

Germoplasma: base para a nova agricultura

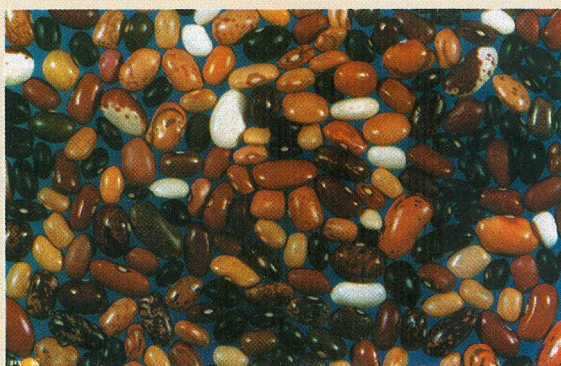
**Rosana Vianello Brondani
e Claudio Brondani**

*Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão,
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

Figura 1.
Amostras
da variabilidade
genética
para os tipos
de grãos
de feijão e arroz
disponíveis
para os
programas de
melhoramento
genético dessas
culturas

O Brasil é um país essencialmente dependente da agricultura como fonte de geração de riquezas. Além de possuir extensa área agricultável, detém tecnologia de produção de grãos comparável à de países desenvolvidos. Parte desse sucesso deve ser creditada aos programas de melhoramento genético desenvolvidos em diversas instituições de pesquisa e universidades do país. Uma das chaves para a continuidade desses programas está na utilização dos recursos genéticos das espécies de interesse agrícola armazenados em bancos de germoplasma. Tais bancos são coleções de amostras (mudas, sementes ou tecidos) de diferentes espécies e variedades de plantas, mantidas para garantir a conservação de sua diversidade genética, evitando o risco de extinção a que estariam sujeitas na natureza.

A manutenção, a caracterização, o enriquecimento e o uso adequado e eficiente desses recursos genéticos, no entanto, dependem em grande parte de um conhecimento preciso e detalhado da variação existente em nível de genoma (variabilidade genética), entre os acessos que compõem os bancos de germoplasma – um acesso é uma amostra de germoplasma representativa de vários indivíduos da população. A variabilidade genética contida nesses bancos, que geralmente incluem espécies silvestres, variedades e linhagens procedentes de diversos locais de cultivo e de programas de melhoramento do Brasil e do exterior, representa um enorme potencial para uso agrícola, podendo contribuir decisivamente para o aumento da produtividade e para a diminuição do ataque de pragas e doenças na lavoura. Embora os pesquisadores do mundo inteiro que trabalham com o melhoramento de plantas busquem maximizar os ganhos genéticos, apenas uma pequena parcela da variabilidade genética do germoplasma tem sido explorada.



FOTOS CEDIDAS PELA EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO

O principal fator que limita a utilização mais ampla dos bancos de germoplasma para o melhoramento genético é a falta de conhecimento sobre as características úteis das espécies ou variedades armazenadas. Hoje, as informações de interesse, disponíveis para o uso dos acessos, baseiam-se em descrições 'fenotípicas', obtidas por avaliações visuais de plantas (por exemplo, porte da planta e cor do grão para o feijão, ou número de perfilhos – caules secundários – e tipo de grão para o arroz) (figura 1); 'etnobotânicas', referentes às formas de uso e manejo da planta em seu local de origem; e

'ecogeográficas', que retratam as características geográficas e ecológicas de origem do germoplasma. Adicionalmente, o uso de técnicas de genética molecular, baseadas na tecnologia de marcadores moleculares, que permitem analisar e detectar as diferenças entre indivíduos em nível de DNA, certamente fornecem medidas mais precisas e diretas da variabilidade genética existente não só entre os acessos armazenados, mas também dentro destes.

