

# BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DO MILHO

*Edilson Paiva 1/*

Dentre as tecnologias disponíveis e utilizadas para aumentar a produção e a qualidade nutricional dos alimentos, o melhoramento genético de plantas tem sido, sem dúvida, a mais efetiva. Entretanto, os ganhos em produtividade e qualidade nutricional, obtidos através do melhoramento genético clássico, tornam-se cada vez mais difíceis de ser alcançados. Podem mesmo tornar-se, no futuro, altamente dependentes de uma maior integração entre os melhoristas e cientistas de outras disciplinas, notadamente da biotecnologia.

A biotecnologia, ciência baseada nas biológicas celular e molecular, vem possibilitando o desenvolvimento de novas técnicas que prometem revolucionar os mais variados setores da atividade humana. Importantes estudos têm demonstrado que um dos maiores impactos desta nova tecnologia se fará sentir na agropecuária. Os primeiros benefícios da biotecnologia aplicada à agricultura aparecem na forma de técnicas de cultura de tecidos, técnicas imunológicas e de engenharia genética, que já estão sendo utilizadas em muitos países como ferramentas de multiplicação e limpeza clonal, de seleção, de diagnose e caracterização de doenças e de estudos básicos de genética molecular. A tecnologia do DNA recombinante já permite as mais variadas manipulações genéticas e, num futuro próximo, possibilitará controlar a expressão de genes, modificar ou mesmo criar novos genes.

São várias as biotécnicas que já estão sendo ou têm potencial para virem a ser utilizadas como ferramentas de auxílio ao melhoramento genético do milho. A curto

prazo, estas novas técnicas terão papel decisivo no aumento do valor nutritivo das proteínas encontradas nos grãos de milho.

A área plantada com milho no mundo é hoje de cerca de 133 milhões de hectares, cuja produção corresponde a 90 kg de milho para cada habitante do planeta. O aspecto mais relevante é que o milho é a principal fonte alimentar de 200 milhões de pessoas, onde se inclui metade da população mundial considerada cronicamente subnutrida. As variedades de milho tradicionalmente plantadas são limitadas na qualidade nutricional. Metade da proteína do grão de milho é deficiente em dois aminoácidos essenciais: lisina e triptofano. Isto significa que, sem suplementação protéica, o milho não pode sozinho sustentar o desenvolvimento e a saúde normais de animais monogástricos.

Em 1963, foi descoberto um mutante de milho chamado opaco-2, contendo uma proteína de alto valor nutritivo, que podia ser comparada à proteína do leite. No entanto, o opaco-2 e outros mutantes semelhantes apresentavam características agrônomicas desfavoráveis (baixa produtividade, grãos moles, alta suscetibilidade a doenças e insetos) que impediram a sua disseminação. Um grupo de melhoristas do Centro Internacional de Mejoramento de Maiz y Trigo (CIMMYT) continuou trabalhando no melhoramento de mutantes tipo opaco-2 e, em 1980, anunciou o desenvolvimento de variedades que associavam alto valor protéico com características agrônomicas adequadas. Estas variedades foram agrupadas sob a denominação genética de "Quality Protein Maize" ou "QPM" e são virtualmente idênticas ao milho comum, apresentando, no entanto, altos teores de lisina e

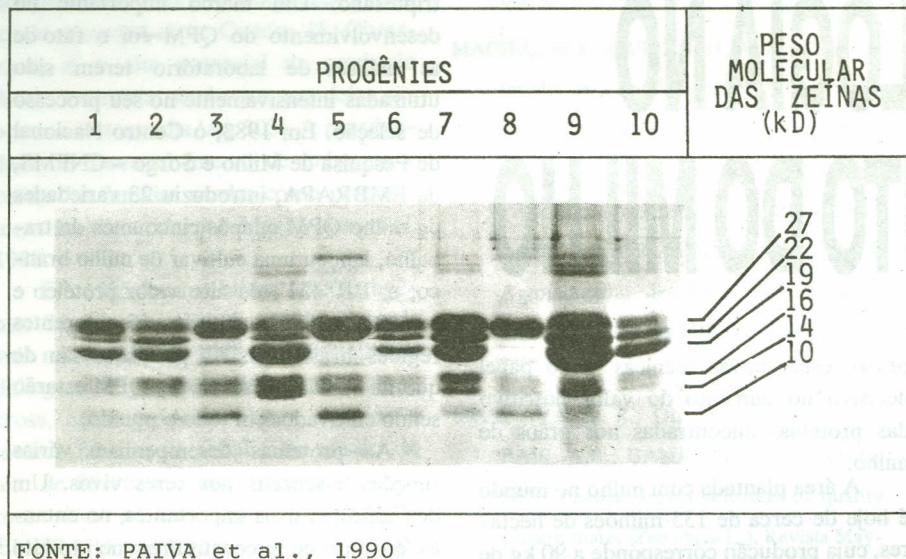
triptofano. Um marco importante no desenvolvimento do QPM foi o fato de as análises de laboratório terem sido utilizadas intensivamente no seu processo de seleção. Em 1983, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS, da EMBRAPA, introduziu 23 variedades de milho QPM e, após cinco anos de trabalho, lançou uma cultivar de milho branco, a 'BR 451', de alto valor protéico e produtividade elevada nas mais diferentes regiões brasileiras. As previsões são de que na virada do século os QPM estarão sendo cultivados em todo o mundo.

