



Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal

Márcio Elias Ferreira

Fábio Gelape Faleiro

Abstract

Plant breeding is based on phenotypic selection, which represents the collective effect of expressed genes interacting with the environment. Improvement is achieved without knowledge of the genes or their role on the observed phenotype at the cellular level. In general, plant breeding has been very successful in developing plants with higher yield and quality, and more adapted to biotic and abiotic stresses. The advances in molecular genetics, molecular biology and genomics are significantly contributing to expand the knowledge of the genetic make up of living organisms. These areas also offer practical solutions to agriculture problems. Some tools could be valuable to help breeding programs to cope with complex quantitative traits, such as drought tolerance. One possibility is the use of indirect selection based on DNA sequences associated with the trait of interest, or even DNA manipulation of genes controlling the phenotype, what is known as molecular breeding. Molecular breeding based on indirect selection of molecular markers associated with a gene of interest by modified backcross method is currently extensively used in breeding programs. Marker assisted selection for quantitative traits, however, is very limited. The direct insertion of genes of interest in the target plant genome through genetic engineering is also relevant. Molecular breeding through genetic engineering has important commercial impact for only a few monogenic traits, such as herbicide and insect resistance. The acreage planted annually with transgenic crops grows steadily. However, the repertoire of genes with commercial impact on agriculture currently available for breeding through genetic engineering is restricted to a few examples. For example traits, such heterosis, the knowledge of the genetic control at the molecular level via high throughput genome re-sequencing and expression analysis is promising. Nonetheless, the current impact of biotechnology on breeding for quantitative traits in conventional breeding programs is still very limited.



Introdução

A biotecnologia refere-se a um conjunto de técnicas que utilizam os seres vivos no desenvolvimento de processos e produtos. A biotecnologia é ampla, envolve várias áreas do conhecimento e é, geralmente, multidisciplinar. Apesar de o termo “biotecnologia” ser novo, o princípio é muito antigo, geralmente associado a uma função econômica e (ou) social. A utilização da levedura na fermentação da uva e do trigo para produção de vinho e pão, por exemplo, é milenar. Com o avanço da ciência em suas diversas áreas, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas, aumentando seus benefícios econômicos e sociais.

A descoberta da estrutura do DNA marca o início de uma extraordinária revolução no conhecimento da biologia dos seres vivos. A possibilidade de manipular e alterar o código genético dos seres vivos no desenvolvimento de processos e produtos foi enormemente ampliada. As áreas de biologia molecular e de genética molecular, por exemplo, permitem a manipulação controlada e intencional do DNA nos seres vivos. Por meio de técnicas de engenharia genética, foi possível, entre inúmeros outros avanços, a produção de insulina humana em bactérias e o desenvolvimento de plantas e animais transgênicos a partir da década de 1980. Os exemplos de técnicas e processos biotecnológicos são vastos (Fig. 1): as técnicas de fermentação industrial na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas; a utilização de biofungicidas no controle biológico de pragas e doenças; o uso de microrganismos visando à biodegradação de lixo e esgoto; o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos para a melhoria de produtividade das plantas; o desenvolvimento de plantas e animais melhorados utilizando técnicas convencionais de melhoramento genético em combinação com a engenharia genética.

É incontestável que as aplicações da biotecnologia vegetal na agricultura vêm crescendo significativamente. A biotecnologia oferece, neste instante, importantes ferramentas para os programas de melhoramento genético. Entretanto, a utilização dessas ferramentas em rotina nos programas de melhoramento genético ainda não é uma realidade. Neste capítulo, é feita uma análise das aplicações e do real impacto da biotecnologia no melhoramento genético vegetal, por meio de um paralelo entre o melhoramento clássico e molecular. Uma reflexão sobre o futuro do melhoramento genético vegetal frente às inovações e avanços da biotecnologia também é apresentada.

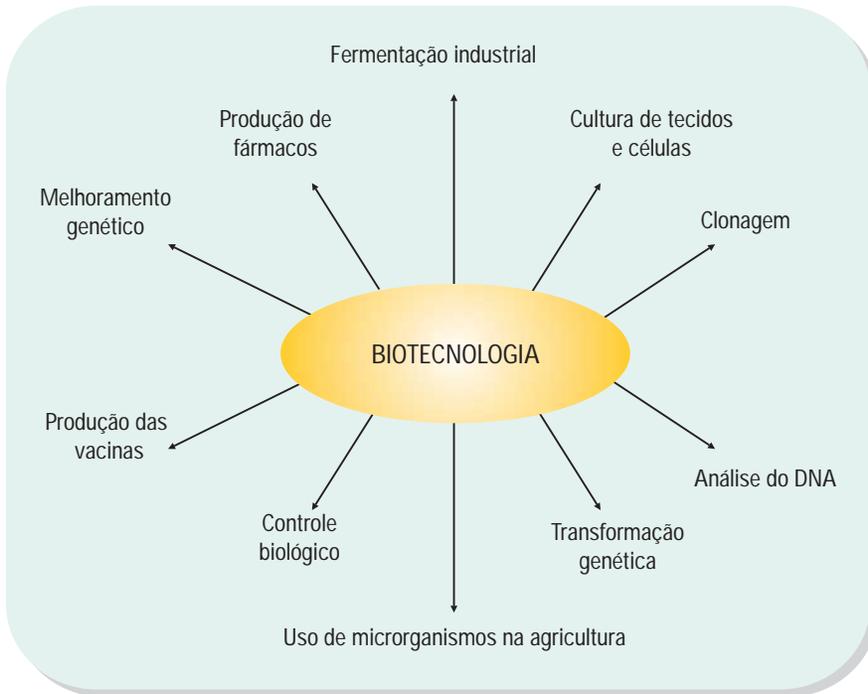


Fig. 1. Algumas áreas e técnicas associadas à biotecnologia.

A Biotecnologia no Melhoramento Genético

O progresso no desenvolvimento de variedades de plantas adaptadas e produtivas em regiões tropicais tem sido notável. O emprego de tecnologia na agricultura é um forte componente desse incremento em competitividade. O melhoramento genético de plantas tem contribuído significativamente para esse desenvolvimento. Quase todas as variedades utilizadas até agora na agricultura moderna foram desenvolvidas por métodos clássicos de melhoramento genético. Ou seja, o melhoramento tem sido baseado na seleção do fenótipo observável, que representa o efeito coletivo dos genes expressos em interação com o ambiente. Isso é feito sem que sejam conhecidos os genes envolvidos ou o papel desses genes na maquinaria celular.

A genética molecular, a engenharia genética e a genômica, base para desenvolvimento de técnicas de biotecnologia, apresentam formidáveis avanços no conhecimento, especialmente da constituição genética básica dos organismos vivos.



Essas áreas, além de contribuírem de forma inquestionável para o avanço do conhecimento, também oferecem soluções práticas específicas, com impacto na agricultura. São muitos os exemplos no campo de variedades ou processos derivados dessas áreas do conhecimento. Na última década, observou-se, por exemplo, o uso cada vez maior de variedades transgênicas na produção de grãos e produtos de grandes culturas agrícolas (por exemplo: soja, milho, algodão) (Fig. 2). Da mesma forma, a genética molecular tem sido explorada em vários segmentos, como nos testes de pureza genética de sementes melhoradas, na pirimidização de genes de resistência em variedades suscetíveis, no mapeamento genético de genes que controlam características complexas, na clonagem posicional de genes de impacto na agricultura, na introgressão assistida de genes de interesse em variedades elite, entre outras áreas de aplicação comercial (FERREIRA, 2003).

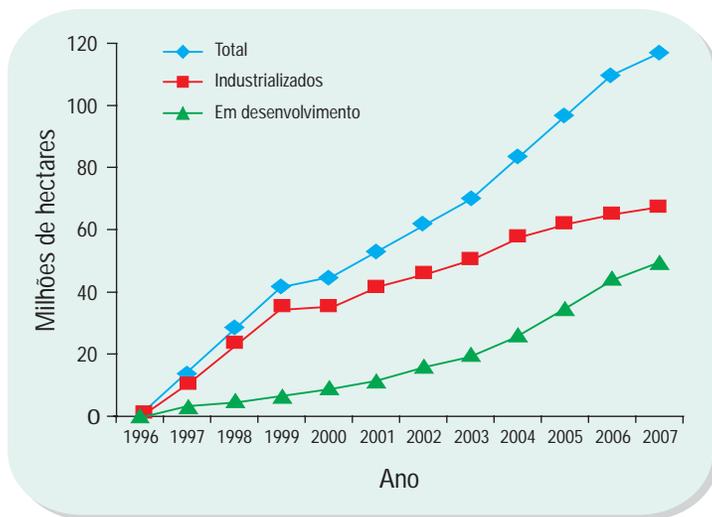


Fig. 2. Incremento da área cultivada com variedades transgênicas em países industrializados e em desenvolvimento.

