimerase utiliza outra enzima quimioluminescente, a luciferase. O DNA molde é imobilizado e a solução contendo os nucleotídeos é adicionada e removida após cada reação, sendo que a luz é produzida apenas quando a solução de nucleotídeos complementa a primeira base sem par da fita molde (RONAGHI, 2001). A seqüência dos sinais quimioluminescentes permite a determinação da seqüência dos respectivos nucleotídeos complementares à fita molde (Fig 1).

O sistema de sequenciamento de DNA paralelo da 454 Life Sciences é cem vezes mais rápido do que o método de sequenciamento padrão e é capaz de sequenciar mais que 200 mil fragmentos, em 4 horas de corrida (MARGULIES et al., 2005). Contudo, esse aumento na velocidade de sequenciamento veio associado a uma redução no comprimento da leitura, sendo sequenciados em média fragmentos de, aproximadamente, 100 pb de comprimento (MARGULIES et al., 2005). Novas versões do sistema Genome Sequencer FLX e da química Titanium (HARKINS; JARVIE, 2007) aumentaram o comprimento médio da leitura para um pouco mais de 200 bases, com promessas de atingir leituras de até 1.000 pb. A principal vantagem de leituras mais longas é a facilidade na montagem e na organização das informações,

⁶Disponíveis respectivamente nos sites: <http://www.affymetrix.com>; <http://www.nimblegen.com> e <http://www.agilent.com>

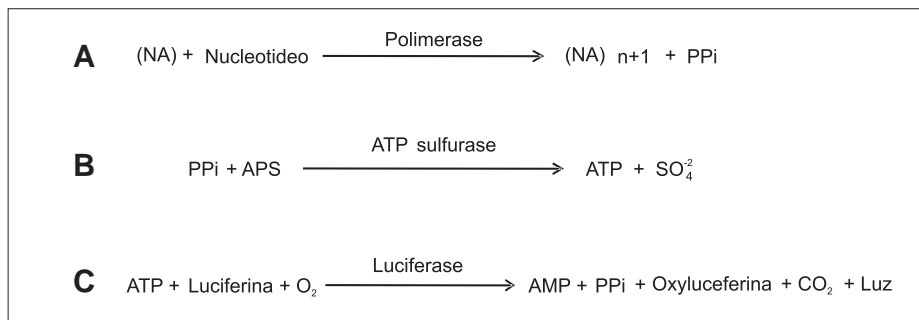


Figura 1- Princípio geral dos diferentes sistemas de reações de pirosequenciamento

FONTE: Ronaghi (2001).

NOTA: A - A polimerase catalisa a incorporação de nucleotídeos na cadeia de DNA; B - Como resultado da incorporação, a molécula pirofosfato (PPI) é liberada e subsequentemente convertida a adenosina-5'-trifosfato (ATP) pela ATP sulfurase; C - A luz é produzida em uma reação da luciferase durante a qual a molécula luciferina é liberada.

principalmente considerando a montagem *de novo* de genomas.

O método 454 reduz a dimensão e a complexidade de cada etapa do protocolo convencional de pirosequenciamento, aumentando a produtividade de informações em uma escala genômica. Ao invés de desenhar um novo par de *primers*, para a amplificação por reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR) de cada fragmento genômico, o 454 divide o genoma em milhões de fragmentos e liga dois *primers* adaptadores universais (A e B). A ligação coesiva é não específica e os fragmentos que não incorporaram ambos os *primers* são removidos, usando esferas especiais que são revestidas com os *primers*. Em seguida, ocorre a reação de amplificação por PCR, também conhecida como emulsão de PCR (DRESSMAN et al., 2003), na qual o *primer* B e o fragmento molde estão livres na solução, enquanto o *primer* A é embebido nas esferas. As esferas de sefarose, cobertas com milhões de *primer* A, são misturadas com a solução de DNA molde, *primer* B e solução. As esferas são adicionadas em excesso, de tal forma que apenas uma molécula de DNA modelo e uma esfera acabam em cada gota d'água.

Esse passo é crítico, uma vez que cada fragmento de DNA tem as mesmas sequências de adaptadores e *primers* de PCR. Após a reação de PCR, cada

esfera tem milhões de cópias da mesma sequência de DNA. Essas esferas são, então, colocadas em placas que cabem exatamente uma esfera por poço, contendo um total de 400 mil poços. O processo restante é o pirosequenciamento com enzima e substrato, sendo colocados na placa PTP, trinucleotídeos ATGC adicionados sequencialmente, cuja fluorescência é capturada com a câmera *charge coupled device* (CCD).

Um método para melhorar a eficiência de perfis de transcrição com base no 454 é ancorar esses fragmentos sequenciados a sítios únicos próximos à região 3' das sequências expressas para reduzir o número de leituras necessário para identificar mRNAs individuais e maximizar a distinção de polimorfismos entre transcritos relacionados. A região 3' não traduzida (UTR) é rica em polimorfismos de base única, que distinguem os transcritos (BHATTRAMAKKI et al., 2002; VROHBI et al., 2006). A especificidade da leitura da sequência 3'-UTR permite a efetiva anotação de cada mRNAs, sem a montagem completa dos cDNAs. Essa estratégia, por exemplo, foi adotada para analisar ovários de milho mutante e selvagem, utilizando uma estratégia multiplex que resultou em perfis de expressão quantitativos, em que se podem distinguir membros próximos de famílias gênicas (EVELAND; MCCARTY; KOCH, 2008).

O comprimento dos fragmentos sequenciados com a tecnologia 454 não é uma preocupação para a análise de transcriptomas, uma vez que os genes expressos são menores do que os genomas e apresentam menos DNA repetitivo. A técnica de captura por microdissecção laser (LCM) pode ser utilizada para isolar transcritos que se acumulam em determinados tipos de células, reduzindo, assim, a complexidade e o tamanho do transcriptoma alvo (SCHNABLE; HOCHHOLDINGER; NAKAZONO, 2004). Outra grande vantagem da tecnologia 454 é não envolver a clonagem dos fragmentos e a construção de bibliotecas, que são etapas caras e demoradas, além de possibilitar o sequenciamento de diferentes amostras de cDNA simultaneamente, aumentando a recuperação de transcritos altamente especializados e raros.

Emrich et al. (2007) relataram o sequenciamento de cDNA extraído de células do meristema apical do broto, utilizando a abordagem LCM-454. Uma única corrida de sequenciamento 454 foi capaz de gerar mais que 25 mil sequências genômicas de milho, sendo anotados quase 400 transcritos de genes órfãos (FU et al., 2005). No entanto, esses transcritos órfãos, detectados por LCM-454, foram validados experimentalmente, e a maioria deles não foi detectada em outros tecidos, incluindo espigas imaturas ricas em tecido meristemático.

Outra plataforma de sequenciamento da Illumina®, denominada Solexa e mais recentemente Genome Analyzer, também utiliza o sequenciamento por síntese de fragmentos aleatórios, ligados coesivamente aos adaptadores e processados em multiplex com reações, utilizando moléculas únicas. No entanto, durante a síntese, essa plataforma incorpora trinucleotídeos fluorescentes com a extremidade 3'-OH inativada, enquanto no 454 são incorporados quatro nucleotídeos por fileira. O Genome Analyzer incorpora os nucleotídeos, um de cada vez, tirando fotos da intensidade das quatro cores fluorescentes

a cada ciclo, seguido pela ativação química do 3'-OH. Todos os quatro nucleotídeos são adicionados simultaneamente e cada fluorescência é marcada com uma cor diferente. Em vez de uma placa PTP, o sequenciamento no Genome Analyzer ocorre em fluxo microfluído das células, que são cobertos por dois *primers* diferentes ligados quimicamente. A hibridização dos *primers* com o DNA genômico com pontas coesivas é preparada de maneira similar ao descrito para o 454. Quando os fragmentos se ligam ao interior da célula, as duas pontas do fragmento ligam-se, formando uma ponte. Após a formação dessa ponte, uma polimerase isotérmica amplifica a sequência, usando os mesmos *primers* genéricos e os nucleotídeos não-marcados. O resultado da desnaturação é um fluxo de células cobertas com uma única fita molde de DNA, pronta para a incorporação de nucleotídeos, imagem fluorescente e ativação dos 3'-OH.

A terceira plataforma, denominada Sequencing by Oligo Ligation and Detection (SOLiD™) da Applied Biosystems, é semelhante às demais pelo fato de ser uma plataforma multiplex e massiva, que não necessita da clonagem dos fragmentos e amplifica o DNA fragmentado, que é ligado a dois *primers*, em uma única emulsão de PCR com esferas cobertas de *primers*.

Esse instrumento tornou-se comercial em outubro de 2007, utilizando um processo único de sequenciamento catalisado pela DNA ligase. Cada corrida do SOLiD™ requer cinco dias e produz de 3 a 4 milhões de etiquetas com uma média de 25 a 35 pb. A plataforma SOLiD™ tem um único protocolo a leitura de cada nucleotídeo, duas vezes sucessivamente em reações com dinucleotídeos, como um mecanismo de verificação de erros. A reação de sequenciamento é repetida cinco vezes em cada modelo com quatro cores fluorescentes em sondas de oito pares de base. Cada uma das cinco corridas de sequenciamento por ligação é precedida por uma hibridização com *primers* de sequenciamento universais. Esse *primer* é específico para os *primers* ligados à

esfera, usado durante a amplificação de PCR, mas os cinco *primers* hibridizam a diferentes fragmentos que se sobrepõem na extremidade 5' do *primer* ligado à esfera. A extremidade 5' do *primer* 1 é o último nucleotídeo a se ligar no *primer* da esfera (posição n), enquanto a extremidade 5' do *primer* 2 está na posição n-1 e assim por diante.

O primeiro passo junta a ligação da extremidade 5' do *primer* universal a um dos quatro oligonucleotídeos fluorescentes da sonda octâmera, que constitui de três nucleotídeos aleatórios (64 combinações), um dinucleotídeo (que combina com as cores fluorescentes) e um trinucleotídeo universal idêntico em todos os octâmeros. Cada passo adiciona 256 (4 de 64) octâmeros e o sinal fluorescente indica o dímero sequenciado. Os octâmeros são ligados ao *primer* universal e, em preparação para o próximo ciclo, um passo de clivagem remove o trinucleotídeo universal e a etiqueta 5' fluorescente. O processo é repetido até o final do fragmento de DNA, resultando em dois de cada cinco nucleotídeos sequenciados. Para sequenciar o restante do fragmento de DNA, a reação começa novamente com o *primer* de sequenciamento universal 2. Após as cinco interações desse processo, cada nucleotídeo na sequência foi lido duas vezes. Uma vez que existem apenas quatro cores fluorescentes, o processo deve ser repetido quatro vezes, a fim de cobrir todos os possíveis dímeros de sequenciamento.

As três plataformas de análise genômica em larga escala são instrumentos em nanoescala, com sistema para análise de imagem e alto poder de bioinformática que usa supercomputadores (Quadro 1). Apenas a tecnologia SOLiD™ proporciona checagem de erros no processo de sequenciamento, enquanto Genome Analyzer e 454 garantem alta qualidade, mas não implementam medidas de controle de qualidade. Por outro lado, a plataforma SOLiD™ necessita de um sistema computacional massivo e recursos para estocar dados, por causa da complexidade da abordagem. Apesar de já terem

alcançado grandes avanços, os métodos de sequenciamento em larga escala ainda têm alguns desafios, como a redução de custos, a diminuição nas taxas de erro de sequenciamento e a leitura de fragmentos mais longos. Novos sistemas que não necessitam de amplificação por PCR e que se iniciam a partir de uma única molécula de DNA estão em desenvolvimento, como a tecnologia Helicos Biosystem - True Single Molecule Sequencing e Complete Genomics, que propõe a visualização da exata localização onde o oligonucleotídeo fluorescente de pentâmero incorpora-se ao longo de uma única fita de DNA.

Essa nova geração de tecnologias de sequenciamento fornece uma velocidade e processividade na geração de sequências de DNA sem precedentes, permitindo um impressionante avanço científico e novas aplicações biológicas.

O objetivo de gerar grande quantidade de dados de sequência de organismos relacionados está direcionado com uma aplicação denominada ressequenciamento, que manipula os dados de sequência de diferentes modos que a montagem *de novo* de genoma. No ressequenciamento, a montagem é direcionada para a sequência-referência e requer menor cobertura (8 a 12 X), que a montagem do genoma *de novo* (25 a 70 X).

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM GRANDE ESCALA

A tecnologia de microarranjos de DNA possibilita a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos de um determinado organismo, em diferentes estádios de desenvolvimento ou submetidos a condições de estresse. Os microarranjos são bastante utilizados em experimentos de genômica funcional, com diversas espécies animais e vegetais, sendo gradativamente incorporados em diferentes áreas da pesquisa zootécnica, como crescimento e metabolismo, resposta imune a doenças, reprodução e resposta a fatores de

QUADRO 1 - Comparação das três plataformas de sequenciamento em larga escala

Característica	Plataformas de sequenciamento		
	454	Genome Analyzer	SOLiD™
Química de sequenciamento	Pirosequenciamento	Polimerase com base em sequenciamento por síntese	Ligação com base em sequenciamento
Abordagem de amplificação	Emulsão PCR	Amplificação por ponte	Emulsão de PCR
Finais pareados/separação	Sim/3 kb	Sim/200 pb	Sim/3 kb
Mb/corrida	100 Mb	1.300 Mb	3000 Mb
Tempo/corrida (finais pareados)	7 horas	4 dias	5 dias
Comprimento de leitura	250 pb	32-40 pb	35 pb
Custo por corrida (total)	\$8,439.00	\$8,950.00	\$17,447.00
Custo por Mb	\$84.39	\$5.97	\$5.81

FONTE: Dados básicos: Mardis (2008).

NOTA: Mb - Megabases; kb - Quilobases; pb - Pares de bases; PCR - Polymerase chain reaction.

estresse não-infecciosos (restrição alimentar, exposição a elementos tóxicos e a outras condições ambientais desfavoráveis), além de melhoramento genético animal. Tais experimentos são consideravelmente caros e como consequência, são, em geral, conduzidos com tamanhos amostrais reduzidos. A realização de experimentos com microarranjos envolve uma série de procedimentos laboratoriais de alta complexidade, desde a coleta das amostras até a obtenção das imagens para análise, que frequentemente introduzem variações adicionais aos resultados (ROSA; ROCHA; FURLAN, 2007).

A Affymetrix, em Santa Clara, Califórnia, dominou o mercado por muitos anos, aplicando tecnologia de fotolitografia para a impressão de oligonucleotídeos em microarranjos de alta densidade. Seu *chip* é bastante usado, mas a dinâmica do mercado está mudando. Novos autores têm lançado arranjos de alta densidade em menor tempo e custo.

A Xeotron da Houston Technology Center⁷, e a NimbleGen, da Roche são duas companhias que produzem microarranjos com tecnologia digital, com base em uma série de pequenos espelhos, tornando a sua impressão mais rápida e com menor custo.

A Agilent Technologies, em Palo Alto, Califórnia, também usa um processo de síntese *in situ* com a impressão de oligos de 60 nucleotídeos, base por base, em lâminas de vidro especialmente preparadas. Cada oligo representa um gene e essa lâmina pode ser lida na maioria dos escâneres comerciais.

Além das lâminas de microarranjos no formato de 3 x 1 polegadas, algumas companhias estão desenvolvendo novos formatos de arranjos que levam a processos paralelos de múltiplas amostras, como é o caso da Illumina® em San Diego, Califórnia. A tecnologia de esferas da companhia está disponível em dois substratos distintos, o Sentrix Array Matrix (para até 96 amostras) e o Sentrix LD BeadChip (para até 8 amostras). Cada arranjo é fabricado para processar múltiplas amostras de cada vez e ambas suportam genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único – *single-nucleotide polymorphism* (SNP) e aplicações para análise de expressão gênica. Cada arranjo em cada substrato contém milhares de pequenos poços nos quais esferas são montadas de maneira aleatória. A companhia usa sondas de 50 nucleotídeos concatenadas com sequências conhecidas imobilizadas na superfície.

Após a montagem das esferas, cada arranjo é decodificado, para determinar quais tipos de esfera contêm qual gene em cada um dos poços do substrato (GUNDERSON et al., 2004).

DETERMINAÇÃO DE FUNÇÃO GÊNICA EM GRANDE ESCALA

Genética reversa é um processo de descoberta de genes que ocorre, conforme o próprio nome indica, de forma oposta ao processo de genética clássica. As genéticas clássica e reversa são parecidas, pelo fato de investigadores tipicamente deduzirem a função de um gene por meio de um efeito de mudança no fenótipo. Por outro lado, o contraste dos dois processos está no fato de que a genética clássica procura indivíduos raros com fenótipos não usuais, buscando, então, o gene ou alelo responsável pela característica fenotípica. A localização de um gene associado com tal fenótipo é o ponto final da investigação.