A série completa do material genético de cada indivíduo é o seu genoma, dividido em cromossomos. Cada cromossomo é formado por uma longa molécula de DNA, composta, por sua vez, por uma seqüência de bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina e timina). O genoma (o conjunto dos cromossomos) contém toda a informação necessária para construir e manter o organismo. Cada ser vivo apresenta uma composição diferente de seqüência de nucleotídeos ao longo da molécula de DNA em seus cromossomos, com exceção dos gêmeos univitelinos e clones. Embora a maior parte do genoma seja praticamente idêntica entre os indivíduos de uma mesma espécie, algumas regiões genômicas são muito variáveis, e essas diferenças representam o que é chamado de a variabilidade genética. Assim, dois indivíduos da mesma espécie terão o mesmo número de cromossomos, e a diferença genética entre eles consistirá de alterações nas seqüências de bases ao longo do DNA. Cada uma dessas alterações pode ocorrer por substituição, deleção (ausência) ou duplicação de uma base.

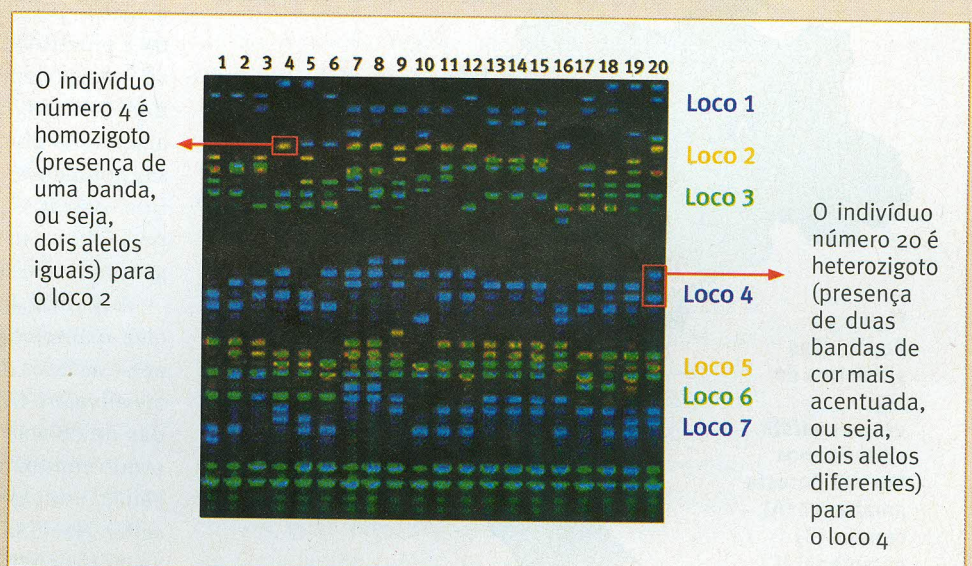
A análise genômica, fundamental para o conhecimento da variabilidade genética, teve grande impulso após o desenvolvimento da técnica reação em cadeia da polimerase' (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) – nessa técnica, enzimas (as polimerases) são utilizadas para sintetizar uma dada seqüência de DNA em um determinado ponto do genoma, definido especificamente pela homologia (semelhança) entre um segmento de DNA iniciador (conhecido como *primer*) e o segmento de DNA do indivi-

duo. A visualização do produto da síntese de várias cópias do mesmo segmento só é possível porque a PCR é realizada em um aparelho conhecido como 'termociclador', que executa repetidos ciclos de separação do segmento de DNA molde, pareamento (entre o *primer* e o segmento molde) e síntese de novo segmento de DNA (por meio da enzima DNA-polimerase). Após 30 a 40 ciclos, é possível visualizar o produto da amplificação da região genômica em um gel de agarose ou acrilamida. Esse produto da amplificação também é chamado de marcador molecular. A PCR levou ao surgimento de outras técnicas, reproduzíveis em qualquer laboratório e de custo relativamente baixo, que permitem obter grande volume de informação sobre os genomas e com isso aumentar a possibilidade de diferenciar cada indivíduo.

O ponto do genoma identificado pelo marcador molecular é conhecido como 'loco', e suas formas alternativas são os 'alelos'. Estes resultam do polimorfismo (diferenças no tamanho do fragmento de DNA amplificado ou na seqüência de nucleotídeos) existente no loco, e são utilizados na diferenciação dos indivíduos. Um marcador molecular não precisa obrigatoriamente ser um gene. Nos organismos denominados diplóides (ou seja, que apresentam duas cópias do conjunto completo de cromossomos), os alelos de ambas as cópias podem apresentar o mesmo tamanho de fragmento ou a mesma seqüência de nucleotídeos (indivíduo homocigoto para aquele loco), ou tamanhos ou seqüências diferentes (indivíduo heterocigoto para aquele loco).