Fonte: James (2008)

Mas, com poucas exceções, as ferramentas biotecnológicas, especialmente da genômica, ainda não estão inseridas nas rotinas dos programas de melhoramento de plantas. É fato que alguns programas de melhoramento de grandes corporações privadas já adotam algumas ferramentas. Mas a realidade dos programas de menor envergadura



financeira, especialmente os programas públicos, ainda é diferente. A análise genômica, por exemplo, embora cada vez mais acessível, ainda demanda orçamentos vultosos para a análise de grandes quantidades de plantas. E um programa de melhoramento típico baseia-se na análise, a cada ano, de milhares de recombinantes para selecionar os mais promissores. É oportuna, pois, uma reflexão sobre o potencial impacto do avanço do conhecimento da estrutura e função dos genomas de espécies agrícolas nos programas de melhoramento genético. Para tal reflexão, é essencial o entendimento da unidade básica da herança: o gene.

Definição de gene

Para melhor apreciarmos o impacto dessas áreas de ponta no melhoramento genético, é interessante rever a definição do foco de atenção desses programas: o gene, ou combinação de genes, e sua associação com o fenótipo. Isso porque o conceito de gene vem sofrendo alterações ao longo do tempo, à medida em que o conhecimento sobre o genoma avança. Parece contraditório, mas o avanço do conhecimento vem tornando a definição de gene aparentemente mais difícil, tal a complexidade do genoma. O seqüenciamento recente de genomas inteiros, por exemplo, revela que o número de genes estimado em uma espécie como o ser humano é bem menor do que se imaginava (dos aproximadamente 100 mil estimados na literatura científica, por volta do ano 2000, o número estimado atualmente está em torno de 21 mil) (VENTER et al., 2001). É claro que esse valor é afetado diretamente pela própria definição de gene. O número de transcritos de RNA observados no genoma humano é significativamente mais elevado do que o esperado. A atividade transcricional é intensa, extensa e complexa. Entre as razões para a discrepância entre a estimativa do número de genes e a significativa atividade transcricional, encontra-se, por exemplo, o processamento alternativo (*“alternative splicing”*) dos introns de uma seqüência gênica em eucariotos, o que possibilita a tradução de diferentes polipeptídeos a partir da mesma seqüência gênica, pela definição atual. Isso representa uma revisão do dogma central da biologia molecular, isso é, cada gene codifica uma proteína (ou polipeptídeo). Na verdade, em eucariotos, um gene, pela definição em voga, pode codificar diferentes polipeptídeos ou RNA. Portanto, o conhecimento atual sobre o gene pode ter impacto no desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento genético com base em avanços da biotecnologia.



Há muito, a definição de gene e a busca de sua estrutura e função têm sido objeto de grande interesse científico (revisto por WALLACE, 1992). Na antiguidade, já se buscava uma explicação para a hereditariedade, mas somente o trabalho seminal de Mendel (1865) e a redescoberta dos princípios mendelianos por experimentos independentes no início do século passado é que inauguram a genética e a definição de gene. O termo gene é derivado de “pangeneses”, a hipótese (incorreta) de hereditariedade que implicava no desenvolvimento de organismos a partir de um princípio total, completo (homínculo), presente nos fluidos reprodutivos. A primeira definição de gene, baseada nos princípios mendelianos, coube a Johannsen, que usou o termo pela primeira vez para qualificar condições independentes e determinantes com que as características de um organismo são especificadas. As definições iniciais de gene são mais genéricas, visto que o conhecimento da base genética da hereditariedade ainda era precário naquela época.

Nos primeiros anos da genética, o gene era visto como uma entidade abstrata, arranjada linearmente nos cromossomos, como contas em um colar, cuja existência é refletida na maneira como os fenótipos são transmitidos entre gerações. Com a descoberta da estrutura do DNA, o gene passa a ser visto como uma seqüência de nucleotídeos que reside na molécula de DNA. Os genes passaram a ser compreendidos como moldes para as proteínas, cujo princípio central foi sumarizado no dogma de que um gene codifica uma proteína. A hereditariedade passa a ter, então, uma base física, a molécula de DNA.

Esse entendimento foi complementado, nos anos seguintes, pela visão de que o gene é um código que reside na molécula de ácido nucléico e que leva a um produto funcional por meio de intermediários, como o RNA. A partir da década de 1970, o gene é entendido simplesmente como ORF (*Open Reading Frame*), cuja seqüência é definida por códons de iniciação e terminação, identificáveis em uma região do genoma. O DNA, sabe-se então, é composto de regiões codantes e não-codantes (“*junk*” DNA). Mais recentemente, nos anos 1980 e 1990, o gene tem sido compreendido como um segmento de DNA que contribui para um fenótipo ou uma função, e que, na ausência de função demonstrável, pode ser caracterizado por seqüência, transcrição ou homologia com outras seqüências conhecidas, com o auxílio da bioinformática.



Mais recentemente, o gene foi definido ainda como uma seqüência genômica localizável, correspondente a uma unidade de herança, que está associada com seqüências regulatórias, regiões transcritas e (ou) outras regiões de seqüências funcionais (PEARSON, 2006). O gene é entendido como a união de seqüências genômicas que codificam um conjunto coerente de produtos funcionais sobrepostos. Em uma analogia com a informática, o gene, portanto, é visto como uma sub-rotina de um enorme sistema operacional, que é o genoma. Essa sub-rotina é repetitivamente ativada pelo sistema operacional de acordo com a necessidade do organismo, alguns em maior escala, outros em menor escala. No entanto, os primeiros resultados do projeto Encode (*Encyclopedia of DNA elements*) (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2008), cujo objetivo é a análise em escala de transcritos do genoma humano para compreensão da sua estrutura e função, indicam que o genoma pode ser comparado a um sistema operacional, mas as sub-rotinas não teriam o controle rígido de um modelo estruturado de programação.

A definição de gene, portanto, não é trivial e tem sido dinâmica. Processamento (*splicing*), regulação e transcrição intergênica são fatores que grandemente afetam esse comportamento. O gene, enfim, pode ser visto como a união de seqüências genômicas que codificam um conjunto coerente de produtos funcionais (RNA ou proteína) potencialmente sobrepostos (GERSTEIN et al., 2007). Em outras palavras, gene é uma seqüência genômica (DNA ou RNA) que codifica diretamente moléculas funcionais (RNA ou proteína). Caso existam vários produtos funcionais dividindo regiões sobrepostas, o gene é visto como a união das regiões genômicas que os codificam. Essa união deve ser coerente, isto é, feita separadamente para os produtos finais (proteína ou RNA), mas não requer que todos os produtos necessariamente dividam uma subseqüência comum. Essa visão tem como consequência a não inclusão de seqüências regulatórias como parte do gene. Isso implica que dois transcritos que se originam do mesmo sítio de início de transcrição e, portanto, têm o mesmo promotor e elementos regulatórios, mas não têm nenhum elemento do bloco de seqüências em comum (exons) no produto final devido ao processamento alternativo dos introns, não seriam produtos de um mesmo gene. Portanto, o produto final de um gene é usado como referência para a definição de gene.

Se essa visão é adotada, isso significa que o cômputo do número de genes do genoma humano, por exemplo, aumentará sobremaneira, visto que muitas seqüências até agora contabilizadas como um único gene, por serem adjacentes ou se referirem a um



conjunto específico de exons, poderão agora ser contabilizadas como vários genes por não terem elementos em comum no produto final. O mesmo é válido para o genoma de plantas. Vale ressaltar que um gene pode não corresponder, ainda, a um único loco genético. Há muitos exemplos de produtos gênicos codificados por um mesmo gene, mas que possuem seqüências separadas no cromossomo, ou mesmo em cromossomos distintos (PEARSON, 2006). Essas regiões podem estar fisicamente muito próximas devido ao dobramento e estrutura tridimensional dos cromossomos. Regiões promotoras, reguladoras e não traduzidas (UTRs) dos genes ganham a nova classificação de regiões associadas aos genes. No caso mais simples, o gene define uma molécula funcional de RNA ou proteína. No mais geral, é uma região composta de módulos que podem ser combinados de diferentes formas para gerar diferentes produtos funcionais.