O avanço nas técnicas de sequenciamento de DNA resultou em vários genomas completamente sequenciados e em uma infinidade de sequências gênicas disponíveis. A abundância de tais informações estimulou a genética reversa, onde, com base nas sequências dos genes, procura-

⁷Disponível no site: <http://www.houstontech.org>

se entender a influência delas no fenótipo, descobrindo sua função biológica. Assim, uma série de estratégias pode ser utilizada para auxiliar na determinação da função de genes.

Mutagênese por silenciamento gênico

O RNA de interferência – RNA *interference* (RNAi) é um processo no qual a expressão de um gene específico é inibido por RNA senso e antisenso. Baseia-se na capacidade de sequências de dupla fita reconhecerem e degradarem sequências que sejam complementares a essas (LEWIN, 2004). O RNAi foi primeiramente descrito em *Caenorhabditis elegans*, quando introduzida uma fita dupla de RNA e observou-se o silenciamento da expressão do gene (FIRE et al., 1998; KUTTENKEULER; BOUTROS, 2004). A primeira classe a participar do RNAi é o *double stranded RNA* (dsRNA), que é formado pela complementariedade de bases de duas fitas simples de RNA e automaticamente reconhecidos por um complexo enzimático – RNases tipo III, específicas para RNAs dupla fita (DICER). Esse primeiro complexo tem atividade RNase III e digere o dsRNA em fragmentos de 21 a 25 pb. Esses pequenos fragmentos são reconhecidos por um segundo complexo enzimático que se acopla a regiões homólogas desses fragmentos de 25 pb no mRNA alvo (que nesse caso será o próprio genoma do *potyvirus*), degradando-o e impossibilitando que o vírus produza as enzimas necessárias a sua multiplicação. Para que a fita de dsRNA ocorra nesse processo, uma região conservada do genoma do vírus (cerca de 400 pb) é colocada duas vezes na construção gênica sendo que uma delas é invertida em relação à outra. Quando a construção é transcrita, ocasiona a formação de uma dupla fita de RNA (Fig. 2).

O silenciamento, com base em RNAi, é uma excelente estratégia para genética

reversa (WATERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998). O RNAi tem sido usado como uma ferramenta poderosa para silenciar genes e analisar a perda de função, quando alelos não mutantes não estão disponíveis (PATTANAYAK et al., 2005). Processos de análise de função gênica em grande escala, usando o RNAi, têm sido usados em processos como TraitMill™⁸.

Mutagênese por transposons e agrobactéria

Os *transposons* são elementos móveis que podem translocar de uma região do genoma para outra (HAYES, 2003). *Transposons* são sequências de DNA que podem inserir em uma nova localidade do genoma sem ter relação com a região inserida (LEWIN, 2004). A mutagênese

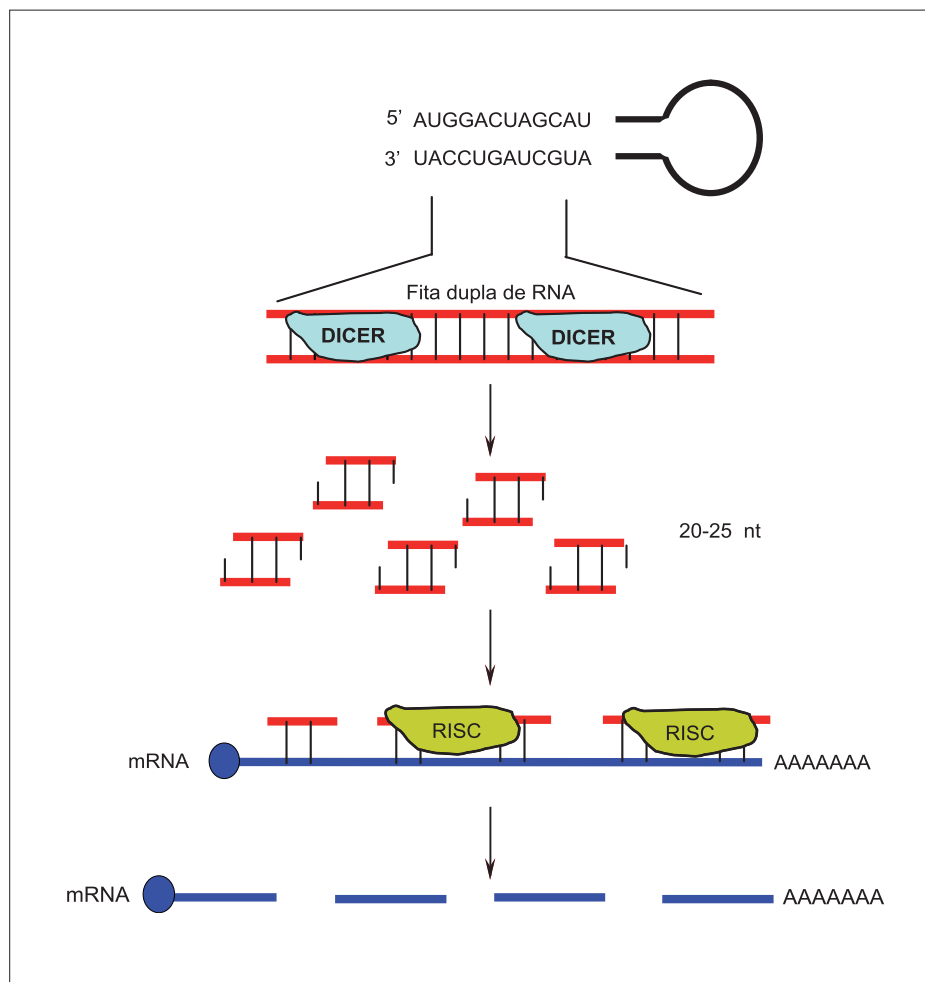


Figura 2 - Esquema simplificado da degradação do dsRNA pelos complexos enzimáticos

NOTA: O fragmento de interesse é inserido duas vezes invertido no vetor, para que ocorra durante a transcrição a formação do grampo de RNA. Esse complexo é reconhecido pela enzima – RNases tipo III, específicas para RNAs dupla fita (DICER) que fragmenta dessa dupla fita de RNA em fragmentos de 25 bases. Esse produto é então reconhecido pelo complexo silenciador induzido por RNA – RNA *induced silencing complex* – (RISC) que reconhece RNAs produzidos na célula que são homólogos a esse RNA. Esse processo impede que os RNAs provenientes da célula venham a ser traduzidos ocasionando plantas mutantes para o fenótipo específico. A grande vantagem desse sistema é de ser praticamente independente do número de cópias do gene de interesse, já que o alvo é o RNA proveniente dessas cópias.

⁸Disponível no site: <http://www.cropdesign.com>

com base em *transposons*, tem sido usada com sucesso para identificar genes essenciais (HAYES, 2003). Métodos com base em *transposon* têm sido usados em *Arabidopsis*, milho e outras espécies (STEMPLE, 2004). Um problema da mutagênese por inserção de *transposons* é o grande número de indivíduos necessários para fazer a caracterização fenotípica e identificar a mutação em um gene específico (GILCHRIST; HAUGHN, 2005; TILL et al., 2003).

O segmento do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, conhecido como T-DNA, carrega genes de transformação de plantas e pode ser utilizado para mutagênese insercional. Essa mutagênese é usada para produzir *knockouts* principalmente em *Arabidopsis* (ALONSO et al., 2003). Esse processo também tem sido utilizado em arroz e milho, porém em uma escala menor, apesar da cobertura estar aumentando (HENIKOFF; TILL; COMAI, 2004). Ao contrário de outros sistemas de identificação de genes, o mecanismo preciso da integração do T-DNA no genoma da planta ainda é desconhecido. Como outras técnicas de supressão de RNA, a mutagênese insercional é limitada pelo hospedeiro e seu alcance é limitado pelos tipos de alelos (MCCALLUM et al., 2000).

Mutagênese por EMS - Tilling

A tecnologia *targeting induced local lesions in genomes (Tilling)* é um processo de genética reversa desenvolvido por Colbert et al. (2001). Nos processos de mutagênese por *transposons* e agrobactéria é teoricamente possível identificar a região onde foi inserido o fragmento, já que a sequência deste é conhecida. Quanto ao método, baseia-se na identificação de regiões do DNA em que não existe esse fragmento conhecido inserido no local. Em razão de a mutagênese química causar grande densidade de mutações, virtualmente todos os genes podem ser atingidos por esse método. Além disso, trata-se de um processo independente de

transgênicos. O método tem como base a capacidade de uma enzima em detectar o desparelhamento de fitas de DNA mutante e normal, quando aneladas. As plantas são tratadas com etilmetanosulfonato (EMS), para gerar uma população de mutações de ponto aleatórias. Por seletividade, o DNA é amplificado com *primers* marcados com fluorescência e os heteroduplexes são formados pelo não-pareamento de algumas bases entre o DNA selvagem e o mutante. Os heteroduplexes são incubados com a endonuclease de planta CEL I (endo-1,4- β -glucanase) que cliva o heteroduplex em sítios não-pareados, resultando em produtos que são visualizados nos sequenciadores automáticos de DNA. Após a análise do DNA de plantas individuais a partir do DNA do *pool*, é possível identificar a planta com a mutação (Fig. 3). Um centro de grande escala de *Tilling* para *Arabidopsis* está

sendo montado no Instituto do Câncer Fred Hutchinson em Seattle-USA (PROWEB PROJECT, 2009). O usuário solicita e recebe sementes de *Arabidopsis*, contendo mutações no gene de interesse.

FENOTIPAGEM EM GRANDE ESCALA

Uma plataforma de fenotipagem em grande escala para milho e arroz, denominada TraitMill™, tem sido desenvolvida na Bélgica pela CropDesign. Plataformas semelhantes têm sido descritas por outras companhias ao redor do mundo. O princípio dessa plataforma engloba a caracterização de um grande número de plantas digitalmente, utilizando ferramentas de bioinformática, sistema de engenharia de genes, transformação em grande escala e um sistema automatizado

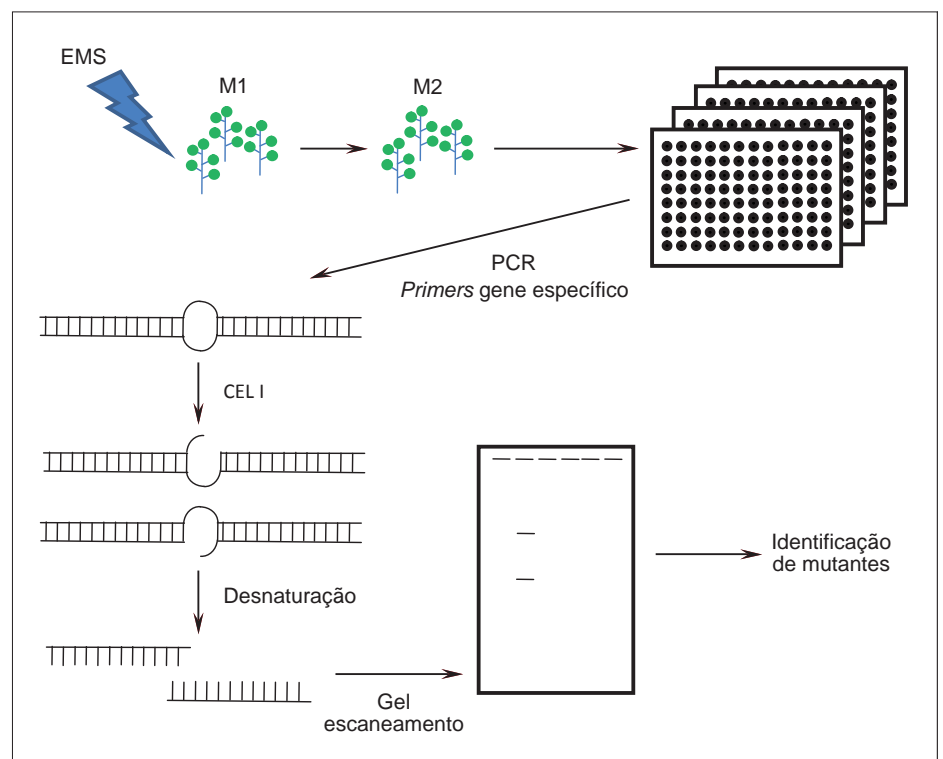


Figura 3 - Tilling em alta escala

FONTE: Colbert et al. (2001).

NOTA: Sementes são mutagenizadas em concentrações de 20, 25 e 30 mM de etilmetanosulfonato (EMS). Plantas M1 são colocadas em bandejas e sementes plantadas em vasos para a geração M2, onde cada M2 deriva de uma planta M1 diferente. Os DNAs das plantas M2 são preparados e submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* específicos. A reação é submetida a tratamento com endo-1,4- β -glucanase (CEL I), limpeza e eletroforese e escaneamento.

de alta resolução para avaliação do fenótipo. Esse processo tem a capacidade de manipular centenas de genes e avaliar o efeito na planta por meio de um sistema automático de avaliação fenotípica global. Parte desse programa investiga genes, vias metabólicas e elementos regulatórios que tenham papéis importantes no crescimento e no desenvolvimento da planta. Os genes são geralmente testados sob o controle de promotores constitutivos e órgãos específicos. Nesse processo, são gerados cerca de 50 mil transformantes independentes por ano. As plantas são cultivadas em casa de vegetação, onde são conduzidas por meio de esteiras automáticas para a captura de imagens de vários ângulos, durante o seu ciclo vegetativo. São processadas mais de 30 mil fotos de plantas por dia. Para assegurar a correta análise dos dados, cada planta leva uma etiqueta que contém um *chip* que faz com que todas as informações sejam registradas automaticamente, quan-

do a planta passa pelo sistema de imagem. Algoritmos são usados para análise digital e extração de vários parâmetros relacionados com o crescimento, produção e tolerância a estresses. As sementes são colhidas para cada planta e as amostras são etiquetadas com código de barra. Um robô analisa o peso das sementes enquanto um sistema de análise de imagem faz sua contagem e determina o seu tamanho (Fig. 4).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas metodologias têm sido desenvolvidas para auxiliar na compreensão das funções gênicas. Um grande número de sequências depositadas nos bancos de dados teve suas funções desvendadas por meio de experimentos de avaliação da expressão e localização de mRNAs e proteínas, assim como na reconstituição de mutantes com fenótipos específicos. O sequenciamento tornou-se um elemento-chave na compreensão da funcionalidade do gene. A recente

introdução de instrumentos capazes de produzir milhões de sequências em uma única corrida está rapidamente mudando o cenário da genética, aumentando a capacidade de fornecer respostas com velocidades inimagináveis. Essas tecnologias permitirão o sequenciamento total de genomas a preços cada vez mais acessíveis e com maior rapidez.

Nesta revisão, foram abordadas as mais recentes tecnologias de sequenciamento e de análise de expressão gênica. As técnicas de sequenciamento têm permitido a comparação de vários organismos e/ou situações de forma mais acessível e frequente. As companhias que elaboram microarranjos de DNA têm utilizado dados de sequenciamento, mapeamento e função gênica para montagem de arranjos cada vez mais específicos e direcionados. Os processos de análise gênica, tanto individual quanto em larga escala, fornecerão acesso a novas descobertas sem precedentes em todas as áreas da Biologia, incluindo a agropecuária, nas quais existe um grande interesse na identificação de genes envolvidos com resistência a doenças, tolerância a estresses, aumento da qualidade nutricional, biorremediação de ambientes, dentre outras características de valor econômico, social e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.M. et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, v. 301, n. 5633, p.653-657, Aug. 2003.
- BHATRAMAKKI, D. et al. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 516, p. 539-547, Mar. 2002.
- COLBERT, T. et al. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology*, v. 126, p. 480-484, June 2001.
- EMRICH, S.J. et al. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Research*, v. 17, n. 1, p. 69-73, Jan. 2007.
- EVELAND, A.L.; MCCARTY, D.R.; KOCH, K.E. Transcript profiling by 3'- untranslated

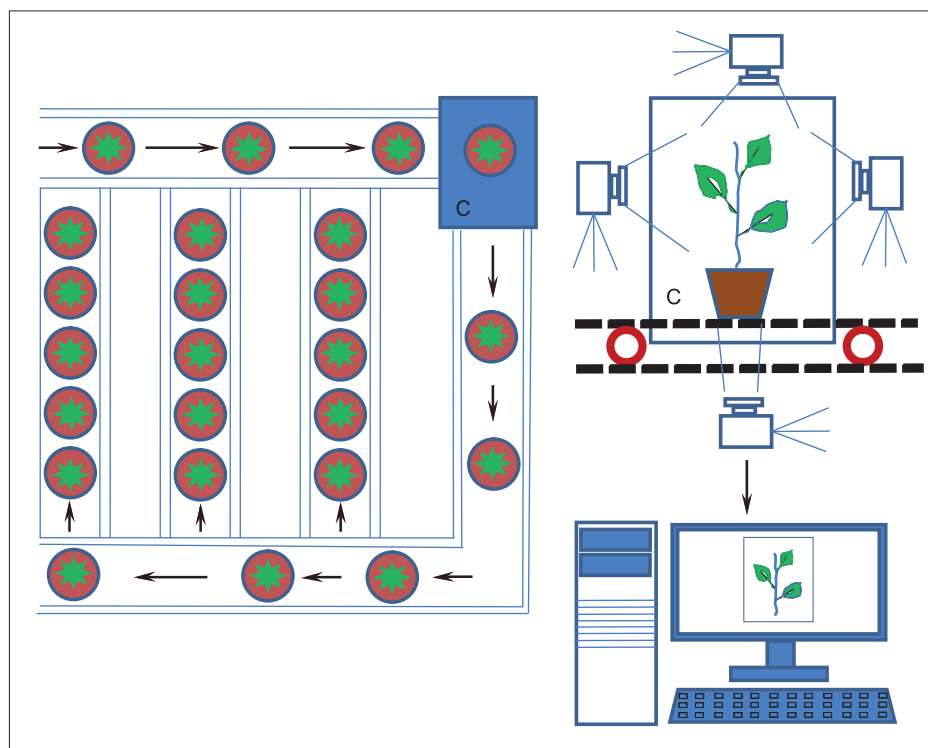


Figura 4 - Descrição da fenotipagem de plantas pelo sistema TraitMill

NOTA: Plantas são dispostas na casa de vegetação em esteiras que se movem em tempo programado. Cada uma das plantas é fotografada digitalmente de vários ângulos e as imagens são processadas em programas de computador que permitem grande número de análises, incluindo crescimento, cor e formato de folhas e caule, densidade de raiz, dentre outras características.