Assim como ocorre nos testes de paternidade em humanos, o emprego dos marcadores moleculares permite definir padrões de DNA específicos para cada acesso armazenado nos bancos de germoplasma (figura 2). Com isso, é possível identificar aqueles

Figura 2. Análise, em seqüenciador automático de DNA (ABI 377), de marcadores moleculares do tipo microssatélite (fragmentos de DNA com seqüências de bases repetidas) – em 20 indivíduos de arroz, foram avaliados os mesmos sete locos, distribuídos ao longo do genoma, revelando uma grande variação genética entre esses indivíduos



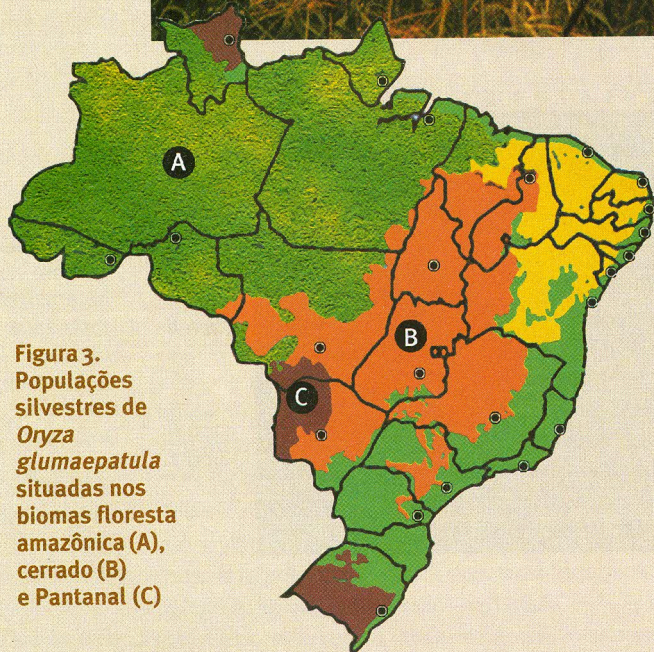


Figura 3. Populações silvestres de *Oryza glumaepatula* situadas nos biomas floresta amazônica (A), cerrado (B) e Pantanal (C)

que, por apresentar maior divergência em seu DNA, poderiam adicionar maior variabilidade genética quando selecionados como genitores em novos cruzamentos. Além disso, os marcadores moleculares podem identificar acessos que estejam armazenados em duplicata ou sejam muito aparentados entre si, cabendo ao administrador do banco de germoplasma a decisão de eliminá-los, para reduzir custos e melhorar a representatividade em relação à totalidade da coleção.

Como os bancos de germoplasma armazenam um número muito grande de acessos (em geral acima de 10 mil), com elevado custo de manutenção, têm sido adotadas formas alternativas para seu manejo adequado. O estabelecimento de coleções nucleares, compostas por um grupo reduzido de acessos (em geral em torno de 10% do número total), mas que representam no mínimo 80% da variabilidade genética da espécie (com baixa redundância entre os genótipos), torna o uso dessas amostras mais acessível e eficiente.

Adicionalmente, o uso de um número reduzido de acessos possibilita analisá-los de modo mais detalhado, avaliando-se as características agrônômicas (produtividade, qualidade protéica de grãos etc.) em experimentos com repetição em campo, e ainda permite uma caracterização genética detalhada, pois se pode utilizar maior número de marcadores moleculares altamente informativos. Uma vez identificados, os acessos geneticamente divergentes e com características agrônômicas favoráveis podem ser imediatamente integrados aos programas de melhoramento genético, maximizando as chances de ampliar a variabilidade genética das novas populações e de obter novas combinações de genes favoráveis.

O melhoramento da maioria das espécies cultivadas exige a introdução contínua de variabilidade genética, para fazer frente à necessidade de aumentar a produtividade sob variadas condições de cultivo – que podem incluir solos com altos níveis de alumínio e ferro, a incidência de diversas doenças e ataques de pragas. Uma variabilidade limitada nessas populações comprometerá o ganho genético obtido. Assim, é preciso que a variabilidade genética presente na natureza e armazenada em bancos de germoplasma seja mais bem entendida e explorada.