Entender o gene, portanto, é tarefa complexa, pois envolve considerações sobre seqüência, incluindo regulação de expressão, transcrição e tradução, até o produto final. Entender o que é o gene e como o genoma funciona é importante para o futuro do melhoramento genético. O melhoramento, conforme mencionado, vem tendo muito sucesso sem esse conhecimento. Mas, com certeza, terá muito mais sucesso, provavelmente em uma dimensão ainda maior, com a incorporação desse conhecimento e da tecnologia que o acompanha nas suas rotinas. Esses avanços só terão valor para o melhoramento genético se compreendermos a relação entre a variação de alélica e a variação do fenótipo observado em um determinado ambiente.

Se for correta a visão de que o modo de fazer melhoramento genético de plantas vai mudar nos próximos anos, com a utilização cada vez em maior escala da informação de genética molecular e de genômica estrutural e funcional, vale a pena explorar algumas dos conceitos atuais que poderão ter impacto nessa estratégia, bem como algumas das potenciais limitações. É importante frisar que o melhoramento genético clássico teve e continuará a ter, por muito tempo, um grande impacto no desenvolvimento de novas variedades. O melhoramento é eficiente, a despeito do conhecimento genômico, mas não há dúvida de que há um grande avanço tecnológico em andamento. Resta saber o efeito prático desse avanço, nos próximos anos, na alteração nas rotinas de melhoramento genético por técnicas como, por exemplo, marcadores moleculares e análise genômica estrutural.



O melhoramento clássico e o melhoramento molecular

Os avanços da biologia molecular, da genética molecular e da genômica oferecem oportunidades de modificar e (ou) adaptar os métodos de melhoramento com base no conhecimento do genoma. As duas principais linhas de melhoramento molecular, isto é, do melhoramento genético que incorpora estratégias, métodos e conhecimentos destas áreas do conhecimento na manipulação de seqüências de DNA que afetam o fenótipo de interesse, incluem no momento: (1) a seleção baseada na detecção de variação genotípica (em locos de marcadores moleculares) associada à variação fenotípica nos programas de melhoramento genético e (2) a inserção direta de genes por diferentes estratégias de engenharia genética nas espécies de interesse.

O melhoramento genético clássico possibilita a criação de novas combinações de genes por diferentes métodos, desenvolvidos e aperfeiçoados no último século. Utiliza-se o cruzamento sexual entre plantas da mesma espécie e, quando possível, com parentes próximos, que possuem características desejáveis, capitalizando na recombinação gênica para a seleção e fixação dos genes de interesse em novas linhagens. O notável avanço do melhoramento genético nos últimos 100 anos tem sido feito sem a compreensão da base molecular e fisiológica das características que estão sendo melhoradas. Um exemplo simbólico para ilustrar este ponto é a tão discutida Revolução Verde, responsável pelo aumento na produção de cereais na segunda metade do século XX.

A Revolução Verde baseou-se na exploração de variedades semi-anãs de trigo e de arroz pelo melhoramento clássico, sem que fosse conhecida a base molecular das seqüências envolvidas e o seu efeito na fisiologia das variedades semi-anãs. O impacto dessa estratégia simples e elegante na produtividade de arroz e trigo foi enorme, solucionando a escassez de alimentos e potencial fome em escala que se intensificavam em vários países do mundo após a Segunda Grande Guerra. O interessante é que só recentemente o gene *Rht*, responsável pelo fenótipo em trigo (PENG et al., 1999), foi clonado. Da mesma forma, o gene *sd1* de arroz, responsável por plantas de menor porte, resistentes ao acamamento sob condições de adubação nitrogenada, foi seqüenciado, e a sua base fisiológica desvendada (MONNA et al., 2002; SASAKI et al. 2002; SPIELMEYER et al., 2002). Tanto em arroz como em trigo, o fenótipo semi-anão está relacionado ao metabolismo do hormônio vegetal giberelina. No entanto, o mecanismo é completamente diferente nas duas espécies do ponto de vista genético e fisiológico. Em trigo, o fenótipo



(dominante) é definido por substituições de bases na região DELLA do gene *Rht*, que codifica repressores constitutivos de crescimento, que interagem com hormônio vegetal. Em arroz, o fenótipo (recessivo) é definido por deleção de bases no gene *GA20ox*, levando à produção de uma enzima inativa que participa da via metabólica de giberelina. Neste caso, a própria produção do hormônio é comprometida. Portanto, a Revolução Verde, conduzida pelo melhoramento clássico, foi desencadeada sem que o conhecimento genômico e fisiológico estivesse disponível. O mesmo hormônio vegetal está envolvido, nos dois casos, com mecanismos moleculares e celulares distintos. Mas isso não foi relevante para o sucesso do melhoramento. Os exemplos de arroz e de trigo são também interessantes porque chamam a atenção para o fato de que características monogênicas, afetando a arquitetura (porte semi-anão) da planta, em combinação com mudanças no modo de produção, têm grande impacto no incremento de produtividade, uma característica quantitativa complexa.

Conforme mencionado, as variedades de plantas de diferentes espécies cultivadas foram desenvolvidas, em sua grande maioria, com base na seleção fenotípica de características de interesse econômico. O fenótipo, pois, tem sido utilizado para selecionar plantas com genótipo superior. Essa tarefa torna-se complexa e menos eficiente quando a característica de interesse é controlada por vários genes (característica quantitativa), geralmente com pequeno efeito e significativa influência ambiental. Não obstante, os programas de melhoramento genético têm tido sucesso no desenvolvimento de cultivares superiores para características qualitativas e quantitativas (Fig. 3). O arcabouço teórico dessa estratégia é o modelo infinitesimal de Fisher, em que uma característica quantitativa é controlada por um grande número de genes, cada um com um pequeno efeito na variação fenotípica e forte influência ambiental. Esse sucesso pode ser atribuído, entre outros fatores, à combinação de métodos clássicos de melhoramento genético, avaliação em escala do fenótipo em diferentes anos e ambientes, e a sistemas sofisticados de experimentação, fitotecnia, estatística e estratégias de seleção. A estratégia utilizada fundamenta-se na estimativa, baseada totalmente no fenótipo observado, de parâmetros genéticos como herdabilidade, variância genética e correlação genética para os caracteres quantitativos de interesse. Portanto, a seleção e o desenvolvimento de genótipos superiores têm sido feitos com



muita eficiência, sem que se saiba quantos genes controlam uma característica, qual o efeito individual desses genes, onde estão localizados e qual a base fisiológica da expressão dos mesmos. Deve-se argumentar, contudo, que o conhecimento do genoma e os métodos moleculares podem ser empregados para aumentar esta eficiência.

Os programas de melhoramento concentram-se nos efeitos genéticos aditivos e, para várias culturas, inclusive aquelas que se reproduzem por autofecundação, os efeitos não-aditivos de heterose (híbridos) também são perseguidos no melhoramento de características quantitativas. Novamente, a base molecular e fisiológica dessas características em diferentes espécies não é conhecida. Recentemente, no entanto, avanços no conhecimento da base genética do vigor híbrido vêm sendo obtidos (veja a seguir). Isso por certo terá grande impacto em uma área que se baseia hoje em cruzamentos e extensa análise de híbridos por tentativa e erro, embora grupos heteróticos, isto é, grupos de variedades que quando cruzadas entre si resultam em produtos com maior vigor híbrido, tenham há muito sido identificados em algumas espécies.