- region sequencing resolves expression of gene families. **Plant Physiology**, v. 146, p. 32-44, Jan. 2008.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, Feb. 1998.
- FU, Y. et al. Quality assessment of maize assembled genomic islands (MAGIs) and large-scale experimental verification of predicted genes. **Proceedings the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 34, p. 12282-12287, Aug. 2005.
- GILCHRIST, E.J.; HAUGHN, G.W. Tilling without a plough: a new method with applications for reverse genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n.2, p. 211-215, 2005
- GUNDERSON, K.L. et al. Decoding randomly ordered DNA arrays. **Genome Research**, v. 14, n.5, p. 870-877, May 2004.
- HARKINS, T.; JARVIE, T. Metagenomics analysis using the genome sequencer FLX system. **Nature Methods**, v.4, n.6, p. 533, June 2007.
- HAYES F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. **Annual Review of Genetics**, v.37, p. 3-29, Dec. 2003.
- HENIKOFF, S.; TILL, B.J.; COMAI, L. Tilling: traditional mutagenesis meets functional genomics. **Plant Physiology**, v. 135, p. 630-636, June 2004.
- KUTTENKEULER, D.; BOUTROS, M. Genome-wide RNAi as a route to gene function in *Drosophila*. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 2, p. 168-176, Aug. 2004.
- LEWIN, B. **Genes VII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027p.
- MARDIS, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, n.3, p. 133-141, Mar. 2008.
- MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, Sept. 2005.
- MCCALLUM C.M. et al. Targeted screening for induced mutations. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 4, p.455-457, Apr. 2000.
- PATTANAYAK, D. et al. Small but mighty RNA-mediated interference in plants. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 1, p. 7-24, Jan. 2005.
- PROWEB PROJECT. [S.l.: 2009]. Disponível em: <<http://www.proweb.org>>. Acesso em: 19 nov. 2009.
- RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, v. 11, p. 3-11, 2001.
- ROSA, G.J. de M.; ROCHA, L.B. da; FURLAN, L.R. Estudos de expressão gênica utilizando-se *microarrays*: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, p. 185-209, 2007. Suplemento especial.
- SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage x 174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687-695, Feb. 1977.
- _____; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.
- SCHNABLE, P.S.; HOCHHOLDINGER, F.; NAKAZONO, M. Global expression profiling applied to plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 50-56, 2004.
- SCHUSTER, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, v. 5, n.1, p. 16-18, Jan.2008.
- SHENDURE, J. et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. **Science**, v. 309, n. 5741, p. 1728-1732, Sept. 2005.
- STEMPLE, D.L. Tilling – a high-throughput harvest for functional genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 145-150, Feb. 2004.
- TILL, B.J. et al. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput Tilling. **Genome Research**, v. 13, n. 3, p. 524–530, Mar. 2003.
- VROH BI et al. Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. **Crop Science**, v. 46, n. 1, p. 12-21, Jan./Feb. 2006.
- WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 13959-13964, Nov. 1998.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BAURLER, I.; LAUX, T. Apical meristems: the plant's fountain of youth. **Bioessays**, v. 25, n. 10, p.961-970, Sept. 2003.
- DRESSMAN, D. et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8817-8822, July 2003.
- GUYOMARCH, S. et al. Regulation of meristem activity by chromatin remodelling. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 332-338, 2005.
- WEBER, A.P.M. et al. Sampling the Arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiology**, v. 144, n.1, p.32-42, May 2007.

A TECNOLOGIA EM SEMENTES À SUA DISPOSIÇÃO

SEMENTES BÁSICAS, CERTIFICADAS, S1 E S2 QUALIDADE GARANTIDA

Pinhão-Manso / Soja / Milho Feijão: Carioca / Preto / Vermelho

Arroz: Irrigado / Sequeiro Café: variedades adaptadas, resistentes a doenças e pragas

INFORMAÇÕES E AQUISIÇÕES:
 EPAMIG - Assessoria de Negócios Tecnológicos
 Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - Cidade Nova
 CEP 31170-000 - Belo Horizonte - MG - Tel: (31) 3489-5060




**EDUCAÇÃO
PARA O
FUTURO**

Inscrições Abertas
2010

ITAC • PITANGUI • MG

**Ensino Técnico em Agropecuária com ênfase
ao Cooperativismo e à Pesquisa Agropecuária**

MATRÍCULA:
04/01/2010 a 03/02/2010

INFORMAÇÕES:
(37) 3271-4004
ensinoitac@epamig.br



TÉCNICO EM AGROPECUÁRIA Concomitante com o Ensino Médio

- Período Integral
- Duração: 3 anos
- Requisito: conclusão do ensino fundamental.

TÉCNICO EM AGROPECUÁRIA

- Período Integral
- Duração: 1 ano e meio
- Requisito: conclusão do ensino médio.

Documentos exigidos:

- Histórico escolar (original)
- Certidão de nascimento (xerox)
- Carteira de identidade (xerox)
- 3 fotos 3 x 4
- Comprovante de residência (xerox)

Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético

*Claudia Teixeira Guimarães¹
Jurandir Vieira de Magalhães²
Marcelo Abreu Lanza³
Ivan Schuster⁴*

Resumo - O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende, fundamentalmente, de algumas etapas como a escolha de genitores e a seleção de genótipos superiores. Desde o surgimento dos marcadores RFLP, na década de 1980, as metodologias para a exploração dos polimorfismos de DNA têm sido alvo de grandes avanços na automação e na geração de dados em larga escala, fornecendo uma amostragem do genoma, cada vez mais ampla, a um custo menor. Assim, com a tendência do aumento crescente no volume de dados, associada à redução nos custos, os marcadores moleculares firmam-se como estratégias sólidas para auxiliar o melhoramento genético, assim como estudos sobre clonagem e função de genes, filogenia, diversidade e estrutura genética em espécies cultivadas e silvestres. Serão apresentados marcos importantes na evolução das tecnologias de marcadores de DNA e algumas das suas aplicações, com ênfase nas análises de diversidade, mapeamento genético e seleção assistida em plantas.

Palavras-chave: Marcador molecular. Modelo estatístico. Polimorfismo. Genoma.

INTRODUÇÃO

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980. Desde então, esses marcadores têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se do grande volume de informações de sequências de DNA disponível. Além das vantagens apresentadas sobre os marcadores morfológicos, as tecnologias existentes fornecem um número praticamente ilimitado de polimorfismos

distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, de forma automatizada e a custos cada vez mais reduzidos. O avanço das técnicas moleculares tem sido acompanhado de perto pelo grande desenvolvimento nas áreas da bioinformática, da estatística e da genética quantitativa. Com isso, encontram-se disponíveis informações genômicas ancoradas a mapas físicos e genéticos altamente saturados, além dos inúmeros genes diferencialmente expressos, que são facilmente integrados por meio da bioinformática. Assim, o mapeamento de caracteres quantitativos – *quantitative*

trait loci (QTLs) e de QTLs expressos têm dado suporte para a identificação de genes e para a seleção assistida, trazendo um vasto conteúdo de informação genética para a maioria das espécies vegetais. A aplicação dessas metodologias, para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético, tem implicado em avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

As limitações em termos de saturação do genoma, número de indivíduos analisados e precisão na detecção de QTLs tendem a ser minimizadas com a revolução trazida

¹Eng^a Agr^a, D.Sc. Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. Correio eletrônico: claudia@cnpms.embrapa.br

²Eng^a Agr^a, D.Sc. Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas-MG. Correio eletrônico: jurandir@cnpms.embrapa.br

³Eng^a Agr^a, D.Sc. Pesq. U.R. EPAMIG TP, Caixa Postal 351, CEP 38001-970 Uberaba-MG. Correio eletrônico: mlanza@epamig.br

⁴Eng^a Agr^a, D.Sc. Pesq. COODETEC, Caixa Postal 301, CEP 85813-450 Cascavel-PR. Correio eletrônico: ivan@coodetec.com.br

pelo sequenciamento em altíssima escala. Tais avanços têm disponibilizado um grande número de polimorfismos de base única – *single-nucleotide polymorphism* (SNP), aleatórios no genoma ou em genes expressos, que, por sua vez, têm possibilitado a construção de plataformas para análise de centenas de milhares de marcadores em paralelo, a um custo reduzido. Essas condições combinadas com modelos estatísticos, propostos para seleção com base na genotipagem de genomas completos, irão contribuir cada vez mais para que a seleção assistida assumam um papel efetivo no desenvolvimento de cultivares superiores, mais adaptadas e com características especiais.

MARCADORES MOLECULARES

RFLP, RAPD e AFLP

Os marcadores do tipo *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) foram os marcadores de DNA mais utilizados nas décadas de 80 e 90, sendo aplicados para vários estudos genéticos. Esses marcadores foram responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de muitas espécies cultivadas, além da descoberta de genes e de inúmeros estudos de diversidade genética. Cada um deles apresenta vantagens e limitações, cobrindo um amplo espectro de aplicações.

Microssatélites ou SSR

Os genomas eucarióticos apresentam várias classes de sequências repetidas e uma delas consiste de repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, sendo denominadas microssatélites ou *simple sequence repeat* (SSR). As regiões genômicas que flanqueiam as sequências repetidas são conservadas dentro de uma espécie, permitindo o desenho de pares de *primers* entre 20 e 30 pb, que são utilizados para amplificar os microssatélites. Os polimorfismos

no tamanho dos fragmentos amplificados devem-se às diferenças no número de elementos simples repetidos, necessitando de géis de alta resolução para a separação dos fragmentos, uma vez que estes diferem por poucos pares de base. Em plantas, os microssatélites foram rapidamente implementados em várias espécies e são utilizados até hoje na construção de mapas genéticos, nos estudos de diversidade e no melhoramento assistido.

Dentre as vantagens que tornaram esses marcadores largamente utilizados podem-se destacar a alta frequência e a distribuição ao acaso nos genomas eucariotos, além de serem co-dominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco. A técnica de SSR é de fácil execução e altamente reproduzível, quando comparada com outras metodologias, facilitando o intercâmbio de informações entre diferentes grupos de pesquisa. Uma limitação da técnica é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam os microssatélites, requerendo a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, o sequenciamento e o desenho dos *primers*. Tal limitação tem sido superada com os avanços nas técnicas moleculares, incluindo o sequenciamento em grande escala. Com isso, existe uma grande quantidade de pares de *primers* SSR com sequências publicamente disponíveis para várias espécies vegetais e animais. Apesar das possibilidades de automatização e da combinação de vários *primers* em sequenciadores automáticos, o número de locos analisados por reação ainda é reduzido diante dos novos desafios.

ISSR

Os marcadores *inter simple sequence repeat* (ISSR) utilizam um único *primer* desenhado com base nas sequências repetidas dos microssatélites na extremidade 5' com alguns nucleotídeos extras na extremidade 3'. Assim, os *primers* anelam-se dentro das repetições e amplificam as regiões genômicas entre os SSRs, cujos tamanhos dos fragmentos são limitados pela própria técnica da

polymerase chain reaction (PCR). Assim, o ISSR assemelha-se ao RAPD, uma vez que amplifica sequências aleatórias no genoma, embora seja mais reproduzível que o RAPD, considerando que os *primers* são maiores e necessitam de temperatura de anelamento mais elevada nas reações de PCR. A técnica surgiu em função da dificuldade de gerar os *primers* específicos para amplificar os SSR (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994), sendo também muito usado em plantas e fungos.

DArTs

Com o surgimento dos microarranjos de DNA, Jaccoud et al. (2001) propuseram uma adaptação dessa tecnologia para a análise de polimorfismos de DNA com a criação dos *diversity arrays technology* (DArTs), onde fragmentos de DNA, que representam o genoma de um organismo ou de uma população, são digeridos com duas enzimas de restrição, clonados e impressos em uma lâmina de microarranjo (Fig. 1). Os polimorfismos são detectados pela presença ou ausência do fragmento após a hibridização com o DNA genômico de cada indivíduo digerido e marcado com fluoróforos. Assim, a técnica oferece uma ampla capacidade de amostragem de milhares de marcadores aleatórios no genoma sem necessidade do conhecimento prévio das sequências alvo e de forma automatizada.

Apesar do grande progresso no sequenciamento de genomas com a descoberta de SNPs, esses avanços não atingem todas as espécies cultivadas. Nesse aspecto, os DArTs oferecem soluções para a genotipagem em larga escala em espécies de órfãs como mandioca, feijão-de-corda (*Cajanus cajan*), cevada e quinoa, além de ser uma fonte valiosa para a geração de marcadores até mesmo para espécies cujos genomas já foram sequenciados como o sorgo (MACE et al., 2008). Uma lista das espécies, que possuem arranjos de DArTs disponíveis para a genotipagem, encontra-se em Diversity Arrays Technology (200–).

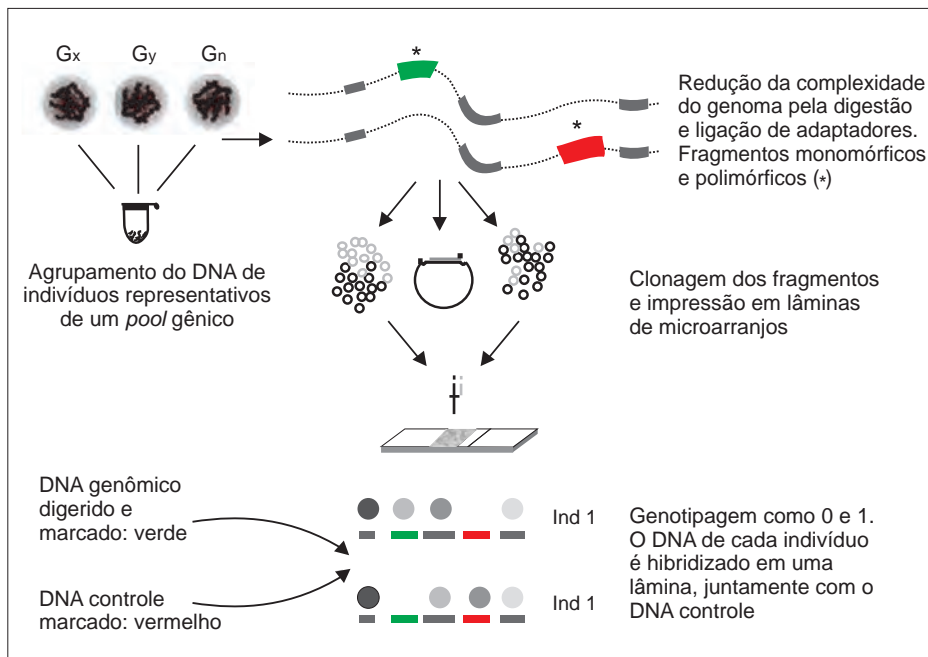


Figura 1 - Esquema da técnica de DArTs

NOTA: DArTs – Diversity arrays technology; DNA – Ácido desoxirribonucleico.

FONTE: Dados básicos: Jaccoud et al. (2001).

Marcadores com base em informações de sequências

O sequenciamento de DNA passou por duas grandes revoluções: a tecnologia dos dideoxynucleotídeos, que viabilizou a automatização do processo e, mais recentemente, o surgimento das novas tecnologias, também denominado sequenciamento de próxima geração, gerando bilhões de etiquetas de DNA (454/Roche; Genome Analyzer/Illumina® e SOLiD/Applied Biosystems™⁵). Maiores detalhes podem ser obtidos no artigo “Decifrando o genoma em grande escala”. Tais avanços viabilizaram os projetos de sequenciamento de genomas completos e expressos, gerando um volume enorme de informações de sequências de DNA. Com o surgimento dos sequenciadores automáticos de DNA, os marcadores RFLP, RAPD e AFLP puderam ser convertidos em *primers* específicos, para utilização em reações de PCR gerando marcadores polimórficos diretamente nas regiões de interesse. Sondas genômicas

de RFLP utilizadas no mapeamento do genoma humano foram os primeiros marcadores a serem sequenciados para amplificação com *primers* específicos, sendo denominados *sequence tagged site* (STS) (OLSON et al., 1989). A partir de então, a denominação STS tem sido aplicada para qualquer marcador que tenha sido convertido em *primers* de PCR por meio do sequenciamento das regiões alvo.