A realização de cruzamentos envolvendo espécies aparentadas geneticamente divergentes, como entre acessos de arroz cultivado e acessos da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* (figura 3), oriundas de coletas de germoplasma no Brasil, já vem sendo conduzida com sucesso na Embrapa Arroz e Feijão, através de pesquisas financiadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A chave para utilizar o germoplasma não-adaptado, como *O. glumaepatula*, é obter linhagens com a maior parte do genoma contendo genes do arroz cultivado, e poucos genes oriundos da espécie silvestre. Isso é obtido por retrocruzamentos, nos quais as plantas-filhas do cruzamento inicial são novamente cruzadas com o arroz cultivado. Novamente, as plantas-filhas são cruzadas com o arroz cultivado, repetindo-se esse procedimento mais uma ou duas vezes. A cada geração de retrocruzamento, o percentual do genoma do parental silvestre é reduzido à metade: após três etapas, por exemplo, as plantas-filhas têm em média apenas 6,25% do genoma da espécie silvestre. Para concluir

o processo de obtenção de linhagens, são feitas ao redor de oito autofecundações, ou seja, cada planta-filha é autopolinizada oito vezes, a fim de gerar plantas homocigotas para a maioria dos locos. Isso resulta em grande uniformidade genética em cada planta, fundamental para identificar aquelas com características agronômicas desejáveis (figura 4).

Essa metodologia tem permitido, com o auxílio de marcadores nucleares, identificar e monitorar importantes genes ligados à produção e provenientes de espécies silvestres. As linhagens de arroz obtidas ao final desse processo não são um produto transgênico, pois a transferência de fragmentos de DNA ocorreu entre indivíduos de um mesmo gênero e foi realizada através de métodos de melhoramento tradicional. Os resultados desses estudos têm indicado a presença de genes potencialmente úteis para o melhoramento genético do arroz em acessos armazenados no banco de germoplasma, fornecendo uma pequena amostra do grande potencial de uso da variabilidade genética ainda inexplorada.

A incorporação aos programas de melhoramento genético de marcadores moleculares desenvolvidos a partir do DNA expresso (genoma funcional) abre novas perspectivas para a busca, nos bancos de germoplasma, de genes e alelos relevantes para a agricultura. O uso de marcadores moleculares baseados em seqüências expressas do genoma, também conhecidas por ESTs (de *expressed sequence tag*), é uma poderosa ferramenta para localizar genes potencialmente candidatos ao controle de características de interesse em humanos, animais e plantas. Essa estratégia tem sido favorecida pela



Figura 4. Linhagens de arroz cultivado (*Oryza sativa*) com fragmentos de DNA incorporados da espécie silvestre (*O. glumaepatula*), através de cruzamento entre as espécies

imensa quantidade de informação sobre seqüências expressas depositada constantemente em bancos de dados públicos, em decorrência do esforço mundial e coordenado para a identificação do genoma funcional.

A Embrapa Arroz e Feijão, com auxílio do CNPq, iniciou em março de 2002 um projeto inovador com arroz, visando buscar genes candidatos ligados a características de interesse. Com base em informações de função gênica disponíveis em bancos de dados públicos, são procurados, na coleção nuclear de arroz, acessos com maior potencial para transferência dos alelos diferenciais através do cruzamento com os melhores cultivares comerciais de arroz. A realização desses cruzamentos permite ampliar a base genética e maximizar a variabilidade dos alelos em regiões genômicas que controlem características de interesse para os programas de melhoramento.

Para aumentar continuamente a produção agrícola, devem ser desenvolvidas variedades altamente produtivas, com alta qualidade de grãos, menos dependentes de água, de fertilizantes e de pesticidas. Para isso, é fundamental – no caso da maioria das espécies de valor econômico – identificar e utilizar genes potencialmente úteis presentes em bancos de germoplasma. A utilização racional da variabilidade genética de espécies presentes na natureza e armazenadas nesses bancos é um dos grandes desafios para os programas de melhoramento genético. O arsenal científico e tecnológico hoje disponível faz com que essa tarefa possa ser plenamente cumprida. ■