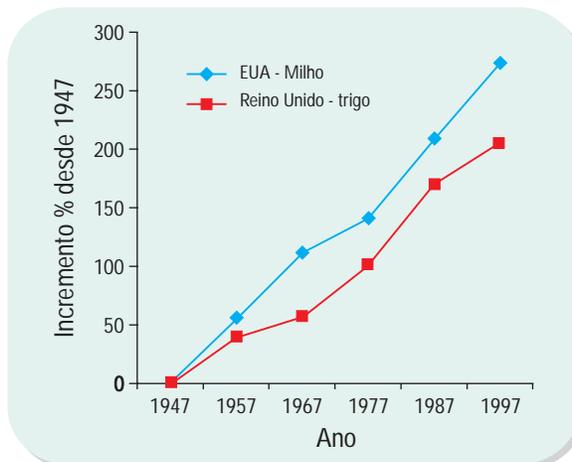


Fig. 3. Incremento percentual de produtividade em milho nos Estados Unidos e em trigo no Reino Unido após a Segunda Grande Guerra. Parte do sucesso no desenvolvimento de variedades mais produtivas de plantas se deve ao melhoramento clássico.

Fonte: James (2008).



Engenharia genética - O melhoramento genético pode buscar genes de interesse também em espécies distantes, introduzindo novas características pela engenharia genética. Assim, uma região codante de molécula de grande interesse encontrada em uma espécie filogeneticamente distante, como uma bactéria ou peixe, pode ser introduzida por técnicas de biologia molecular no genoma de uma planta. Essa agregação de valor a uma variedade elite através da engenharia genética tem um grande impacto. Esse salto é tão significativo que tem sido usado como justificativa para o enorme esforço feito nos últimos 25 anos no desenvolvimento de variedades transgênicas de plantas, movimentando a forte indústria de sementes melhoradas em todo o mundo. As técnicas de transgenia, portanto, surgiram como uma alternativa complementar aos procedimentos tradicionais de melhoramento.

A engenharia genética tem sido bem sucedida no desenvolvimento de variedades com características controladas por um único gene. O transgene oferece uma novidade à espécie, adicionando à variedade transgênica vantagem competitiva em relação às concorrentes. No agronegócio, o impacto da engenharia genética se faz notar em algumas espécies de grande interesse econômico, como a soja (especialmente em transgênicos para resistência a herbicida), ou o milho e algodão (resistência a insetos). O crescimento da área plantada com essas variedades transgênicas em todo o mundo é muito significativo (Fig. 4), justificando esse sucesso.

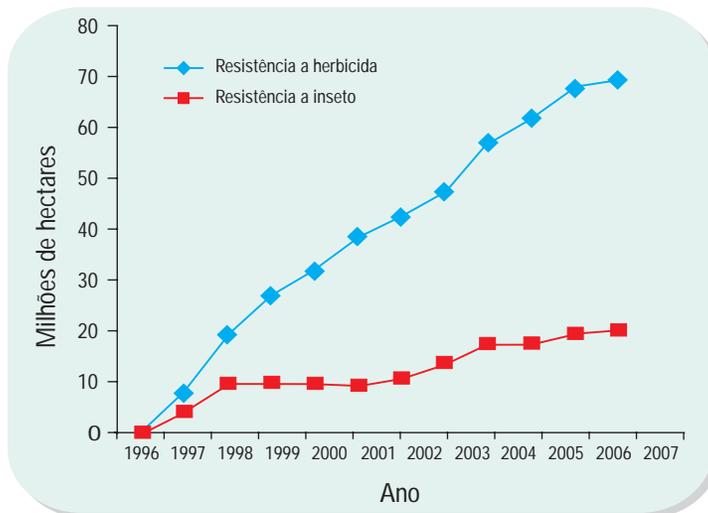


Fig. 4. Crescimento da área plantada com variedades resistentes a herbicida e resistência a insetos no mundo.

Fonte: James (2008).



No entanto, mesmo a inclusão de uma característica de herança simples no desenvolvimento de uma nova variedade por transgenia tem exigido um tempo de desenvolvimento varietal similar ao melhoramento convencional (aproximadamente 10 anos), tempo este transcorrido entre a identificação do gene de interesse em um determinado organismo até o lançamento de uma nova variedade contendo o transgene (GEPTS, 2002). Além do aspecto tecnológico (identificação do gene de interesse em espécie de taxa distante, clonagem do gene, construção de vetores, transformação e seleção de transgênicos com expressão adequada da característica de interesse), questões também de ordem política e regulatória podem estender ainda mais os prazos de desenvolvimento varietal. Em alguns países, como no Brasil e certas nações européias, esses fatores podem ser ainda mais relevantes. Essa situação, à qual se adiciona ainda questões de propriedade intelectual de vetores, promotores, e de outros componentes do sistema de transgenia, tem contribuído, naturalmente, para um forte aumento de custo de desenvolvimento de uma variedade transgênica. O tempo de desenvolvimento varietal só é reduzido quando o transgene, já incorporado e fixado em uma variedade, é incorporado em linhagens elite de maneira acelerada através de estratégias de conversão de linhagem baseadas em mapeamento genético (FERREIRA, 2003). Ainda assim, deve ser notado que as linhagens elite levaram um bom tempo para serem desenvolvidas pelo melhoramento clássico. Portanto, no momento, a engenharia genética não necessariamente oferece maior rapidez no desenvolvimento varietal. O seu grande atributo continua sendo a novidade e o incremento de valor agregado pela novidade da seqüência transgênica inserida em uma variedade.

Do ponto de vista comercial, a indústria transgênica vegetal, portanto, tem sido marcada até agora pelo emprego de apenas dois tipos de genes: resistência a herbicida e resistência a inseto. Vários outros potenciais produtos têm sido testados, como aumento de vitamina A em grãos de arroz ("golden rice", YE et al., 2000), ou vitamina E (SHINTANI; DELLAPENNA, 1998), qualidade de fruto, resistência a fungos, resistência à bactéria, composição de amido nos grãos (JOBBLING et al., 2002). O potencial acadêmico desses avanços tem sido demonstrado. Mas poucos sucessos tecnológicos foram observados até o momento. Esses sucessos têm tido, como no caso de resistência a herbicidas e a insetos, forte impacto comercial.

Parece claro, portanto, que o melhoramento clássico não será facilmente substituído pela engenharia genética. Deve ser frisado que o papel atual da engenharia genética



não se sobrepõe ao do melhoramento clássico. Neste estágio de desenvolvimento, a engenharia genética tem focado a atenção em agregar valor a variedades existentes, de bom desempenho comercial, através da introgressão de transgenes com forte impacto comercial. Ainda não há nenhum exemplo, mesmo acadêmico, do emprego de engenharia genética no melhoramento genético de uma característica quantitativa. E grande parte das características avaliadas em um programa de melhoramento genético clássico é quantitativa. O melhoramento tem preocupação com várias características ao mesmo tempo. A engenharia genética trabalha uma característica (monogênica) de cada vez. Além do impacto na agregação de valor, a engenharia genética atua na geração de variabilidade (e novidade) genética com potencial utilização pelos programas de melhoramento. Este também é um papel relevante da engenharia genética, e complementar às atividades do melhoramento clássico. Portanto, não há concorrência, há complementaridade entre engenharia genética e melhoramento clássico.

Alterações metabólicas por engenharia genética baseadas em alteração da eficiência de enzimas de uma via metabólica, com potencial impacto em características quantitativas, alterando, por exemplo, a concentração de determinado produto de metabolismo secundário, ou mesmo produtividade, estão em sua infância (MORANDINI; SALAMINI, 2003). Mesmo para características qualitativas definidas por longas e complexas vias metabólicas, somente o melhoramento clássico tem sido capaz de aumentar o nível de todas as enzimas com eficiência (MORANDINI; SALAMINI, 2003).

É notório que o banco de genes de interesse econômico está restrito a poucos exemplos e ainda não inclui, na prática, genes ou reguladores de expressão para melhoramento de características quantitativas. Isso, naturalmente, restringe as opções de uso nos programas de melhoramento genético, preocupados com uma série de características para o desenvolvimento de novas variedades para o mercado. E não parece haver uma expectativa razoável por parte da comunidade científica, pelo menos em médio prazo, sobre a capacidade de manipulação de características de controle genético quantitativo (as mais importantes e abundantes em plantas) por meio de engenharia genética. Isso significa que boa parte das características quantitativas de grande interesse econômico (por exemplo: produtividade, tolerância à seca, tolerância ao frio, resistência múltipla a patógenos, biomassa) provavelmente utilizará, de maneira restrita, nos próximos anos, o arsenal de tecnologias de engenharia genética disponível no momento.