Os produtos de amplificação com *primers* específicos podem ser sequenciados, buscando polimorfismos que gerem ou eliminem sítios de restrição. O polimorfismo é detectado pela digestão dos produtos de amplificação com enzimas de restrição adequadas, gerando então o marcador *cleaved amplified polymorphic sequences* (CAPS) (KONIECZNY; AUSUBEL, 1993). Tais marcadores apresentam as vantagens práticas da técnica do PCR, mantendo a natureza co-dominante do RFLP. Uma alternativa para a genotipagem de SNP é a técnica de *derived cleaved amplified polymorphic sequence* (dCAPS), proposta

por Neff et al. (1998), onde a técnica de PCR é utilizada para introduzir diferenças de nucleotídeos e, assim, criar um polimorfismo com base na mutação alvo. Essa técnica é uma alternativa interessante nos casos em que o SNP a ser genotipado não cria ou elimina sítios de restrição, inviabilizando a utilização da técnica de CAPS. Neff et al. (1998) desenvolveram o *software* dCAPs Finder, que pode ser utilizado para marcadores do tipo dCAPS.

A conversão de marcadores RAPD em pares de *primers* específicos foi inicialmente realizada por Paran e Michelmore (1993), sendo denominada *sequence characterized amplified regions* (SCAR), com a vantagem da especificidade da amplificação para a região alvo em relação ao RAPD. Fragmentos gerados pela técnica de AFLP têm sido convertidos em STS polimórficos e específicos para locos de interesse.

SNPs e InDels

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs são as variações mais frequentes no genoma de qualquer organismo. Estima-se que a frequência desse polimorfismo seja de uma substituição a cada 31 pares de base em regiões não codificadoras e a cada 124 pares de base em regiões codificadoras em milho (CHING et al., 2002). Em soja, estima-se a frequência de um SNP a cada 2.038 pares de bases em regiões codificadoras, e um SNP a cada 191 pares de bases em regiões não codificadoras (ZHU et al., 2003). Por sua abundância no genoma e pela lenta taxa de mutação dentro de gerações, os SNPs prometem ser a futura geração de marcadores genéticos de grande aplicação em processos de genotipagem em larga escala (USECHE et al., 2001). Outra classe de polimorfismo que tem sido muito explorada é a presença de pequenas inserções e deleções, que variam de um a três nucleotídeos, conhecidas na literatura como *InDels*.

⁵Disponíveis respectivamente nos sites: <http://www.454.com>; <http://www.illumina.com>; <http://www3.appliedbiosystems.com>

Os SNPs e os *InDels* são as bases genéticas da maioria das variações alélicas e podem ser tratados como marcadores bialélicos, possuindo amplas aplicações no mapeamento genético de alta resolução e em testes diagnósticos. Tais marcadores podem ser identificados *in silico*, explorando os bancos de dados públicos e mais recentemente pelo ressequenciamento de genomas completos. Useche et al. (2001) identificaram 2.439 SNPs e 822 *InDels* no banco público contendo 68 mil ESTs de milho, utilizando algoritmos com interfaces específicas entre diferentes bancos de dados⁶. Assim, tais marcadores têm gerado dados em larga escala, de maneira automatizada e a custos reduzidos, sendo úteis para a construção de mapas genéticos de alta densidade, para estudos de associação genética e para seleção assistida com base no genoma completo.

Uma vez identificados *in silico*, os marcadores precisam ser convertidos em pares de *primers* específicos (STS), que amplifiquem apenas a região que contém a mutação, para posterior validação e mapeamento destes. No caso de *InDels*, as inserções/deleções de nucleotídeos podem ser reveladas diretamente em géis de sequenciamento dos produtos de amplificação, utilizando um dos *primers* marcados com fluorescência ou radioatividade. Para a detecção das substituições de base, que ocorrem nos SNPs, têm sido desenvolvidas várias estratégias, normalmente utilizando-se etapas adicionais de extensão de *primers* que ancoram a uma base de distância do SNP, após a amplificação do fragmento de DNA que contém a sequência alvo. Várias técnicas têm sido adaptadas para revelar os SNPs, como a extensão de *primers*, que utiliza a detecção por espectroscopia de massa e PCR em tempo real.

No entanto, é importante o desenvolvimento de sistemas para a visualização dos SNPs, que sejam mais simples e de

baixo custo, envolvendo uma única reação de PCR seguida de eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida. Essas características permitem a sua aplicação em programas de melhoramento genético vegetal, em laboratórios com estruturas mais simples. Dentre estas, destaca-se a técnica *amplification refractory mutation system* (ARMS-PCR), descrita por Ye et al. (2001). O sistema ARMS-PCR consiste da amplificação com uma combinação de dois *primers* alelo-específicos, um para cada alelo SNP, e dois *primers* externos e comuns (Fig. 2). Os dois amplicons alelo-específicos são gerados pela combinação de cada um dos *primers* externos com cada um dos *primers* alelo-específicos. A especificidade alélica é conferida por uma diferença entre a base no terminal 3'

dos *primers* internos e a base do alelo alternativo do SNP, como mostrado na Figura 2. Para aumentar a especificidade, um segundo erro é adicionado deliberadamente na posição -2, a partir do terminal 3' (indicado por um asterisco na Fig. 2). O sistema pode ser desenhado para ensaios co-dominantes, com a amplificação simultânea dos dois alelos (sistema de quatro *primers*) ou amplificação em separado para cada um dos alelos (sistema de três *primers* (BUNDOCK et al., 2006)). No sistema ARMS, é importante notar que o desenho de *primers* compatíveis para amplificação simultânea é, muitas vezes, desafiador. Programas, com base em *web*⁷ estão disponíveis para essa finalidade e auxiliam na escolha dos *primers* ideais, para o sistema de três e quatro *primers*.

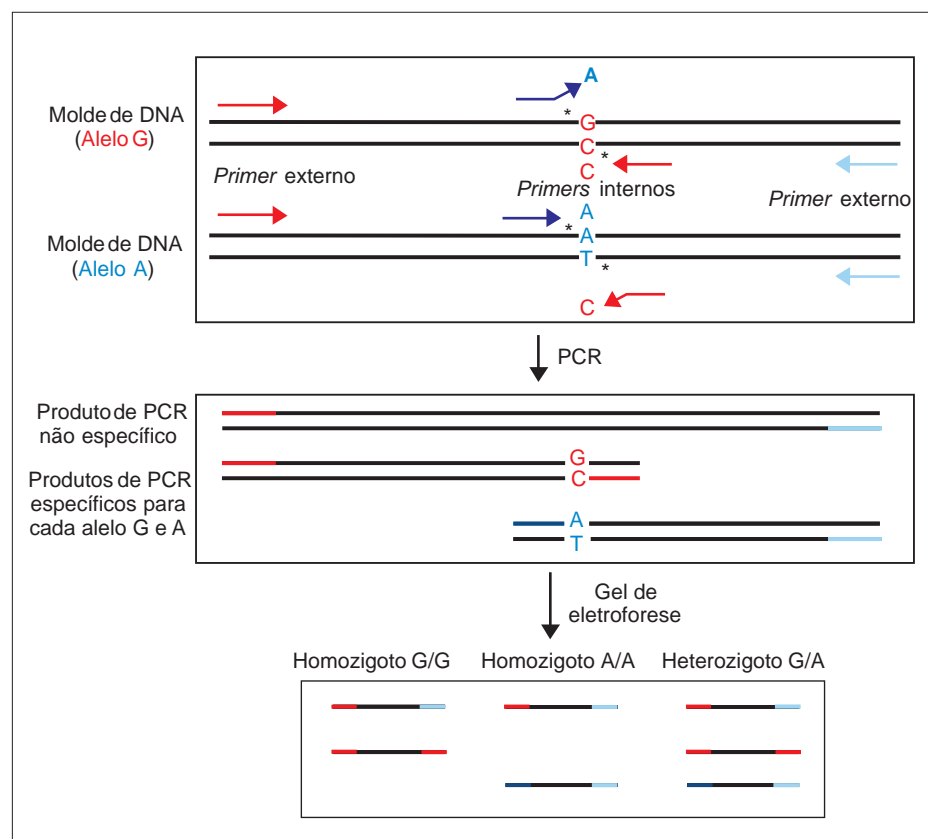


Figura 2 - Esquema de amplificação pela técnica ARMS utilizando quatro *primers*
 FONTE: Ye et al. (2001).

NOTA: DNA – Ácido desoxirribonucleico; PCR – Polymerase chain reaction.

⁶ESTs – Expressed sequence tags.

⁷Disponível no site: <http://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3/>

As tecnologias de sequenciamento de próxima geração têm disponibilizado uma quantidade muito grande de informações de SNPs, que tem recebido plataformas para genotipagem simultânea de milhares de marcadores a custos reduzidos, como Golden Gate da Illumina® e OpenArray da Applied Biosystems™.

SFP

Os microarranjos de DNA ou *chips*, que contêm oligonucleotídeos desenhados para estudos de expressão gênica, estão sendo usados para a geração de polimorfismos para genotipagem em grande escala, denominados *single feature polymorphism* (SFP). Tais marcadores têm sido identificados com sucesso desde genomas simples como arroz (KUMAR et al., 2007), até genomas complexos como trigo (BERNARDO et al., 2009), os quais apresentam elevada capacidade de amostragem genômica, utilizando a mesma estrutura e os *chips* de DNA aplicados em análise da expressão global.

Cada polimorfismo é avaliado pela presença ou ausência de sinais derivados da hibridização do DNA genômico, marcado com os oligonucleotídeos impressos nos *chips*, como os da Affymetrix⁸. Além dos microarranjos já disponíveis, existe a possibilidade de desenvolver *chips* para genotipagem por SFP pelo alinhamento das sequências genômicas e de ESTs públicas, culminando com desenho de sondas de 70 pares de base que cobrem todo o genoma da espécie alvo.

APLICAÇÕES DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Diversidade genética e seleção de genitores

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do ge-

noma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos em programas de melhoramento genético e na manutenção de bancos de germoplasma. Os genótipos são avaliados por meio dos marcadores, as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não-comuns, como diferenças. Os resultados são codificados, a fim de gerar uma matriz de similaridade ou dissimilaridade, interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada.

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento. Essas etapas podem ser auxiliadas por marcadores moleculares e fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. A seleção de genitores superiores é mais crítica em espécies perenes, como fruteiras e essências florestais, uma vez que o tempo para obtenção de uma cultivar melhorada é bastante longo.

Oliveira (2009) obteve uma correlação de 63% entre as distâncias genéticas conseguidas por marcadores microssatélites e as distâncias obtidas pela genealogia de 32 cultivares brasileiras de soja, originárias de um único programa de melhoramento. A análise de agrupamento realizada com dados de marcadores microssatélites coincidiu perfeitamente com a origem das cultivares, com base em sua genealogia. Esse autor ressalta, ainda, que os dados de genealogia nem sempre estão disponíveis, enquanto as informações dos marcadores sempre podem ser obtidas com acurácia.

A caracterização de linhagens de milho em grupos heteróticos é de fundamental importância na escolha dos genitores para a obtenção de híbridos com elevada *performance* agrônômica. Aguiar et al. (2008), ao utilizarem marcadores microssa-

télites para formação de grupos heteróticos em milho, obtiveram formação de grupos semelhantes àqueles obtidos por meio de cruzamentos testes. No entanto, o agrupamento que utilizou marcadores moleculares foi realizado em um mês, enquanto que a obtenção dos resultados de avaliação dos cruzamentos testes necessitou de dois ciclos da cultura do milho. Além disso, na avaliação fenotípica, muitos dados foram perdidos, em função da instabilidade climática durante os períodos de avaliação. Um conjunto de 770 linhagens de milho, representando germoplasmas melhorados do México, China e Brasil, foi avaliado com 1.034 SNPs, sendo possível separar claramente as linhagens temperadas e tropicais (LU et al., 2009). Entre as linhagens da China e do Brasil foi possível definir os agrupamentos em função da genealogia, sendo também definido um conjunto de SNPs mais informativos entre as coleções de germoplasma de diferentes origens.

DNA fingerprinting e proteção de cultivares

A caracterização de variedades, linhagens ou híbridos, por meio de marcadores de DNA, tem sido de grande importância na proteção intelectual do obtentor, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países onde vigoram as leis de proteção de cultivares. Com a aprovação, no Brasil, da Lei de Proteção de Cultivares (BRASIL, 1997), o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ficou responsável pelo registro e proteção de novas variedades. Para que uma variedade seja protegida, é necessário demonstrar que é diferente de qualquer outra variedade da mesma espécie. Apesar de o processo para a proteção de cultivares ser realizado com base em descritores morfológicos, os marcadores moleculares têm sido estimulados e aceitos nos processos para a identificação de cultivares.

⁸Consultar o site: <http://www.affymetrix.com>

Um sistema com base em marcadores de DNA permite a identificação de um padrão único de combinação alélica, como uma impressão digital (*fingerprinting*) para cada cultivar, facilitando sua proteção e assegurando os direitos de propriedade intelectual. A capacidade de discriminação dos métodos de *fingerprinting* molecular depende do número de marcadores utilizados e da frequência alélica para cada loco dentro de uma população representativa da espécie. Ao avaliar um conjunto de 32 cultivares de soja de um mesmo programa de melhoramento, portanto com grande probabilidade de ser estreitamente relacionadas, Oliveira (2009) selecionou um conjunto de 11 marcadores microssatélites, que identificaram todas as cultivares com no mínimo 99,9999% de probabilidade de exclusão. Foram distinguidas inclusive duas cultivares que possuíam 99,22% de similaridade genética, com base na genealogia.

Análise de pureza genética de sementes

Da mesma forma como os marcadores de DNA são úteis na identificação de cultivares, tornam-se também uma importante ferramenta na identificação das misturas varietais em análises de pureza genética de sementes, com a finalidade de certificação ou fiscalização de sementes. Comumente, misturas varietais são identificadas com base em *grow out* no campo ou em características morfológicas de sementes e plântulas ou, em alguns casos, pela eletroforese de proteínas da semente. Em soja, por exemplo, a análise de pureza genética de sementes é feita comumente pela cor do hilo e do hipocótilo e reação à peroxidase. Esses caracteres são pouco informativos, pois tanto a cor do hipocótilo, quanto a reação à peroxidase só permitem dois resultados possíveis, sendo que a combinação de ambos só permite classificar as variedades em quatro grupos distintos.

Cor de hilo apresenta um número maior de resultados possíveis, representados pelas diversas cores e tonalidades existentes, que podem ser alteradas em função de condições ambientais. Por exemplo, variedades com hilo preto imperfeito podem ser confundidas com variedades de hilo preto ou mesmo marrom. Análises moleculares têm demonstrado que nem sempre a diferença na cor do hilo significa mistura varietal. Em alguns casos, sementes de hilo preto imperfeito encontradas em lotes de sementes de hilo marrom são geneticamente idênticas.

Marcadores de DNA são uma ferramenta auxiliar e poderosa na análise de pureza genética de sementes e outras fontes de propagação, tais como mudas, estolões, estacas, borbulhas, etc., aplicável sempre que a caracterização visual gerar dúvidas. Essa análise tem sido feita explorando-se ao máximo a representatividade do genoma, pela utilização de *primers* bem distribuídos em mapas genéticos da espécie. Schuster et al. (2004) descrevem uma metodologia prática para a utilização de marcadores microssatélites na avaliação de pureza genética de cultivares de soja que pode ser facilmente estendida para as demais culturas.

Mapeamento de genes e características complexas

Os avanços nas áreas dos marcadores moleculares e das metodologias estatísticas implementadas em programas computacionais têm aumentado a saturação dos mapas genéticos e, conseqüentemente, a precisão na identificação de marcadores associados com as características de interesse. Para um marcador ser utilizado no mapeamento genético, este deve ser polimórfico entre os indivíduos parentais e apresentar uma segregação mendeliana esperada na prole. Vários tipos de populações segregantes podem ser utilizadas na construção de mapas genéticos, como F_2 , linhagens recombinantes endogâmicas – *recombinant*

inbred lines (RILs) e de retrocruzamentos, tendo cada uma vantagens e limitações. Vários programas computacionais estão disponíveis para a construção de mapas de ligação, sendo alguns públicos como o MapMaker (LANDER et al., 1987), One-Map (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007) e GQMOL⁹.