Genética molecular e características quantitativas – É importante refletir também se a seleção baseada em marcadores moleculares associados a QTLs poderá eventualmente substituir a análise fenotípica utilizada nos programas de melhoramento. É fato que essa hipótese só será efetivamente testada quando as regiões que controlam um fenótipo complexo como produtividade forem extensivamente mapeadas no genoma da espécie considerada. É fato ainda que o uso em rotina de marcadores moleculares nos programas de melhoramento só será efetivado se a metodologia empregada for mais eficiente e financeiramente mais acessível do que o melhoramento baseado no fenótipo. Grandes dúvidas ainda perduram, no entanto, resta ainda saber, por exemplo, se o modelo teórico de estrutura de QTLs no genoma se assemelha ao modelo infinitesimal de Fisher, mencionado anteriormente. Os dados acumulados até o momento indicam a existência de QTLs de grande efeito, com forte impacto no controle da variação fenotípica, em conflito com este modelo. Há dados que indicam que a eficiência de seleção assistida por marcadores será inferior à seleção fenotípica se o modelo estiver correto, mesmo sob a hipótese de mapeamento de todas as regiões que afetam uma característica quantitativa (BERNARDO, 2001). Vale lembrar que o modelo infinitesimal tem sido usado com grande eficiência pelo melhoramento clássico.

A seleção baseada em marcadores moleculares é conhecida como seleção assistida por marcadores (*MAS- marker assisted selection*). As estratégias utilizadas em seleção assistida são, em geral, baseadas em um valor atribuído ao genótipo observado em um loco de marcador molecular. Esse valor pode ser usado em combinação com o fenótipo para a obtenção de um índice para auxiliar na seleção dos indivíduos com maior potencial no programa de melhoramento.

O uso de seleção assistida para melhoramento de características quantitativas depende, fundamentalmente, da vantagem econômica em utilizar a tecnologia em relação a um programa convencional de seleção. Essa vantagem pode ser exemplificada, inicialmente, por características que os melhoristas têm dificuldade de manipular. Por exemplo, se a fenotipagem da característica de interesse é difícil (por exemplo: resistência a nematóide-do-cisto em soja), a seleção assistida por marcador fortemente ligado a gene de interesse tem grande atrativo para ser adotada em rotina pelos programas de melhoramento genético, por facilitar o processo de fenotipagem (YOUNG, 1999). Contudo, o emprego de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento, especialmente para características quantitativas, tem sido, regra geral,



incipiente. Não há dúvida que houve, nos últimos anos, um grande desenvolvimento da teoria de seleção assistida, através da análise de diferentes variáveis em simulações estatísticas, indicando o potencial uso de seleção assistida (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; DREHER et al., 2003; RIBAUT; HOISINGTON, 1998). Mas a utilização direta de informação de genótipos para seleção de indivíduos superiores para características complexas carece ainda de informação empírica, com os experimentos limitando-se a alguns poucos exemplos.

A seleção indireta poderia ser facilitada se fosse possível identificar todos os genes que controlam a característica, conhecer a localização de cada gene e mensurar o efeito individual no fenótipo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Dessa forma, no modelo de QTL atual, a seleção para uma característica quantitativa poderia ser realizada através da análise do genótipo em cada loco, identificando os alelos de interesse de acordo com o efeito de cada um na característica de interesse. A estratégia tem grande potencial e vem sendo testada nos últimos anos, mas tem limitações.

As maiores limitações para o seu sucesso estão relacionadas com o próprio desenvolvimento tecnológico da mesma. Em primeiro lugar, ao desenvolver um estudo de mapeamento de QTLs, apenas uma fração dos genes envolvidos no controle de uma característica quantitativa é detectada. Os QTLs mapeados em geral são de grande efeito, relativamente àqueles que também contribuem para o fenótipo, em contraposição ao modelo infinitesimal. Embora seja importante detectar e utilizar os QTLs de maior efeito para fins de seleção, é inevitável a constatação de que o limite máximo de incremento de uma característica quantitativa não poderá ser atingido sem o mapeamento de todos os locos envolvidos.

Outra limitação refere-se à própria condução do experimento de mapeamento de QTLs. As linhagens utilizadas no cruzamento para desenvolvimento da população de mapa em geral são contrastantes para a característica de interesse, com vistas a maximizar o potencial de detectar regiões do genoma polimórficas para QTLs que controlam a característica. No entanto, o polimorfismo de DNA nestas regiões nem sempre é observado entre as linhagens parentais e do grau de isolamento genético entre elas. Assim sendo, uma fração dos QTLs envolvidos no controle pode não ser detectada por ausência de polimorfismo entre as linhagens parentais.



Outro obstáculo, também relacionado ao experimento de mapeamento de QTLs, refere-se ao fato de que a detecção depende da acurácia da fenotipagem da característica de interesse. Ou seja, para a detecção de QTLs com potencial uso no programa de seleção, o ponto de partida é o mesmo processo de fenotipagem em que se baseia o programa tradicional de melhoramento genético. Assim, a associação estatística entre a variação fenotípica observada em uma população segregante e a segregação de alelos nos locos de marcadores moleculares, base do modelo de detecção de QTLs, tem como pano de fundo o próprio processo de fenotipagem, que, para características quantitativas, não guarda uma correlação alta com o genótipo da característica de interesse. Se a herdabilidade da característica quantitativa é muito baixa, a seleção assistida por marcadores não será eficiente. Mas parece ser mais interessante em situações em que a herdabilidade é intermediária e há grande dificuldade ou custo na fenotipagem (MOREAU et al., 1998).

Deve-se considerar ainda que o processo de seleção através de loco de marcador molecular é indireto, ao invés da seleção baseada na característica de interesse. A eficiência de seleção indireta depende da distância de recombinação entre o marcador e o QTL, evidenciada pelo desequilíbrio de ligação entre o gene que codifica a característica de interesse e o loco de marcador molecular. Ao longo das gerações e por efeito da recombinação, o desequilíbrio de ligação é diminuído e a eficiência de seleção indireta diminui. Esses problemas são, no momento, contornados pelo uso combinado de seleção baseada nos marcadores moleculares nos QTLs e avaliação fenotípica.

Outro aspecto limitante é a transferência das informações relativas a QTLs entre diferentes populações. Dependendo do grau de distanciamento das populações, o uso dos marcadores em desequilíbrio de ligação com o QTL depende da existência de polimorfismo no loco considerado, da conservação do alelo de interesse no QTL e da conservação do desequilíbrio entre o loco de marcador molecular e o QTL.

Genética molecular e características qualitativas - Apesar da enorme contribuição da biologia molecular, da genética molecular e da genômica para o avanço do conhecimento, o emprego rotineiro do melhoramento molecular nos programas de melhoramento ainda é limitado. Além do impacto da transgenia, notadamente na agregação de valor às variedades com resistência a herbicida e a inseto, alguns métodos de melhoramento genético têm sido alterados de forma positiva por técnicas



biotecnológicas. Deve ser ressaltado que o sucesso dessas estratégias está relacionado à utilização de tecnologia nas fases iniciais do programa de melhoramento (seleção precoce, anterior ao cruzamento sexual) e, se possível, em combinação com manipulações reprodutivas (DEKKERS; HOSPITAL, 2002). Dessa forma, o impacto da tecnologia tende a ser maior, inclusive com potencial desenvolvimento de novas linhagens em prazos menores, o que representa grande vantagem competitiva para os programas. Isso significa que adaptações/mudanças nos métodos de melhoramento devem ser realizadas para a incorporação dos avanços biotecnológicos.

Entre os métodos de melhoramento genético que têm se beneficiado enormemente dos avanços da genética molecular e da genômica, destaca-se o retrocruzamento. O valor de um programa de conversão linhagem por retrocruzamento está relacionado ao benefício que o gene ou genes alvo trazem à linhagem recorrente. A limitação de um programa de retrocruzamento é que, ao voltar ao *background* genético da linhagem recorrente, o programa de melhoramento desvia do objetivo maior de melhorar a linhagem para várias características ao mesmo tempo. Ao invés disso, capitaliza o esforço na manutenção de características da linhagem recorrente, ao mesmo tempo em que promove a introgressão de uma característica com forte impacto comercial. Quando esse é o objetivo, o emprego de marcadores moleculares no melhoramento tem se mostrado muito eficiente em introgressões de forte impacto comercial, seja de um transgene ou de uma característica, tipicamente qualitativa, ou de grande efeito no fenótipo. Em geral, a transferência do gene de interesse com recuperação de mais de 95 % do *background* genético da linhagem parental recorrente pode ser obtida após duas gerações de retrocruzamento. Nesse caso, além da seleção fenotípica para a característica de interesse, os indivíduos RC1 e RC2 são submetidos a seleção para alelos da linhagem recorrente em dezenas de locos de marcadores moleculares distribuídos por todo o genoma. Promove-se, dessa forma, a rápida obtenção de linhagens quase isogênicas à linhagem parental recorrente, com a adição da região em volta do loco do gene de interesse.

Em arroz, por exemplo, uma espécie modelo que possui grande quantidade de recursos biológicos, incluindo a seqüência completa do genoma das subespécies *indica* e *japonica*, cerca de 1.500 genes associados a fenótipos foram identificados (GRAMENE, 2008). Vários programas de introgressão assistida por marcadores moleculares foram



desenvolvidos na espécie, baseados na seleção indireta para genes de interesse através da análise de locos de marcadores moleculares em desequilíbrio de ligação. Entre os exemplos, pode ser citado o emprego de marcadores moleculares para piramidização de genes de resistência à bactéria *Xanthomonas* (SINGH et al., 2001) ou para qualidade de grãos (LIU et al., 2006). Os sucessos práticos, passíveis de adoção pelos programas de melhoramento genético, referem-se à introgressão assistida por marcadores de genes de grande efeito sobre a variação fenotípica. Vários programas de introgressão que utilizam marcadores moleculares vêm sendo descritos em diferentes espécies. Além da seleção indireta, à medida que novos genes são clonados por clonagem posicional (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 2006) ou por genética de associação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2006), a seleção genotípica para características de interesse vai se tornando realidade. Nesse caso, a seleção é feita diretamente para alelos de gene de interesse, e não pela seleção indireta de marcadores ligados ao gene considerado. Recentemente, por exemplo, seleção para diferentes alelos via PCR e marcadores InDel foi empregada para desenvolver variedades de arroz com vários genes de resistência ao fungo que causa a brusone em nove locos distintos, situados em diferentes regiões do genoma (HAYASHI et al., 2006). Dessa forma, o melhorista pode combinar diferentes alelos para resistência ao fungo ao adaptar o uso de genética molecular ao método escolhido para melhoramento de linhagens resistentes ao patógeno. Nesse caso, não há necessidade *a priori* de inoculação das plantas com diferentes isolados do patógeno e fenotipagem para resistência à doença. Esses marcadores podem ser usados também no controle de qualidade de semente comercial das cultivares resistentes.

Outra aplicação prática tem sido o retrocruzamento avançado de QTLs-AB-QTL (TANKSLEY; NELSON, 1996) para incorporar alelos em QTLs interesse econômico de espécies silvestres para linhagens elite do programa. A metodologia tem tido sucesso e impacto em diferentes espécies de plantas, ampliando a base genética de diferentes culturas agrícolas. AB-QTL baseia-se na informação de mapa e na magnitude do efeito de alelos provenientes da linhagem doadora (por exemplo: espécie silvestre) para selecionar linhagens superiores à linhagem recorrente que contém os alelos de interesse. Os produtos obtidos de um programa AB-QTL são linhagens quase-isogênicas à linhagem recorrente, com a vantagem de se ter identificado e mapeado a região do genoma introgrida do acesso doador (FERREIRA; RANGEL, 2005).



Genética molecular, genoma estrutural e vigor híbrido - Os avanços na pesquisa básica se expandem por várias áreas e permitem, cada vez mais, um conhecimento mais aprofundado da biologia dos organismos vivos. Entre as várias áreas do conhecimento, uma é particularmente relevante para o melhoramento genético: a base molecular do vigor híbrido ou heterose.

Desde os seus primórdios, a genética moderna e os programas de melhoramento de plantas tentam explicar porque, em certos cruzamentos, o híbrido F1 é superior à performance das linhagens parentais homocigotas, ou da mais vigorosa das linhagens parentais. Taxa de crescimento, fertilidade, biomassa e produtividade estão entre as características onde frequentemente a heterose, ou vigor híbrido, é avaliada em plantas. Em nenhuma outra espécie cultivada, a heterose teve, e continua a ter, tanto impacto quanto em milho, responsável ainda por um contínuo incremento de produtividade no último século. Mas a heterose é observada também em espécies autógamas, como o arroz. O impacto do emprego de vigor híbrido em arroz é responsável pelo grande incremento em produtividade da cultura na China, e agora em outros países. Esse resultado, novamente, é devido à combinação dos métodos de melhoramento clássico baseados em extensa análise fenotípica. Há grande expectativa sobre o desvendamento dos princípios moleculares e fisiológicos que estão por trás do fenômeno de heterose. A biologia molecular e a genômica vêm contribuindo recentemente para iluminar a questão e, potencialmente, oferecer novas estratégias para capitalizar no incremento em vigor híbrido pelos programas de melhoramento genético.

As hipóteses para explicar a heterose propõem que o vigor híbrido é resultante de efeitos não aditivos no fenótipo. Uma das hipóteses propõe o efeito de dominância, onde conjuntos independentes de alelos com pequeno efeito deletério, acumulados no genoma pela autofecundação de linhagens parentais, atuam de forma complementar quando presentes no híbrido (F1) das linhagens parentais. As linhagens parentais, pelo contínuo aumento de homocigose a cada geração de autofecundação, apresentam um efeito de depressão por endogamia, fenômeno geralmente associado ao vigor híbrido. Outra hipótese propõe um efeito de sobredominância, onde interações alélicas em um loco heterocigoto atuam de forma sinérgica entre os alelos para aumentar o vigor da planta. Evidência para uma ou outra hipótese sempre existiu na literatura, seja através da análise de fenótipos no último século ou, mais recentemente, através de estudos de genética molecular baseados em marcadores moleculares.



Dois áreas da genômica vêm recentemente sendo utilizadas para a compreensão de heterose: a análise do genoma estrutural, de um lado, através do re-seqüenciamento de regiões genômicas que contêm QTLs associados ao controle de heterose; e a análise de expressão gênica global, em geral, através de microarranjos de DNA. A contribuição da análise do genoma estrutural de algumas regiões gênicas de milho revela que, pelo menos nesta espécie, heterose e depressão por endogamia podem ser explicadas pelas inúmeras deleções/inserções de genes e de retrotransposons identificadas em regiões que, teoricamente, deveriam ser colineares no genoma da espécie (FU; DOONER, 2002). Uma região do genoma é colinear a outra quando o repertório de genes e a ordem dos mesmos no segmento considerado são conservados. No entanto, observa-se que as linhagens de grupos heteróticos distintos de milho, apesar de pertencerem à mesma espécie, não mantêm a microcolinearidade esperada em QTLs de heterose. Ou seja, a ordem e os genes esperados no intervalo genômico considerado diferem entre as linhagens. Mas os híbridos F1 apresentam complementação dos genes que faltam naquela região em uma ou em outra linhagem, levando a um incremento de vigor híbrido, ou seja, a performance do híbrido é superior à das linhagens parentais porque o híbrido detém todos os genes em que as linhagens parentais diferem na região do genoma considerada (Fig. 5). Re-seqüenciamento de várias regiões gênicas em milho demonstram que ou uma ou outra linhagem parental apresenta vários locos gênicos faltantes, que são complementados quando o híbrido F1 é obtido (FU; DOONER, 2002; SONG; MESSING, 2003; BRUNNER et al., 2005).

O modelo de complementação de regiões não colineares é compatível com a hipótese de dominância, e explica tanto o vigor observado quanto a depressão por endogamia. O modelo pode explicar também porque distância genética, por si só, não é um bom indicador de vigor híbrido. Em outras palavras, se várias linhagens de uma espécie forem analisadas com base em polimorfismo de marcadores moleculares e os dados usados para estimar distância genética, os híbridos entre as linhagens geneticamente mais distantes não necessariamente são os que apresentam maior heterose. No entanto, isso pode ser verdadeiro quando as linhagens são derivadas de ancestrais comuns que sofreram inserções/deleções ao longo do tempo, caracterizando diferentes grupos complementares que, em sua essência, seriam a base dos grupos heteróticos. Céticos da explicação da genômica estrutural para vigor híbrido sugerem que a avaliação é adequada para milho, mas outros mecanismos devem estar atuando na expressão de heterose, visto que diferenças de microcolinearidade não seriam tão expressivas em outras espécies como observadas em milho.