O grande objetivo da construção de mapas genéticos é identificar marcadores moleculares associados às características de interesse. Há uma infinidade de trabalhos que reportam ao mapeamento de genes e ao QTLs em diferentes espécies. Resistência a doenças tem sido uma característica alvo para esse tipo de estudo, uma vez que a identificação de marcadores ligados a genes de resistência permite monitorar a introgressão e a piramidação de dois ou mais genes de resistência em uma cultivar ou linhagem comercial.

Garcia et al. (2008) e Silva et al. (2008) mapearam os genes *Rpp5*, *Rpp2* e *Rpp4*, que conferem resistência à ferrugem da soja. Adicionalmente, o mapeamento de genes é um passo importante para a clonagem de genes.

A maioria das características de importância econômica está sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes, o que torna difícil sua manipulação e compreensão. Regiões genômicas contendo locos gênicos associados a tais caracteres quantitativos são denominados QTLs. Marcadores moleculares analisados por metodologias estatísticas implementadas em programas de mapeamento de QTLs têm possibilitado a dissecação dos caracteres complexos em fatores mendelianos simples. O mapeamento de QTLs possibilita estimar o número e a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos e as interações com outros QTLs. A habilidade de detectar QTLs por meio de marcadores moleculares é função da magnitude do efeito do QTL, do tamanho e do tipo da população e do nível de saturação do mapa genético.

⁹<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>

O mapeamento de QTLs baseia-se em testes de associação entre marcadores moleculares e os dados fenotípicos por meio de várias metodologias estatísticas, cujos procedimentos podem ser vistos com mais detalhes em vários livros especializados como, Schuster e Cruz (2008), dentre outros. De forma bastante resumida, os métodos para mapeamento de QTLs avançaram desde a associação com marcas simples, passando pelo mapeamento por intervalo simples, mapeamento por intervalo composto, por múltiplos QTLs, até o mapeamento por intervalos múltiplos. Programas específicos para o mapeamento de QTLs, contendo algoritmos apropriados para implementar vários dos procedimentos estatísticos descritos estão disponíveis para acesso público, como QTLCartographer¹⁰ e QTMOL.

Métodos de mapeamento de populações derivadas de cruzamentos biparentais amostram apenas uma pequena fração de todos os possíveis alelos em uma determinada espécie. Por esse motivo, marcadores moleculares associados a QTLs geralmente só podem ser usados nas populações em que foram desenvolvidos. Recentemente, a utilização do desequilíbrio de ligação, ou seja, a associação não ao acaso entre alelos em locos ligados, tem sido utilizada para realizar o mapeamento por associação. Diferentemente do mapeamento de ligação (equilíbrio de ligação), o mapeamento por desequilíbrio de ligação infere a associação entre genótipos (haplótipos) e a característica, pela avaliação do polimorfismo genético que foi gerado em diferentes *backgrounds* genéticos e por meio de muitas gerações de recombinação (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

O desequilíbrio de ligação é definido como a associação não ao acaso, de alelos em locos diferentes do mesmo cromossomo. Se for considerado que um determinado loco possui os alelos *A* e *a* com frequências de p_A e $1-p_A$, e um segundo loco possui

os alelos *B* e *b*, em frequências de p_B e $1-p_B$, então, no equilíbrio, mesmo que os locos estejam ligados, a frequência esperada de um determinado haplótipo é o produto das frequências dos alelos constituintes desse haplótipo. Por exemplo, a frequência esperada do haplótipo AB, no equilíbrio, é $p_{AB}=p_A \times p_B$. O desequilíbrio de ligação é a diferença $D=p_{AB}-(p_A \times p_B)$. No equilíbrio, $D=0$ (MACKAY; POWELL, 2007).

O mapeamento por desequilíbrio de ligação, também conhecido como mapeamento de associação, detecta e localiza QTLs com base na intensidade da correlação entre marcadores moleculares mapeados e as características fenotípicas. O desequilíbrio de ligação entre dois locos é função do tempo (número de gerações) decorrido, desde que se iniciaram as gerações de recombinação e a frequência de recombinação entre os locos. Após várias gerações de recombinação, em uma população não estruturada, apenas correlações entre QTLs e marcadores proximamente ligados devem permanecer, facilitando o mapeamento mais fino (MACKAY; POWELL, 2007).

Para o mapeamento por desequilíbrio de ligação, não há necessidade de preparar uma população de mapeamento e o genoma inteiro é avaliado para identificar regiões associadas a um fenótipo em particular. O primeiro obstáculo para essa análise de associação é a presença, dentro da população, de subgrupos com distribuição desigual de alelos. Nesses casos, falsas associações positivas entre marcadores e fenótipo podem ser identificadas, mesmo que não haja ligação física entre os marcadores e os genes (BUCKLER; THORNSBERRY, 2002). Por esse motivo, a primeira etapa no mapeamento por associação (desequilíbrio de ligação) é identificar a existência de subgrupos. Isso pode ser feito pela construção de uma matriz de similaridade genética, estimada a partir dos marcadores moleculares.

Melhoramento genético assistido por marcadores moleculares

Retrocruzamento assistido

A utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por meio de retrocruzamento é um dos exemplos mais concretos de melhoramento assistido por marcadores. Germoplasmas não-adaptados têm sido utilizados em programas de melhoramento com o objetivo de introduzir características de herança simples, como resistência a doenças ou transgenes. A seleção pode ser feita para monitorar o gene de interesse ou o genoma recorrente, visando à redução do tempo para obtenção de linhagens convertidas e aumento da eficiência do programa, principalmente quando se objetiva a piramidação de dois ou mais genes de interesse.

Diferentes estratégias de retrocruzamento assistido podem ser aplicadas dependendo dos objetivos, sendo que o custo com as genotipagens pode ser compensado pela redução significativa no número de gerações para recuperar o genoma recorrente, principalmente com o alto valor agregado de um evento transgênico (GUIMARÃES et al., 2009). Ainda, considerando a significativa redução dos custos das novas tecnologias de marcadores, em situações onde o fenótipo é de avaliação complexa, a seleção com marcadores moleculares fornece a vantagem adicional na redução dos custos e na seleção precoce dos indivíduos de interesse.

SAM

A seleção de características simples com o auxílio de marcadores moleculares tem grande utilidade, quando a característica é de difícil medição ou quando se deseja selecionar para diversas características simultaneamente, como no caso de piramidação de genes. No entanto, a seleção assistida por marcadores (SAM) tem sua maior contribuição na seleção de caracte-

¹⁰Disponível no site: <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/cartographer.html>

rísticas quantitativas. Associações entre alelos de marcadores moleculares e alelos de QTLs podem ser usadas para selecionar, indiretamente, alelos favoráveis de QTLs. Para caracteres de baixa herdabilidade, a seleção fenotípica é realizada em gerações mais avançadas, pois a herdabilidade e a acurácia estatística da estimação das médias das progênies aumentam com o aumento do número de repetições, gerações, locais e anos de teste, o que leva a um aumento muito grande do número de plantas a ser avaliado. Assim, os melhoristas devem optar entre produzir estimativas mais precisas da média de um número menor de progênies ou amostrar um grande número de progênies, com estimativas menos precisas. A SAM apresenta-se como uma alternativa eficiente para permitir a seleção precoce de características de baixa herdabilidade. A seleção precoce diminui o número de plantas a ser analisado por família, o que permite a avaliação de um número muito maior de progênies. A SAM é mais efetiva em gerações iniciais de seleção entre progênies de cruzamentos entre linhas endogâmicas. Nessas gerações, a herdabilidade é baixa, pois o número de repetições é limitado e o desequilíbrio de ligação é alto. O paradoxo é que o poder de mapeamento de QTLs decresce, à medida que a herdabilidade decresce, e é menor justamente para características que teoricamente sofreriam o maior impacto pela SAM (LANDE; THOMPSON, 1990). Para evitar a detecção de falsas associações entre marcadores e QTLs, um nível de significância bastante alto é utilizado para se declarar associação entre um marcador e um QTL. A utilização de níveis de significância bastante estridentes na escolha dos marcadores aumenta a acurácia da SAM e produz ganhos significativos desta sobre a seleção fenotípica. Trabalhos mais recentes tendem a utilizar a regressão múltipla do fenótipo aos marcadores, como o método de identificar a associação entre marcadores e QTLs, e estimar o efeito dos marcadores (LANDE; THOMPSON, 1990). Regressão múltipla é um procedimento

computacionalmente mais simples do que o método da máxima verossimilhança, produzindo resultados muito similares (LANDE; THOMPSON, 1990).

Os resultados de estudos teóricos e experimentais permitem concluir que a SAM pode ser utilizada para aumentar substancialmente a eficiência dos programas de melhoramento (EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987; STUBER; EDWARDS; WENDEL, 1987; LANDE; THOMPSON, 1990). A eficiência da seleção assistida por marcadores, comparada com a seleção fenotípica, é afetada por diversos fatores, tais como, herdabilidade da característica, cobertura do genoma pelos marcadores, identificação de associação entre marcadores e QTLs, tamanho e número de famílias, tipo de população e escolha do método de seleção assistida por marcadores. A seleção que utiliza marcadores flanqueando o QTL também é mais eficiente do que a seleção que se baseia em um único marcador. LANDE; THOMPSON (1990) propuseram a teoria do índice de seleção, utilizando marcadores, que maximizam a taxa de ganhos genéticos pela combinação das informações do polimorfismo nos locos dos marcadores genéticos com dados da variação fenotípica entre os indivíduos. Esse índice pode ser usado tanto para a seleção individual, como para a seleção de linhas. Porém, a utilização desse índice requer testes de progênies com repetições, para a obtenção dos valores fenotípicos. A seleção que se baseia apenas em marcadores pode ser utilizada e possui eficiência semelhante ao índice, quando $p > 0,5$ para características de baixa herdabilidade, sendo p a proporção da variância genética aditiva da característica que é associada com o loco marcador.

Muitas características de importância econômica são afetadas por vários QTLs. Além de, em muitos casos, os QTLs para diferentes características apresentarem-se ligados (STUBER; EDWARDS; WENDEL, 1987; EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987). Como na maioria dos programas de melhoramento, o objetivo

é melhorar a *performance* para diversas características simultaneamente, o número de QTLs envolvidos em um programa de melhoramento facilitado por marcadores moleculares deve ser grande. Pela natureza intrínseca dos QTLs e pelo fato de caracteres quantitativos serem controlados por um grande número de genes de pequeno efeito, a seleção recorrente assistida por marcadores moleculares é uma escolha apropriada para o melhoramento de populações. Por meio de ciclos sucessivos de intercrossamentos e seleção, a seleção recorrente favorece a quebra de ligações genéticas, o que facilita a recombinação entre genes e aumenta a frequência de alelos favoráveis nas populações de melhoramento. O uso da seleção assistida por marcadores moleculares permite a identificação de combinações favoráveis de alelos, permitindo maiores ganhos com a seleção. Xie; Xu (1998) apresentaram uma comparação teórica entre diversos métodos de seleção recorrente com base em famílias e seleção massal, utilizando SAM e seleção fenotípica. A seleção recorrente assistida por marcadores foi duas vezes mais eficiente do que a seleção fenotípica, com famílias de tamanho pequeno, baixa herdabilidade e alta proporção da variação fenotípica explicada pelos marcadores (p). Com o aumento do tamanho da população, aumento da herdabilidade e diminuição de p , a vantagem da seleção assistida por marcadores diminuiu. Seleção assistida por marcadores é mais competitiva com a seleção fenotípica tradicional, quando a característica possui baixa herdabilidade. Se o objetivo do programa de melhoramento é maximizar a resposta por unidade de custo, a SAM pode ser inferior à seleção fenotípica, quando a herdabilidade é superior a 30% e o custo da avaliação fenotípica por indivíduo é menor do que a genotipagem do loco marcador.

O número de artigos científicos publicados anualmente com o termo *marker-assisted selection* ultrapassou a barreira de mil, no ano de 2003. No entanto, a quase totalidade desses artigos procura demonstrar a aplicação potencial da SAM

nos programas de melhoramento e não sua aplicação prática. Assim, o uso efetivo da SAM no desenvolvimento de variedades em programas de melhoramento tem-se limitado, em sua maior parte, às grandes empresas multinacionais, que têm desenvolvido ferramentas genômicas para as espécies de maior interesse comercial, tais como milho, soja, canola, algodão e girassol. Os programas de melhoramento que utilizam essas ferramentas têm desenvolvido estratégias para gerar um genótipo ideal, a partir da seleção de um mosaico de segmentos cromossômicos favoráveis. Utilizando essas ferramentas, tais programas de melhoramento têm relatado taxas de ganhos genéticos duas vezes superiores aos ganhos realizados com base na seleção fenotípica (XU; CROUCH, 2008). Estima-se que, nos Estados Unidos, a partir do ano de 2010, 12% das variedades comerciais sejam desenvolvidas por meio do melhoramento molecular (FRALEY, 2006).

Converter as informações publicadas na literatura científica em aplicações práticas de larga escala nos programas de melhoramento requer algumas considerações de ordem prática, logística e genética. Primeiramente, os marcadores moleculares publicados devem ser validados em um grande número de populações que sejam representativas do material de melhoramento. Em seguida, é necessário desenvolver um procedimento técnico simples, rápido e econômico para as etapas de amostragem de tecidos, extração de DNA, genotipagem e coleta de dados que seja viável e preciso quando aplicado rotineiramente em larga escala. Além disso, os melhoristas precisam desenvolver um sistema integrado, com rastreabilidade dos dados e sistemas de controle que assegurem a integração da genotipagem nos programas de melhoramento. Por fim, é fundamental delinear um sistema de melhoramento que permita otimizar ferramentas de tomada de decisão, para auxiliar melhoristas na seleção de forma rápida e precisa (XU; CROUCH, 2008).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.G. et al. **Heterotic groups in tropical maize germplasm by test crosses and simple sequence repeat markers.** *Genetics and Molecular Research*, v.7, n.4, p.1233-1244, 2008.
- BERNARDO, A.N. et al. **Discovery and mapping of single feature polymorphisms in wheat using Affymetrix arrays.** *BMC Genomics*, v.10, p.251, 2009.
- BRASIL. Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 abr. 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9456.htm>. Acesso em: 2009.
- BUCKLER IV, E.S.; THORNSBERRY, J.M. **Plant molecular diversity and applications to genomics.** *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, n.2, p.107-111, Apr. 2002.
- BUNDOCK, P.C. et al. **Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences.** *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, n.2, p.358-365, Jan. 2006.
- CHING, A. et al. **SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines.** *BMC Genetics*, v.3, p.19, Oct. 2002.
- DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. **Multifactorial genetics: the use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations.** *Nature Reviews Genetics*, v.3, n.1, p.22-32, Jan. 2002.
- DIVERSITY ARRAYS TECHNOLOGY. **Diversity arrays technology Pty Ltda (DART P/L).** [S.l., 200-]. Disponível em: <<http://www.diversityarrays.com>>. Acesso em: 2009.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. **Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize - I: numbers, genomic, distribution and type of gene action.** *Genetics*, v.116, n.1, p.113-125, May 1987.
- FRALEY, R. **Monsanto european investor day.** Saint Louis: Monsanto, 2006. Disponível em: <http://www.monsanto.com/dpf/investors/2006/EU_RobbFraleley_1110006.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2008.
- GARCIA, A. et al. **Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles.** *Theoretical and Applied Genetics*, v.117, n.4, p. 545-553, Aug. 2008.
- GUIMARÃES, C.T. et al. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: UFV, 2009. p.129-175.
- JACCOUD, D. et al. **Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping.** *Nucleic Acids Research*, v.29, n.4, p.e25, Feb. 2001.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. **A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers.** *Plant Journal*, v.4, p. 403-410, 1993.
- KUMAR, R. et al. **Single feature polymorphism discovery in rice.** *PLoS ONE*, v.2, n.3, p.e284, 2007.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. **Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits genetics.** *Genetics*, v.124, n.3, p.743-756, Mar. 2007.
- LANDER, E.S. et al. **Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations.** *Genomics*, v.1, n.2, p.174-181, Oct. 1987.
- LU, Y. et al. **Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms.** *Theoretical and Applied Genetics*, v.120, n.1, p.93-115, Dec. 2009.
- MACE, E.S. et al. **DART markers: diversity analyses and mapping in *Sorghum bicolor*.** *BMC Genomics*, v.9, p.26, 2008.
- MACKAY, I.; POWELL, W. **Methods for linkage disequilibrium mapping in crops.** *Trends in Plant Science*, v.12, n.2, p.57-63, Feb. 2007.
- MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. **OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species.** *Hereditas*, v.144, n.3, p.78-79, July 2007.
- NEFF, M.M. et al. **dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics.** *Plant*

Journal, v.14, n.3, p.387-392, May 1998.

OLIVEIRA, M.B. **Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microsatélites genotipados em sequenciador automático**. 2009. 88p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense, Umuarama.

OLSON, M. et al. A common language for physical mapping of the human genome. **Science**, v.254, p.1434-1435, 1989.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.8, p.985-993, Feb. 1993.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 586p.

_____. et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.247-253, Mar. 2004.

SILVA, D.C.G. et al. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, n.1, p.57-63, June 2008.

STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize - II: factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, v.27, n.4, p.639-648, July 1987.

USECHE, F.J. et al. High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences. **Genome Informatics**, v.12, p.194-203, 2001.

XIE, C.; XU, S. Strategies of marker-aided recurrent selection. **Crop Science**, v.38, n.6, p.1526-1535, Dec. 1998.

XU, Y.; CROUCH, J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v.48, n.2, p.391-407, Apr. 2008.

YE, S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.17, p.e88, Sept. 2001.

ZHU, Y.L. et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, Austin, v.163, n.3, p.1123-1134, Mar. 2003.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, n.2, p.176-183, Mar. 1994.

MUDAS DE OLIVEIRA

Garantia de procedência, mudas padronizadas,
qualidade comprovada e variedade identificada



Pedidos e informações:
EPAMIG - Fazenda Experimental de Maria da Fé
CEP: 37517-000 - Maria da Fé - MG
e-mail: femf@epamig.br - Tel: (35) 3662-1227

Importância da bioinformática na biotecnologia e na agropecuária

Vagner Katsumi Okura¹

Resumo - A Bioinformática tem tido um papel fundamental no progresso e nas descobertas da Biologia Molecular, visto sua atuação decisiva em manipular e interpretar gigantescas quantidades e variados tipos de dados biológicos, gerados pela Genômica, Genômica Funcional e Proteômica. Esses avanços na Biologia Molecular contribuíram para a criação de uma Biotecnologia Moderna, que se baseia em ferramentas da Engenharia Genética e principalmente no uso de informações biológicas disponíveis. Isso possibilita o desenvolvimento de novas cepas de microrganismos, novas variedades de plantas e novas raças de animais com características de interesse para a agropecuária.

Palavras-chave: Gene. RNA. Proteína. Genoma. Sequenciamento de DNA. Genômica. Transcriptoma. Proteoma. Melhoramento genético.

INTRODUÇÃO

A genética evoluiu bastante nas últimas décadas, principalmente com a descrição da estrutura de DNA em dupla hélice nos anos 50. Dentre as descobertas nesse período, é importante destacar os avanços na área da Biologia Molecular, como o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante (mais comumente conhecida como Engenharia Genética), e o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de DNA e sua automatização. Nas últimas décadas, também aconteceram avanços e descobertas na área de Computação. Os primeiros computadores foram inventados, melhorados e foi criada a internet. Da confluência entre as duas áreas, surgiu a Bioinformática, uma área multidisciplinar, que envolve a Computação, a Estatística e a Matemática no estudo e resolução de problemas da Biologia, particularmente da Biologia Molecular. A partir disso, com o lançamento do projeto do genoma humano, muitas outras iniciativas foram criadas,

com o objetivo de estudar os diferentes seres vivos por meio da Genômica, de onde tem sido gerada uma quantidade gigantesca de dados biológicos que cresce em ordem exponencial (Gráfico 1). Além da quantidade, aumenta também a variedade e a complexidade das informações biológicas. Isso alavanca a necessidade de computadores mais poderosos e com maior capacidade de armazenamento, e de modelos e métodos matemáticos, estatísticos e computacionais mais sofisticados, implementados em *softwares* de Bioinformática, o que envolve tanto a participação de especialistas dessas áreas, como necessita de profissionais que tenham uma formação multidisciplinar com conhecimento em Biologia - bioinformatas.

Essas revoluções tecnológicas têm possibilitado avanços em outras áreas de pesquisa, principalmente em Ciências Aplicadas como a Medicina, a Farmácia e a Agronomia. Dentro do campo agrônomo, os principais benefícios estão relacionados

com o desenvolvimento de novas variedades de plantas, novas raças de animais, e microrganismos 'engenheirados' por meio da Biotecnologia, que hoje está bastante apoiada no conhecimento gerado pela Biologia Molecular. Assim, além do melhoramento clássico usando marcadores genéticos, a Biotecnologia conta também com o melhoramento assistido por marcadores moleculares (MOOSE; MUMM, 2008) e com o melhoramento genético, a partir da transgenia (BRASILEIRO; CANÇADO, 2000).

O objetivo deste artigo é apresentar o papel da Bioinformática dentro dos campos de estudo da Genômica, Genômica Funcional e Proteômica. A proposta é mostrar sucintamente a motivação, a problemática e a aplicação da Bioinformática dentro desses campos de estudo. A intenção não é apresentar muitos detalhes sobre esses campos de estudo, nem tampouco mostrar todas as tecnologias vigentes e atuais, mas sim fornecer ao leitor uma visão ampla do estado da arte desse novo campo da ciência

¹Bioinformata, M. Sc., Pesq. Alellyx Applied Genomics S.A., CEP 13069-380 Campinas-SP. Correio eletrônico: vagner.okura@alellyx.com.br

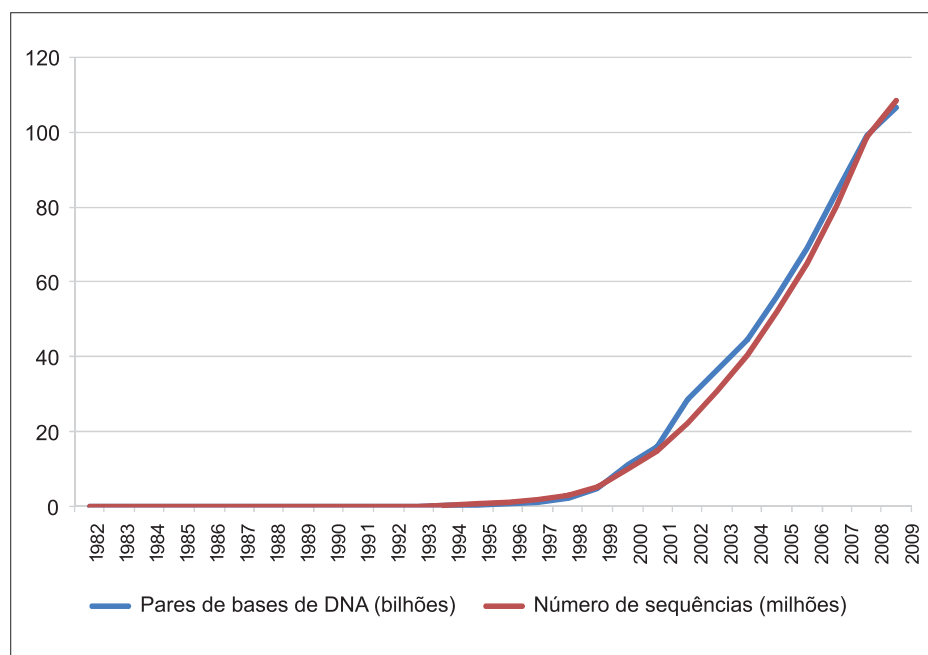


Gráfico 1 - Crescimento do Genbank – 1982 a 2009

FONTE: National Center for Biotechnology Information (2009a).

NOTA: Mostra o crescimento da quantidade de sequências e pares de bases de DNA depositados no banco de dados públicos GenBank, um banco público de sequências do National Center for Biotechnology Information (NCBI), um centro de excelência em Bioinformática.

que evolui com grande rapidez. Serão apresentados os desafios da Bioinformática e os benefícios para a agropecuária, que podem ser obtidos pela biotecnologia fundamentada nas informações geradas pela Biologia Molecular.

PAPEL DA BIOINFORMÁTICA

A Bioinformática tem por objetivo possibilitar o entendimento e permitir novas descobertas no campo da Biologia, utilizando, para isso, novas abordagens. Para chegar a este entendimento é preciso conhecer primeiramente as unidades básicas de estudo da Genômica – os genes. Além disso, estuda-se também como os genes funcionam e como eles interagem com outras moléculas. Um conceito básico e importante para saber como a Bioinformática trabalha é entender o dogma central da Biologia Molecular (CRICK, 1970): O DNA pode ser copiado para DNA (replacação de DNA), a informação do DNA pode ser copiada (transcrição) para uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) e as proteínas podem ser sintetizadas (tra-

dução) usando a informação do mRNA como molde.

Com os avanços tecnológicos é possível transformar a informação biológica (DNA, RNA, proteínas) contida nas células de um organismo vivo em informação digital. Para isso, a Bioinformática despande esforços para obter, processar, analisar, descrever, interpretar, armazenar, buscar e visualizar os dados biológicos. Ou seja, os diferentes instrumentos ou equipamentos que tratam o material biológico, produzindo dados brutos e em larga escala, que devem ser processados em dados legíveis pelo ser humano e também formatados em padrões adequados para ser armazenados e entendíveis por programas de computador. Os dados gerados estão sujeitos a erros, decorrentes da natureza biológica, da preparação do material ou do processo realizado pelo equipamento. De acordo com sua origem, os dados são analisados por programas de computador e, depois, descritos e interpretados manualmente ou automaticamente. Por fim, esses dados requerem um sistema de armazenamento

com grande capacidade, que permita que possam ser eficientemente recuperados e disponibilizados. Em cada uma dessas etapas, há necessidades diferenciadas de soluções de Bioinformática, as quais exigem a criação de diferentes métodos e modelos computacionais, estatísticos e matemáticos.

Além de suportar a geração e a interpretação, a Bioinformática atua nas predições sobre os dados biológicos. Com isso, novas hipóteses podem ser postuladas e testadas em laboratório, permitindo, assim, novos direcionamentos de pesquisa. Para isso, são exigidos modelos e métodos mais sofisticados, que possibilitem agregar e integrar diferentes fontes de dados, e, principalmente, profissionais que tenham embasamento biológico para entender e propor soluções eficientes para os problemas. A Bioinformática é, assim, muito mais que área de suporte, é uma área de atuação determinante e protagonista de muitas descobertas dentro da Biologia.

GENÔMICA – ESTUDANDO O DNA

O estudo dos genes de um organismo é o ponto de partida para o entendimento de seus processos biológicos. Em função da tecnologia de sequenciamento de DNA é possível determinar a sequência dos genes de um organismo. Atualmente, uma grande variedade de espécies tem tido seu genoma sequenciado, compreendendo microrganismos, plantas e animais (Quadro 1). Portanto, uma maneira atual de determinar a sequência dos genes de um organismo é pelo sequenciamento completo do genoma.

No sequenciamento completo do genoma, o objetivo é conhecer toda a informação genética de um organismo. Não existe hoje nenhum equipamento que consiga ler mais do que mil pares de bases de uma molécula de DNA de forma contínua. Mesmo as tecnologias mais recentes de sequenciamento de DNA (SHENDURE; JI, 2008), que conseguem produzir muito mais sequências com um custo menor, não chegam nesse limite. Em função disso, foram

QUADRO 1 - Quantidade de projetos de sequenciamento de genoma

Organismo	Completo	Montagem rascunho	Em andamento	Total
Procariotos	970	1.034	888	2.892
Eucariotos	22	186	174	382
Animais	4	75	60	139
Plantas	2	11	47	60
Fungos	10	74	39	123
Protistas	6	24	24	54
Total	992	1.220	1.062	3.274

FONTE: National Center for Biotechnology Information (2009d).

NOTA: Os números apresentados referem-se aos projetos genoma catalogados pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Completo - significa que a sequência dos cromossomos foi determinada completamente e submetida ao NCBI; Montagem rascunho - significa que há versões de sequências dos cromossomos depositadas no NCBI; Em andamento - significa que o projeto de sequenciamento está em um estágio inicial ou que as sequências dos cromossomos não estão depositadas no NCBI.

criadas duas estratégias de sequenciamento de genomas que quebram os cromossomos em fragmentos menores para serem lidos pelos sequenciadores automáticos. Uma das estratégias é conhecida como *shotgun* completo (*whole genome shotgun*). Os cromossomos são quebrados aleatoriamente, gerando fragmentos pequenos que alimentam os sequenciadores automáticos. A outra estratégia baseia-se em duas etapas de fragmentação. A primeira gera fragmentos bem mais longos, que são ordenados por técnicas de mapeamento de DNA. Na segunda etapa, são escolhidos quais fragmentos longos serão subfragmentados e sequenciados. O grande desafio, após o sequenciamento, é reconstituir a sequência dos cromossomos a partir da sequência dos fragmentos na ordem correta, o que caracteriza um dos grandes problemas da Bioinformática, chamado montagem de sequências. Esse não é um problema trivial, pois existem fatores que atrapalham o processo de montagem, como erros de sequenciamento e complexidade e tamanho do genoma.

Uma vez determinada a sequência dos cromossomos, é preciso identificar e descrever as sequências gênicas (anotação do genoma ou identificação de genes). A

identificação dos genes pode ser feita usando *softwares* para comparar cromossomos com outras sequências gênicas conhecidas, de onde podem ser identificados os trechos gênicos do cromossomo. Apesar de ser eficaz, essa abordagem de identificação depende de sequências previamente conhecidas. Outra abordagem com base em programas de computador para predição de genes baseia-se em modelos construídos a partir do conteúdo de sequências gênicas e sequências não gênicas conhecidas. Outro passo importante é descrever a função dos genes. A caracterização efetiva da função de um gene é realizada por meio de complexos e detalhados experimentos laboratoriais. A alternativa, nesse caso, é inferir a função do gene com base na similaridade com outras sequências já descritas, visto que genes com sequências similares em geral têm a mesma função. Para isso, são utilizados programas de Bioinformática que buscam informações em outros bancos de dados de sequências. Como exemplo, pode-se citar a ferramenta - *basic local alignment search tool* (BLAST) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2009b).

Apesar das muitas iniciativas representadas por projetos de sequenciamento

de genoma, o número de genomas completamente sequenciados é pequeno, principalmente para plantas e animais de interesse para a agropecuária. No universo dos vegetais, além da *Arabidopsis thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000), uma planta utilizada como modelo científico, foram determinadas as sequências completas dos genomas de arroz (GOFF et al., 2002; YU et al., 2002), sorgo (PATERSON, 2009), mamão Papaya (MING, 2008), uva (JAILLON, 2007) e *Populus* (álamo) (TUSKAN, 2006). No caso de animais com interesse para a pecuária, somente o genoma do boi foi sequenciado (ELSIK; TELLAM; WORLEY, 2009). Quando se trata de microrganismos, a quantidade de genomas sequenciados é bem maior, visto que são genomas menores e mais simples. Esses números (Quadro 1) refletem a dificuldade em sequenciar genomas completos de eucariotos, visto que muitos desses organismos têm genomas grandes e complexos. No entanto, esse também é mais um dos desafios da Bioinformática, ou seja, propor novas soluções, rápidas e acuradas, para montagem de genomas mais complexos.

GENÔMICA FUNCIONAL - ESTUDANDO O RNA

O estudo genético em nível de RNA tem um caráter mais dinâmico, se comparado com o estudo do DNA, e possui um campo amplo de pesquisa para entendimento da função e importância dos genes. No âmbito transcricional, o objetivo é aprender mais sobre a expressão dos genes e como isso afeta o funcionamento ou o desenvolvimento de um organismo. A expressão dos genes é influenciada pelo tempo de desenvolvimento, pela localização nos tecidos e pela interação com o ambiente. Uma das principais aplicações do estudo da expressão gênica é a prospecção de genes de interesse. Por exemplo, genes relacionados com a seca, o frio, ou o calor podem ser identificados a partir de experimentos que submetam organismos a condições de falta de água, de resfriamento

ou de aquecimento, respectivamente. Para isso, amostras de indivíduos ou de tecidos submetidos a estresses são comparadas com amostras controle (na ausência do estresse), de onde são identificados os genes que apresentam expressão diferencial em relação aos genes da amostra controle. A expressão diferencial dos genes pode ser estudada por meio do sequenciamento de *expressed sequence tags* (ESTs) e da tecnologia de microarranjos de DNA ou *microarray*, embora esta última seja bem mais utilizada para esta finalidade.

Sequenciamento de ESTs

O sequenciamento de ESTs é uma abordagem não só para determinar as sequências dos genes, mas também para avaliar seu nível de expressão. O sequenciamento de ESTs torna o processo de identificação dos genes mais rápido e menos dispendioso, se comparado com a abordagem de genoma completo, principalmente para aqueles de organismos altamente complexos, como os de plantas e animais, nos quais somente uma parcela de seu genoma é compreendida por genes, sendo a maior parte do genoma composta por sequências repetitivas. Por isso, muitos organismos têm seus genes estudados usan-

do o sequenciamento de ESTs (Gráfico 2). A abordagem, usando ESTs, pode ser utilizada para complementar o sequenciamento completo de genoma, principalmente na identificação dos genes.

O objeto de manipulação principal é o mRNA, que é uma cópia em RNA de um gene. A molécula de mRNA é copiada para uma molécula de DNA chamada DNA complementar (cDNA), que é clonada e então sequenciada. As sequências são então agrupadas por programas de bioinformática que produzem *contigs* ou *clusters* de EST (*clustering*). O número de cópias de mRNA está relacionado com o nível de expressão de um gene. Quanto maior o número de cópias de mRNA, maior é o nível de expressão do gene. Assim, o número de sequências de um *cluster* de EST é utilizado como medida de expressão de um gene e, com isso, diferentes experimentos podem ser realizados para medir a expressão dos genes sobre diferentes condições.