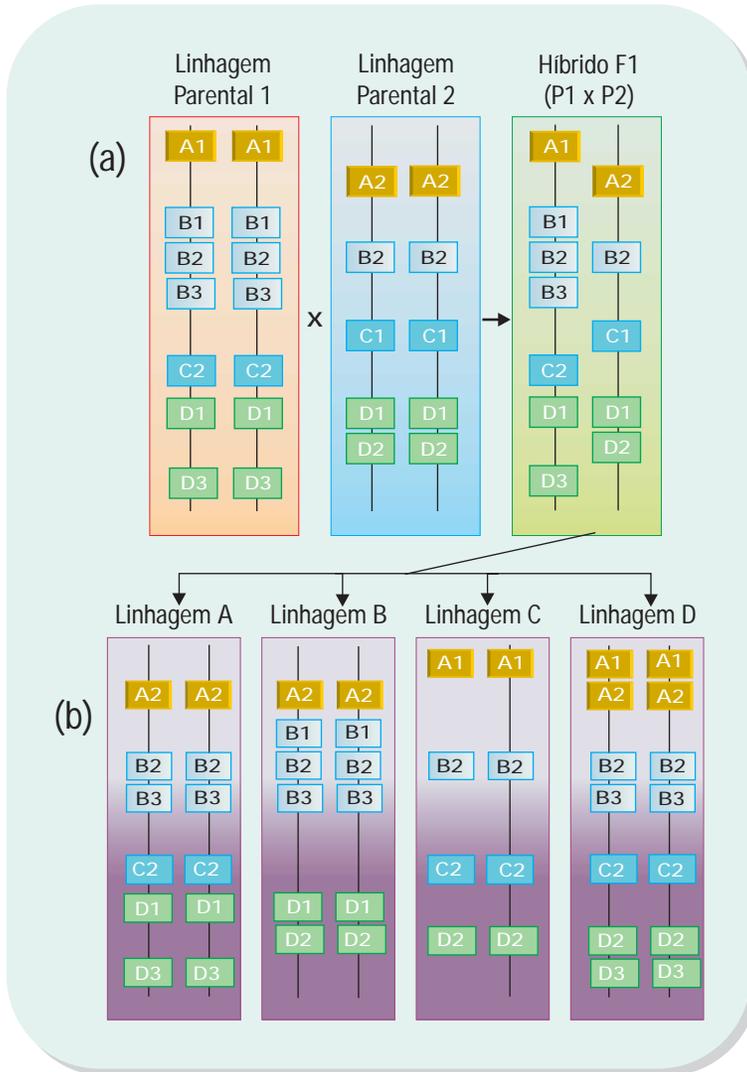


Fig. 5. O re-seqüenciamento de regiões do genoma associadas ao controle de heterose em linhagens de diferentes grupos heteróticos de milho (*Zea mays* L.) indica que a alteração de microcolinearidade nestas regiões do genoma é responsável pela heterose em híbridos F1 e por depressão por endogamia. O vigor híbrido é explicado por complementação de genes de diferentes famílias gênicas (A, B, C e D) nas regiões seqüenciadas (a). A depressão por endogamia é explicada pela ausência de genes na região seqüenciada em linhagens puras derivadas do híbrido F1 depois de repetidas gerações de recombinação e autofecundação (b).



A análise de microcolinearidade intra-específica, como exemplificado para a compreensão molecular de heterose, pode ser alçada a um patamar de análise de genoma completo com o progresso recente de re-seqüenciamento de genomas inteiros. Entre as tecnologias disponíveis, destacam-se aquelas que utilizam como molde a seqüência completa do genoma de espécies que tiveram o genoma estrutural seqüenciado. Para uma característica quantitativa e complexa como vigor híbrido, com forte impacto no melhoramento de plantas autógamas e alógamas, estas estratégias têm grande potencial. Por exemplo, com um único ensaio (“corrida”) de seqüenciamento por síntese baseado em polimerase é possível re-seqüenciar em 4 dias cerca de 1.300 milhões de pb, com fragmentos de aproximadamente 32-40 pb na plataforma Illumina (ILLUMINA, 2008). Na plataforma Roche-454 (454 LIFE SCIENCES, 2008), baseada na técnica de piroseqüenciamento, é possível em apenas 7 horas e, em uma única corrida, obter cerca de 100 Mpb, com comprimento de fragmentos seqüenciados em torno de 250 pb. Outra possibilidade é o emprego da plataforma Solid – Applied Biosystems, que é o seqüenciamento baseado em ligação, capaz de gerar 3.000 Mpb em uma corrida no período de 5 dias, com tamanho de fragmento na ordem de 35 pb (SOLID SYSTEMS, 2008). O alinhamento das seqüências obtidas do genoma de várias linhagens possibilitará o teste de hipótese de vigor híbrido como no exemplo de complementação de regiões com diferenças microcolineares ao longo do genoma como um todo. Outro grande impacto destas novas tecnologias é a obtenção de marcadores em escala, inclusive nos próprios genes de interesse, em contraste com o desafio de se obter marcadores distribuídos no genoma da espécie estudada há apenas 15 anos.

Noutra vertente, os estudos baseados em expressão gênica têm apresentado conclusões conflitantes sobre heterose, por vezes favorecendo uma hipótese ou outra, ou até encontrando evidências de aditividade na variação fenotípica (para revisão veja LIPPMAN; ZAMIR, 2006; HOCHHOLDINGER; HOECKER, 2007). Algumas poucas espécies que já tiveram o genoma totalmente seqüenciado possuem *chips* com milhares de genes para análise de expressão gênica no mercado que possibilitam o desenvolvimento de experimentos de expressão gênica em escala. Entre as opções pode ser citado, por exemplo, o GeneChip Rice Genome Array (AFFYMETRIX, 2008), que apresenta uma extensa cobertura genômica para experimentos de expressão gênica em arroz. O microarranjo contém 52.279 transcritos representando duas cultivares de arroz, sendo 48.564 transcritos “japonica” e 1.269 transcritos “indica”. Estudos de expressão gênica



para compreensão de vigor híbrido têm sido realizados com RNA extraído em diferentes estádios de desenvolvimento, de vários tecidos, empregando técnicas variadas e uma sorte de diferentes métodos de análise estatística. Apesar de apresentarem potencial, os dados atuais indicam que ainda há muito o que refinar do ponto de vista experimental para correlacionar as variações de expressão gênica com vigor híbrido. Parece intuitivo também sugerir que, após um século de redescoberta da heterose através da análise fenotípica, uma maior ênfase seja dada ao refinamento da fenotipagem de vigor híbrido em conjunto com o emprego de técnicas de biologia molecular e genômica.

Conclusões e Perspectivas

As contribuições de áreas de biologia molecular, genética molecular e genômica para o conhecimento básico da constituição biológica dos organismos é inquestionável. O avanço do conhecimento prospera a passos largos. Já o emprego de tecnologias derivadas desse conhecimento em soluções práticas no melhoramento de plantas, notadamente nas rotinas de um programa de desenvolvimento varietal, é ainda limitado.

O melhoramento molecular pode ser entendido hoje em duas vertentes: a engenharia genética e a genética molecular. A engenharia genética tem tido impacto reconhecido na introgressão de genes de herança qualitativa, oriundos de espécies filogeneticamente distantes da espécie agrícola de interesse, mas que conferem um alto valor agregado à variedade transgênica. Porém, o repertório gênico com impacto comercial é ainda limitado a poucos exemplos, como resistência a herbicida e resistência a insetos. A engenharia genética para características quantitativas ainda espera por um exemplo prático, de grande impacto comercial.

A genética molecular, por meio do emprego de marcadores moleculares, tem contribuído em várias áreas da biologia e do agronegócio. No melhoramento genético, a seleção indireta com marcadores moleculares tem sido empregada com sucesso em programas de retrocruzamento e conversão de linhagens, tanto para genes de herança simples (incluindo transgenes) quanto para QTLs de forte efeito na variação fenotípica. Marcadores moleculares utilizados no mapeamento e clonagem posicional vêm apresentando grande avanço no conhecimento, possibilitando a clonagem de QTLs e a compreensão do seu papel no fenótipo de uma característica quantitativa. Contudo, o impacto da seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento de



características quantitativas é ainda incipiente. Esse impacto tem se revelado mais promissor quando em combinação com avaliação fenotípica.

O re-seqüenciamento em escala do genoma em estrutural aponta para o conhecimento da base molecular de fenômenos de grande interesse para o melhoramento genético, como heterose. O seu desvendamento por certo levará ao desenvolvimento de estratégias combinadas de genética molecular e melhoramento para a seleção de genótipos superiores e com maior vigor híbrido.

O melhoramento clássico, sem dúvida, continuará a desenvolver as variedades melhoradas para a agricultura, como sempre o fez, independentemente do conhecimento dos genes e do controle que exercem sobre a fisiologia da característica de interesse. Deve ser destacado, no entanto, que apesar desse sucesso, o melhoramento clássico tem tido limitações para o desenvolvimento de cultivares melhoradas para algumas características complexas, como tolerância à seca. Os programas de melhoramento depositam grande expectativa no uso de ferramentas biotecnológicas para auxiliar na seleção para características quantitativas. A redução dos custos de análise molecular promoverá uma integração cada vez maior do melhoramento clássico com os avanços da biotecnologia nos próximos anos. Em um futuro próximo, portanto, não parece factível a substituição da seleção fenotípica, que caracteriza os programas de melhoramento, pela seleção genotípica, baseada na análise de variação alélica nos locos gênicos, ou locos de marcadores moleculares em desequilíbrio de ligação como os locos que controlam a característica de interesse. Não parece factível, ainda, a substituição do melhoramento clássico pela engenharia genética. Parece adequado supor que, em vez de substituição haverá, na verdade, uma integração cada vez mais intensiva de técnicas de engenharia genética, marcadores moleculares e genômica no melhoramento genético.

Referências

454 LIFE SCIENCES. Disponível em: <<http://www.454.com>>. Acesso em: 20 ago. 2008.

AFFYMETRIX. Genechip Rice Genome Array. Disponível em: <<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/rice.affx>>. Acesso em: 20 ago. 2008.

BERNARDO, R. What if we knew all the genes for a quantitative trait in hybrid crops? **Crop Science**, v. 41, p. 1-4, 2001.



BRUNNER, S.; FENGLER, K.; MORGANTE, M.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. **Plant Cell**, v. 17, p. 343-360, 2005.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 22-32, 2002.

DREHER, K.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J. M.; MORRIS, M. Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at Cimmyt. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 3, p. 221-234, April 2003.

FERREIRA, M. E. Melhoria genética de arroz: impactos da genômica. In: BORÉM, A.; GIUDICE, M.; SEDIYAMA, T. (Ed.). **Melhoramento genômico**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 73-129.

FERREIRA, M. E. ; RANGEL, P. H. N. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de ABQLs (AB-QTL). In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. v. 1, p. 111-140.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In. BORÉM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap. 8. p. 273-306.

FRARY, A.; NESBITT, T. C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K. B.; TANKSLEY, S. D. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, v. 289, n. 5476, p. 85-88.

FU, H.; DOONER, H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, n. 14, p. 9573-9578, July 2002.

GRAMENE. Disponível em: <www.gramene.org>. Acesso em 20 ago. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. Mapeamento físico e clonagem posicional. In. BORÉM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. cap. 7. p. 231-272

GEPTS, P. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. **Crop Science**, v. 42, p. 1780-1790, 2002.

GERSTEIN, M. B.; BRUCE, C.; ROZOWSKY, J. S.; ZHENG, D.; DU, J.; KORBEL, J. O.; EMANUELSSON, O.; ZHANG, Z. D.; WEISSMAN, S.; SNYDER, M. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. **Genome Research**, v. 17, p. 669-681, 2007.



HAN, F.; ROMAGOSA, I.; ULRICH, S. E.; JONES, B. L.; HAYES, P. M.; WESENBERG, D. M. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 6, p. 427-437, December 1997.

HAYASHI, K.; YOSHIDA, H.; ASHIKAWA, I. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 2, p. 251-260, 2006.

HOCHHOLDINGER, F.; HOECKER, N. Towards the molecular basis of heterosis. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 9, p. 427-432, 2007.

JAMES, C. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 20 ago. 2008. citado p. 4,11

JOBLING, S. A.; WESTCOTT, R. J.; TAYAL, A.; JEFFCOAT, R.; SCHWALL, G. P. Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 295-299, 2002.

LIPPMAN, Z. B.; ZAMIR, D. Heterosis: revisiting the magic. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 2, p. 60-66, 2006.

LIU, Q. Q.; LI, Q. F.; CAI, X. L.; WANG, H. M.; TANG, S. Z.; YU, H. X.; WANG, Z. Y.; GU, M. H. Molecular marker-assisted selection for improved cooking and eating quality of two elite parents of hybrid rice. **Crop Science**, v. 46, p. 2354-2360, 2006.

MONNA, L.; KITAZAWA, N.; YOSHINO, R.; SUZUKI, J.; MASUDA, H.; MAEHARA, Y.; TANJI, M.; SATO, M.; NASU, S.; MINOBE, Y. Positional cloning of Rice semidwarfing gene sd-1: Rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellins synthesis. **DNA Research**, v. 9, p. 11-17, 2002.

MORANDINI, P.; SALAMINI, F. Plant biotechnology and breeding: allied for years to come. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 2, p. 70-75, 2003.

MOREAU, L. CHARCOSSET, A.; HOSPITAL, F.; GALLIS, A. Marker associated selection efficiency in populations of finite size. **Genetics**, v.148, p. 1353-1365, 1998.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **The ENCODE Project: ENCYclopedia Of DNA Elements**. Disponível em: <<http://www.genome.gov/10005107>>. Acesso em: 20 ago. 2008.

PEARSON, H. Genetics: What is a gene? *Nature*, v. 441, p. 398-401, 2006.

PENG, J.; RICHARDS, D. E.; HARTLEY, N. M.; MURPHY, G. P.; DEVOS, K. M.; FLINTHAM, J. E.; BEALES, J.; FISH, L. J.; WORLAND, A. J.; PELICA, F. SUDHAKAR, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J. W.; GALE, M. D.; HARBERD, N. P. 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, v. 400, p. 256-261, 1999.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sciences*, v. 3, p. 236-239, 1998.



RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: new tools and strategies. **Trends in Plant Science**, v 3, n. 6, p. 236-239, 1998.

SASAKI, A.; ASHIKARI, M.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH, H.; NISHIMURA, A.; SWAPAN, D.; ISHIYAMA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; KHUSH, G. S.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Green revolution: a mutant gibberelin-synthesis gene in rice – new insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. **Nature**, v. 416, p. 701-702, 2002.

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. **Science**, v. 282, p. 2098-2100, 1998.

SINGH, S.; SIDHU, J. S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D. S.; DHALIWAL, H. S.; KHUSH, G. S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **THEORETICAL AND APPLIED GENETICS**, v 102, n.6-7, p. 1011–1015, 2001.

SONG, R.; MESSING, J. Gene expression of a gene family in maize based on nonlinear haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, n. 15, p. 9055-9060, July 2003.

SPIELMEYER, W.; ELLIS, M. H.; CHANDLER, P. M. Semidwarf (sd-1), green revolution rice, contains a defective gibberellins 20-oxidase gene. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 99, n. 13, p. 9043-9048, June 2002.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 2, p. 191–203, 1996.

VENTER, iniciais do nome; nome de todos autores. Título. 2001. Disponível em: <www.ensemble.org>. Acesso em: 20 ago. 2008.

VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304 - 1351, 2001.

WALLACE, B. The search for the gene. New York: Cornell University Press, 1992.

YE, X.; AI-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) Rice endosperm. **Science**, v. 287, p. 303-305, 2000.

YOUNG, N. D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 505–510, 1999.

ZHOU, P. H.; TAN, Y. F.; HE, Y. Q.; XU, C. G.; ZHANG, Q. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 2, p. 326-331, 2003.