Essas análises são conhecidas como “digital differential display”, “Northern eletrônico” ou “Northern *in silico*”.

Além de ser uma alternativa direta de obtenção dos genes e uma plataforma para estudar a expressão gênica, o sequenciamento de ESTs possibilita a identificação

de marcadores moleculares que podem ser aplicados em programas de melhoramento. A identificação desses marcadores, como microssatélites e *single-nucleotide polymorphism* (SNPs) é realizada basicamente por programas de bioinformática. Atualmente, os microssatélites e os SNPs são os dois tipos de marcadores moleculares de uso predominante, por sua capacidade de detecção de polimorfismo genético e ampla aplicabilidade (APPLEBY; EDWARDS; BATLEY, 2009; ELLIS; BURKE, 2007).

Análise de microarranjos de DNA ou *microarrays*

A tecnologia de *microarray* permite que milhares de genes sejam avaliados simultaneamente. Um *microarray* de DNA ou *chip* de DNA é construído com base na sequência de genes já conhecidos, em geral genes obtidos do sequenciamento de genoma completo ou sequenciamento de ESTs. Um *microarray* consiste de uma lâmina composta por milhares de micropontos (*spots*) ordenados, onde são depositadas cópias de DNA de um mesmo gene (Fig. 1). O conceito básico de um microarranjo está na capacidade de hibridização (ligação) de moléculas de DNA pelo princípio da

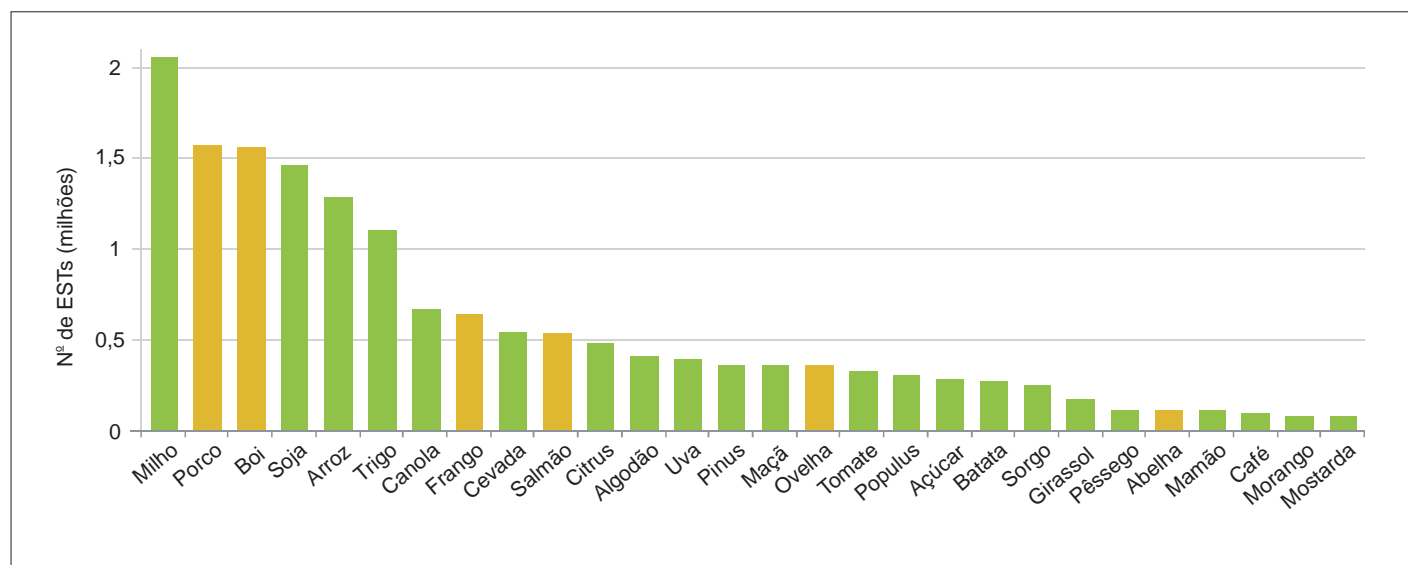


Gráfico 2 - Número de sequências de ESTs em milhões

FONTE: National Center for Biotechnology Information (2009a).

NOTA: Mostra o número de sequências de *expressed sequence tags* (ESTs) de algumas plantas (barra verde) e animais (barra laranja) de interesse para a agropecuária. As sequências estão depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

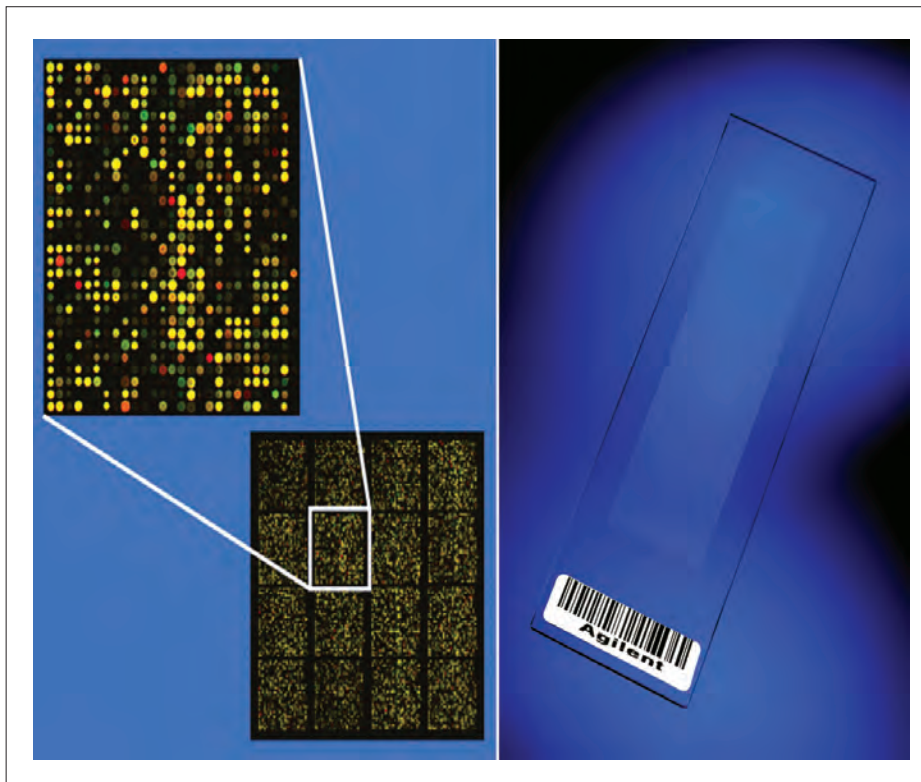


Figura 1 - Exemplo de hibridização de microarranjos de DNA com uma porção do chip de DNA em destaque (amplificado)

FONTE: University of Liverpool (2009) e Agilent Technologies (2009).

NOTA: Nesta técnica são avaliados simultaneamente em um único chip de pouco mais de 10 cm², cerca de 12 mil genes. Fotomontagem a partir de: The University of Liverpool, Liverpool, UK.

complementariedade. Isso possibilita a hibridização entre moléculas de DNA que têm a mesma sequência. Assim, amostras de moléculas de cDNA (copiadas de moléculas de mRNA), colocadas em contato com a lâmina de um *microarray*, devem-se hibridizar com seus respectivos genes depositados nos *spots*. Antes da hibridização, as moléculas de cDNA são marcadas com corantes. Dependendo do tipo do *microarray*, este pode ser usado para analisar duas amostras de mRNA, necessitando que cada amostra seja marcada com um corante diferente. Após hibridização, é feita a lavagem da lâmina, que em seguida é submetida a um raio laser que excita os corantes, gerando então uma imagem que apresenta diferentes intensidades de cores para cada *spot*. A intensidade de cor de um *spot* representa o nível de expressão do gene correspondente, a qual aumenta,

conforme o número de moléculas que são hibridizadas no *spot*.

Entram em cena as ferramentas de Bioinformática. Em primeiro lugar, são aplicados *softwares* que processam a imagem e convertem as intensidades de cores em valores numéricos. A seguir, são aplicados modelos estatísticos de normalização dos dados, visto que o processo de experimentação, ao usar *microarray*, está sujeito a erros. A normalização coloca os dados em uma mesma escala para que possam ser comparados entre si no passo seguinte. Por fim, os dados são analisados por diferentes métodos de agrupamentos para identificar os genes que são diferencialmente expressos.

Os dados de *microarray* têm aumentado bastante nos últimos anos, decorrentes da criação de diferentes plataformas de várias companhias e da redução do custo dos experimentos. Isso tem con-

tribuído para que diferentes organismos de interesse para agropecuária tenham sido estudados, usando plataforma de *microarray* (Gráfico 3). Além de ser usada principalmente para comparar padrões de expressão de genes, a tecnologia de *microarray* tem outras aplicações, tais como: determinar o genótipo de um indivíduo, detectar SNPs, analisar a interação entre DNA e proteína, analisar sequências que regulam a expressão dos genes, etc. (RHEE; DICKERSON; XU, 2006).

PROTEÔMICA – ESTUDANDO A PROTEÍNA

O entendimento das proteínas é um fator decisivo para a compreensão dos processos biológicos. Apesar da grande disponibilidade de informação para DNA e principalmente de mRNA, via sequenciamento de ESTs e *microarray*, de onde pode ser extraída muita informação acerca do nível de transcrição, ainda existem questões a ser respondidas na transferência de informação genética do RNA para a expressão de proteínas. Em geral, os genomas de eucariotos apresentam um número de proteínas maior do que o número de genes. Por exemplo, o ser humano possui em torno de 35 mil genes, mas o número de proteínas é bem maior. Uma justificativa para isso é o mecanismo conhecido como *splicing* alternativo (clivagem e remontagem alternativa), onde um mesmo gene codifica mais de uma proteína. Outro ponto é que nem todos os mRNAs codificam proteína. E nem sempre existe uma correlação entre a quantidade de transcritos e de proteínas, por causa dos mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais ainda não muito bem compreendidos.

Para estudar o proteoma de um organismo são usadas basicamente duas técnicas: eletroforese de proteínas e a espectrometria de massas (EM). De maneira geral, a primeira técnica separa as proteínas de uma amostra, possibilitando a comparação entre amostras de proteínas, e a segunda técnica é utilizada para identificar individualmente as proteínas que apresentaram expressão diferencial.

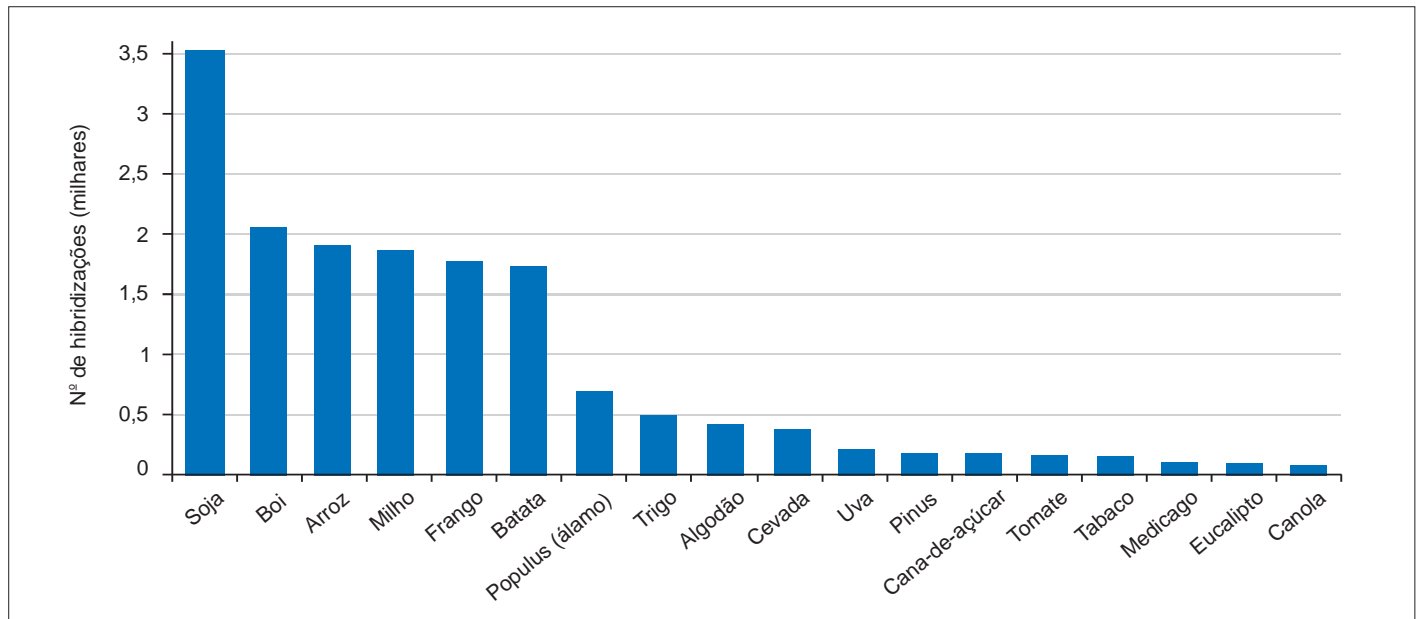


Gráfico 3 - Número de hibridizações de alguns organismos de interesse para agropecuária

FONTE: National Center for Biotechnology Information (2009e).

NOTA: As hidridizações estão depositadas no banco de dados de *microarray* do National Center for Biotechnology Information (NCBI), chamado Gene Expression Omnibus (GEO).

Eletroforese

A técnica de eletroforese separa as proteínas com base nas suas características química e física. A separação é feita em dois passos:

- o primeiro separa as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (PIE), as proteínas são colocadas em um gel preparado com gradiente de pH e são submetidas a um campo elétrico. Com isso há um movimento das proteínas segundo seu PIE;
- no segundo passo, é aplicada a eletroforese de policrilamida com carga elétrica perpendicular à orientação do passo anterior. As proteínas movem-se no gel segundo o seu tamanho. A visualização das proteínas no gel é obtida pela aplicação de corantes (Fig. 2).

Assim, uma amostra de proteínas em gel pode ser comparada com outra amostra de proteínas em gel, de onde são obtidas as proteínas com expressão diferencial pela comparação das intensidades dos corantes, que refletem a quantidade ou abundância

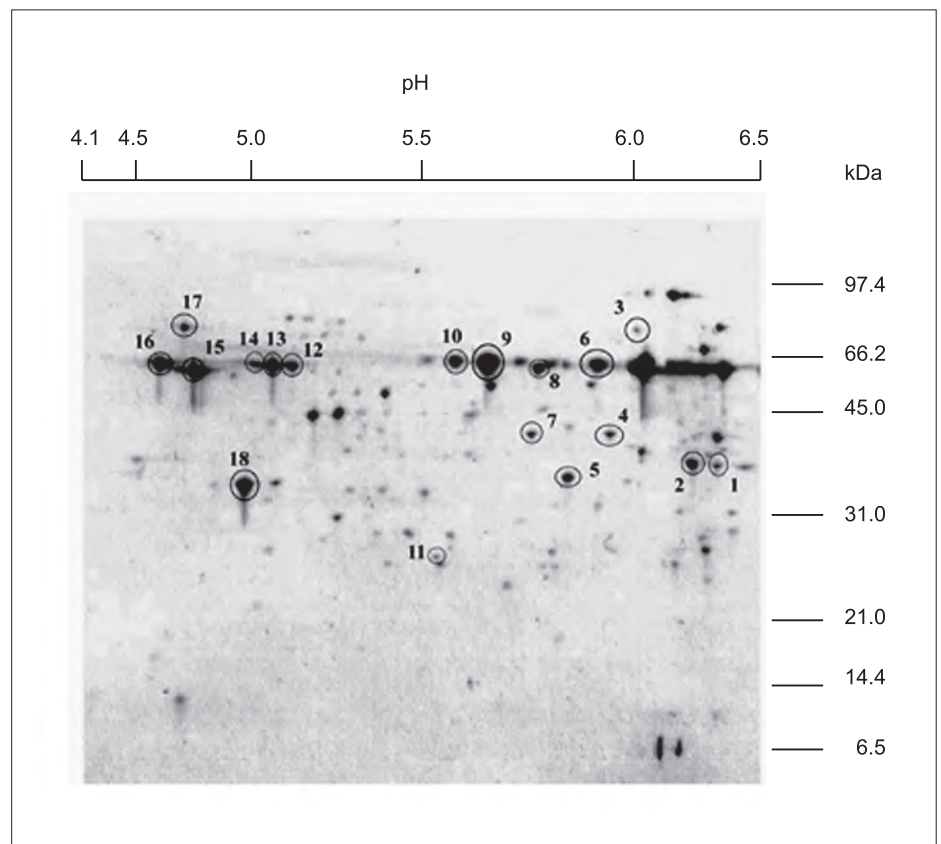


Figura 2 - Um típico gel bidimensional de proteínas obtido a partir de tecido de *Drosophila melanogaster*

FONTE: Karr (2008).

NOTA: A primeira separação de proteínas ocorreu inicialmente em função do ponto isoelétrico (PIE) entre pH de 4 a 7 e, posteriormente, pelo peso molecular (kDa).

de proteínas em cada amostra. As proteínas com expressão diferencial são cortadas do gel e analisadas pela espectrometria de massas. A técnica de eletroforese 2D (duas dimensões) é capaz de distinguir até 10 mil proteínas, e, para analisar as imagens de gel, são utilizados programas de bioinformática.

As proteínas obtidas com a eletroforese são analisadas com a espectrometria de massas, com o objetivo de fazer a sua identificação.

Espectrometria de massas

Espectrometria de massas é um método usado para medir precisamente o peso molecular de uma grande quantidade de substâncias. A identificação das proteínas é feita em dois passos. Primeiramente, as proteínas são cortadas ou digeridas com o uso de enzimas específicas em pedaços menores, que são colocados no espectrômetro de massas. Os dados obtidos são então analisados com ferramentas de Bioinformática que vão determinar a identidade das proteínas, com base na comparação com bancos de dados de proteínas tal como ExPASy Proteomics Server (SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2008).

Assim como a Genômica e Genômica Funcional, a Proteômica vem crescendo bastante com o aperfeiçoamento das técnicas e métodos para estudar proteínas, juntamente com o avanço da Bioinformática que busca desenvolver ferramentas de *software* de identificação, validação, quantificação e armazenamento de dados de proteínas (MATTHIESEN, 2007; PALAGI et al., 2006). Embora muitos organismos tenham estudos de proteoma já realizados, a maioria da pesquisa ainda está relacionada com humanos, leveduras, bactérias, *Arabidopsis* e arroz.

CONQUISTAS E NOVOS DESAFIOS PARA A BIOINFORMÁTICA

Após alguns anos de pesquisa, a Bioinformática tem conquistado bastante

espaço no mundo da ciência e da pesquisa aplicada. Ao fazer uma busca na internet com a palavra *bioinformatics*, é possível ver inúmeras páginas que exemplificam as fontes sobre Bioinformática. Atualmente, existem várias revistas científicas e livros que abordam o tema ou que são específicos sobre Bioinformática. São inúmeras as universidades, centros e institutos de pesquisa especializados em trabalhar com temas diversos da área, além de muitos serem centros de formação de cientistas e profissionais em Bioinformática. São também inúmeros e variados os bancos de dados biológicos e as ferramentas de *software* em Bioinformática. E isso reflete na grande contribuição da Bioinformática em várias descobertas científicas, o que tem promovido impactos diretos nos campos da medicina, da indústria e da agropecuária.

A Bioinformática tem pela frente muitos desafios. O primeiro é continuar sua atuação em tratar a grande quantidade de informação que foi, que está sendo e que será gerada. Ou seja, muito ainda pode ser feito para esgotar a busca, análise e interpretação dos dados acumulados. Em paralelo a isso, outras tecnologias recentemente criadas ou melhoradas continuam a gerar mais dados, com uma capacidade ainda maior. Outro grande desafio será atender e adaptar-se às tendências tecnológicas que surgem na área da Biologia Molecular.

Além disso, outro ponto importante é fazer com que toda informação gerada e acumulada seja transformada em conhecimento, por meio da integração e do cruzamento dos dados disponíveis, seguindo a tendência atual de entender de forma global e sistemática os processos biológicos. Esse novo conceito e forma de pensar estão abrigados em campo de estudo denominado Biologia de Sistemas. Isso significa integrar as informações sobre genomas, transcriptomas e proteomas com outras informações como o metaboloma, tanto para o mesmo organismo, como para espécies filogeneticamente próximas e entre espécies de reinos distintos.

APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA MOLECULAR NA AGROPECUÁRIA

O estudo de diversos organismos sobre a ótica da Biologia Molecular usando a Genômica, Genômica Funcional e Proteômica não se limitam apenas a organismos considerados modelo, que têm um grande interesse científico. É cada vez maior a quantidade de organismos que têm sido estudados, não apenas pelo interesse da ciência, mas principalmente pelo interesse econômico, social e ambiental, como é o caso de animais e plantas com interesse para a agropecuária. Assim, várias iniciativas de pesquisa em diferentes partes do mundo têm sido implementadas para gerar dados e informações sobre esses organismos. A aplicação desses dados, com dados gerados propriamente, tem ajudado as empresas de biotecnologia a criarem produtos com características superiores ou diferenciadas. Isso pode ser exemplificado pelas culturas do milho, soja e algodão, que têm sido melhoradas e comercializadas cada vez mais em todo o mundo.

Há ainda muitas outras plantas, animais e também microrganismos que têm sido melhoradas pela biotecnologia, por meio do melhoramento genético, usando marcadores, e pela transgenia. Isso é possível graças à geração e à disponibilização de dados biológicos, de onde podem ser pesquisados e identificados elementos que possam ser aplicados nos programas de melhoramento, como marcadores moleculares e genes de interesse, tais como genes de resistência a fatores e estresses bióticos e abióticos, genes que aumentam a produtividade e a qualidade nutricional. Além disso, outros elementos de regulação gênica podem ser requeridos, para aplicação do melhoramento por transgenia, como por exemplo, promotores que controlam o quanto, quando e onde um determinado gene será expresso. A escolha desses elementos é importante e requer ferramentas sofisticadas de bioinformática, que sejam capazes de buscar, identificar e analisar a ação dos elementos de interesse, assim como verificar se atendem às necessidades requeridas.

Além de marcadores moleculares e modificação genética por transgenia, a Biotecnologia Molecular possui ainda outras aplicações de interesse para a agropecuária, as quais vêm sendo utilizadas nas últimas duas décadas e podem ser beneficiadas com avanços na Biologia Molecular. Como exemplo, podemos citar as seguintes aplicações da Biotecnologia: testes de diagnose, desenvolvimento de vacinas, reprodução (inseminação artificial, clonagem, transferência de embrião, tratamento hormonal, etc.), fermentação, biofertilizante, biopesticidas e biorremediação (FAO, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Bioinformática é uma área de pesquisa recente e essencial para lidar com os grandes desafios da Biologia Molecular, da Genética e de muitas outras áreas do conhecimento. Esse grupo de ferramentas e conceitos tem promovido muitas descobertas para a ciência, como a publicação do genoma humano, e de outros organismos vegetais e animais como o arroz e, recentemente, o do boi. Com isso, inúmeros outros organismos têm sido estudados por meio da Genômica, da Genômica Funcional, da Proteômica, gerando cada vez mais dados. Dessa forma, cada vez mais os bancos de dados biológicos com informações diferentes e variadas vêm sendo criados. Assim, mesmo com o grande volume de informação disponível, muitas questões ainda não podem ser respondidas. Como um gene pode afetar a característica visível (fenótipo) de um organismo? Qual é o caminho que a informação genética percorre do gene, para o RNA, para a proteína, e então para formação de um tecido ou órgão em particular? Como os genes regulam outros genes? São exemplos de perguntas que resumem uma única questão: como a vida funciona? Embora as respostas para algumas dessas perguntas permaneçam incompletas e longe de serem totalmente compreendidas, hoje é claro constata-se que a Bioinformática terá um papel primordial e decisivo na elucidação dessas questões, visto que cada vez mais a Biologia Molecular tem-se tornado uma ciência que se baseia na avaliação global

e em larga escala de diferentes fontes de informação.

REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. **Image library**: life sciences and chemical analysis. Santa Clara, CA, [2009]. Disponível em: <www.agilent.com/about/newsroom/lscsca/imagelibrary>. Acesso em: ago. 2009.
- APPLEBY, N.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. New technologies for ultra-high throughput genotyping in plants. **Plant Genomics**. Methods in molecular biology series, v.513, p.19-39, 2009.
- THE ARABIDOPSIS genome initiative: analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408, n.6814, p.796-815, Dec. 2000.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CANÇADO, G.M. de A. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**. Biotecnologia, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.28-35, maio/jun. 2000.
- CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v.227, p.561-563, Aug. 1970.
- ELLIS, J.R.; BURKE, J.M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. **Heredity**, v.99, p.125-132, May 2007.
- ELSIK, C.G.; TELLAM, R.L.; WORLEY, K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.324, n.5926, p.522-528, Apr. 2009.
- FAO. Learning from the past: successes and failures with agricultural biotechnologies in developing countries over the last 20 years. In: CONFERENCE FAO BIOTECHNOLOGY FORUM, 16., 2009, [Rome]. [**Anais eletrônicos**]... Rome, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/C16doc.htm>>.
- GOFF, S.A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, v.296, n.5565, p.92-100, Apr. 2002.
- JAILLON, O. et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature**, v.449, p.463-467, Sept. 2007.
- KARR, T.L. Application of proteomics to ecology and population biology. **Heredity**, v.100, n.2, p.200-206, Aug. 2008.
- MATTHIESEN, R. Methods, algorithms and tools in computational proteomics: a practical point of view. **Proteomics**, v.7, n.16, p.2815-2832, Aug. 2007.
- MING, R. et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica*

papaya Linnaeus). **Nature**, v.452, n.7190, p.991-997, Apr. 2008.

MOOSE, S.P.; MUMM, R.H. Molecular plant breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. **Plant Physiology**, v.147, n.3, p.969-977, July 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Bethesda, 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: ago. 2009.

_____. **Blast**. Bethesda, 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: ago. 2009.

_____. **GenBank overview**. Bethesda, 2009c. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>>. Acesso em: ago. 2009.

_____. **Genome project**: statistics. Bethesda, 2009d. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>. Acesso em: ago. 2009.

_____. **Geo – Gene Expression Omnibus**. Bethesda, 2009e. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>>. Acesso em: ago. 2009.

PALAGI, P.M. et al. Proteome informatics - I: bioinformatics tools for processing experimental data. **Proteomics**, v.6, n.20, p.5435-5444, 2006.

PATERSON, A.H. et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v.457, n.7229, p.551-556, Jan. 2009.

RHEE, S.Y.; DICKERSON, J.; XU, D. Bioinformatics and its applications in plant biology. **The Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.335-360, 2006.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v.26, n.10, p.1135-1145, Oct. 2008.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **ExpASY proteomics server**. [S.l., 2008]. Disponível em: <<http://ca.expasy.org/sprot>>. Acesso em: ago. 2009.

TUSKAN, G.A. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, v.313, n.5793, p.1596-1604, Sept. 2006.

UNIVERSITY OF LIVERPOOL. Liverpool, UK, 2009. Disponível em: <http://www.liv.ac.uk/lmf/about_microarrays.htm>. Acesso em: ago. 2009.

YU, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, v.296, n.5565, p.79-92, Apr. 2002.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

INTRODUÇÃO

O Informe Agropecuário é uma publicação seriada, periódica, bimestral, de caráter técnico-científico e tem como objetivo principal difundir tecnologias geradas ou adaptadas pela EPAMIG, seus parceiros e outras instituições para o desenvolvimento do agronegócio de Minas Gerais. Trata-se de um importante veículo de orientação e informação para todos os segmentos do agronegócio, bem como de todas as instituições de pesquisa agropecuária, universidades, escolas federais e/ou estaduais de ensino agropecuário, produtores rurais, empresários e demais interessados. É peça importante para difusão de tecnologia, devendo, portanto, ser organizada para atender às necessidades de informação de seu público, respeitando sua linha editorial e a prioridade de divulgação de temas resultantes de projetos e programas de pesquisa realizados pela EPAMIG e seus parceiros.

A produção do Informe Agropecuário segue uma pauta e um cronograma previamente estabelecidos pelo Conselho de Difusão de Tecnologia e Publicações da EPAMIG, conforme demanda do setor agropecuário e em atendimento às diretrizes do Governo. Cada edição versa sobre um tema específico de importância econômica para Minas Gerais.

Do ponto de vista de execução, cada edição do Informe Agropecuário terá um coordenador técnico, responsável pelo conteúdo da publicação, pela seleção dos autores dos artigos e pela preparação da pauta.

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS ORIGINAIS

Os artigos devem ser enviados em CD-ROM ou pela Internet, no programa Word, fonte Arial, corpo 12, espaço 1,5 linha, parágrafo automático, justificado, em páginas formato A4 (21,0 x 29,7cm).

Os quadros devem ser feitos também em Word, utilizando apenas o recurso de tabulação. Não se deve utilizar a tecla *Enter* para formatar o quadro, bem como valer-se de “toques” para alinhar elementos gráficos de um quadro.

Os gráficos devem ser feitos em Excel e ter, no máximo, 15,5 cm de largura (em página A4). Para tanto, pode-se usar, no mínimo, corpo 5 para composição dos dados, títulos e legendas.

As fotografias a serem aplicadas nas publicações devem ser recentes, de boa qualidade e conter autoria. Podem ser enviadas em papel fotográfico (9 x 12 cm ou maior), cromo (slide) ou digitalizadas. As foto-grafias digitalizadas devem ter resolução mínima de 300 DPIs no formato mínimo de 15 x 10 cm e ser enviadas em CD-ROM ou ZIP disk, preferencialmente em arquivos de extensão TIFF ou JPG.

Não serão aceitas fotografias já escaneadas, incluídas no texto, em Word. Enviar os arquivos digitalizados, separadamente, nas extensões já mencionadas (TIFF ou JPG, com resolução de 300DPIs).

Os desenhos devem ser feitos em nanquim, em papel vegetal, ou em computador no Corel Draw. Neste último caso, enviar em CD-ROM ou pela Internet. Os arquivos devem ter as seguintes extensões: TIFF, EPS, CDR ou JPG. Os desenhos não devem ser copiados ou tirados de Home Page, pois a resolução para impressão é baixa.

PRAZOS E ENTREGA DOS ARTIGOS

Os colaboradores técnicos da revista Informe Agropecuário devem observar os prazos estipulados formalmente para a entrega dos trabalhos, bem como priorizar o atendimento às dúvidas surgidas ao longo da produção da revista, levantadas pelo coordenador técnico, pela Revisão e pela Normalização. A não-observância a essas normas trará as seguintes implicações:

- os colaboradores convidados pela Empresa terão seus trabalhos excluídos da edição;
- os colaboradores da Empresa poderão ter seus trabalhos excluídos ou substituídos, a critério do respectivo coordenador técnico.

O coordenador técnico deverá entregar ao Departamento de Publicações (DPPU) da EPAMIG os originais dos artigos em CD-ROM ou pela Internet, já revisados tecnicamente, 120 dias antes da data prevista para circular a revista. Não serão aceitos artigos entregues fora desse prazo ou após o início da revisão lingüística e normalização da revista.

O prazo para divulgação de errata expira seis meses após a data de publicação da edição.

ESTRUTURAÇÃO DOS ARTIGOS

Os artigos devem obedecer a seguinte seqüência:

- título:** deve ser claro, conciso e indicar a idéia central, podendo ser acrescido de subtítulo. Devem-se evitar abreviaturas, parênteses e fórmulas que dificultem a sua compreensão;
- nome do(s) autor(es):** deve constar por extenso, com numeração sobrescrita para indicar, no rodapé, sua formação e títulos acadêmicos, profissão, instituição a que pertence e endereço. Exemplo: Eng^o Agr^o, D.Sc., Pesq. U.R. EPAMIG SM, Caixa Postal 176, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: ctsm@epamig.br;
- resumo:** deve constituir-se em um texto conciso (de 100 a 250 palavras), com dados relevantes sobre a metodologia, resultados principais e conclusões;
- palavras-chave:** devem constar logo após o resumo. Não devem ser utilizadas palavras já contidas no título;
- texto:** deve ser dividido basicamente em: Introdução, Desenvolvimento e Considerações finais. A Introdução deve ser breve e enfatizar o objetivo do artigo;
- agradecimento:** elemento opcional;
- referências:** devem ser padronizadas de acordo com o “Manual para Publicação de Artigos, Resumos Expandidos e Circulares Técnicas” da EPAMIG, que apresenta adaptação das normas da ABNT.

Com relação às citações de autores e ilustrações dentro do texto, também deve ser consultado o Manual para Publicações da EPAMIG.

NOTA: Estas instruções, na íntegra, encontram-se no “Manual para Publicação de Artigos, Resumos Expandidos e Circulares Técnicas” da EPAMIG. Para consultá-lo, acessar: www.epamig.br, entrando em Publicações ou Biblioteca/Normalização.

INFORME AGROPECUARIO

Tecnologias para o Agronegócio



Assinatura e vendas avulsas
publicacao@epamig.br
(31) 3489-5002



A FAPEMIG TAMBÉM APOIA O SETOR DE BIOTECNOLOGIA

Minas Gerais possui um dos principais pólos de biotecnologia do país. O setor é considerado estratégico pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), que mantém diversas linhas de financiamento destinadas a ampliar a produção científica e incentivar a inovação. Dessa forma, contribui para o desenvolvimento do Estado e a melhoria da qualidade de vida da população.

FAPEMIG