As proteínas desempenham várias funções essenciais nos seres vivos. Um dos aspectos mais importantes, no entanto, é o fato de se constituírem no produto direto da informação genética armazenada no DNA. Assim, padrões protéicos obtidos através de técnicas eletroforéticas, que separam diferentes proteínas de acordo com suas características físicas e químicas, formando verdadeiras impressões digitais em matrizes gelatinosas, já estão sendo utilizados rotineiramente como ferramentas de auxílio não só à seleção em programas de melhoramento de milho de alto valor nutritivo (QPM e Milho Doce), como também em programas que visam à obtenção de resistência a insetos. Por sua vez, técnicas de identificação, purificação e determinação da sequência de aminoácidos de algumas proteínas do grão de milho geram informações que possibilitam o isolamento dos genes (seção do DNA) que servem de código para suas sínteses.

As chamadas técnicas do DNA recombinante já permitem que um determinado gene isolado do DNA das células de um indivíduo seja introduzido, multiplicado ou colocado para funcionar em um outro tipo de célula. Enfim, informação genética entre plantas de espécies diferentes ou mesmo entre animais e plantas podem ser trocadas sem que haja necessidade do cruzamento sexual. O estudo e a manipulação dos genes que codificam as zeínas (proteínas encontradas em grande quantidade no endosperma dos grãos de milho) são bons exemplos da utilização das técnicas de DNA recombinante em milho. Alguns dos genes que codificam

1/ Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D. Biología Molecular - EMBRAPA/CNPMS - Caixa Postal 151 - CEP 35700 Sete Lagoas, MG.





Exemplo de utilização de padrões protéicos de zeínas, como ferramentas auxiliares de seleção, em programa de melhoramento de milho doce, CNPMS/EMBRAPA.

proteínas do tipo zeína já foram isolados e seqüenciados. Como as zeínas são proteínas deficientes em aminoácidos essenciais, modificações *in vitro* estão sendo feitas com o objetivo de introduzir nesses genes informações que codifiquem aminoácidos essenciais, como lisina e triptofano.

Outro exemplo é a utilização da técnica denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, ou Polimorfismo de Fragmentos de DNA) na construção de mapas genéticos de vários organismos, em particular de milho. A RFLP baseia-se nas diferenças detectadas entre genótipos, através da comparação do tamanho de fragmentos obtidos pela digestão do DNA por enzimas de restrição. A fragmentação se dá quando as enzimas encontram seqüências de bases que lhes são específicas. Os RFLP são formados no genoma pela inserção, eliminação ou troca de bases, que destroem ou criam sítios específicos de corte para as enzimas de restrição, podendo, assim, ser detectados num determinado genótipo. Os milhares de fragmentos de tamanhos diferentes obtidos são separados por eletroforese em géis de agarose e transferidos para uma matriz, como filtros de nitrocelulose. Nessa matriz sólida, o tamanho dos fragmentos específicos é determinado através de técnicas de hibridação de DNA, onde se utilizam como sonda fragmentos marcados (P-32, biotina etc.) de DNA homólogos aos que se quer detec-

tar. Assim, variações existentes na seqüência de bases no DNA de genótipos diferentes podem ser visualizadas, mapeadas e correlacionadas com características desejáveis.

Os RFLP apresentam uma série de vantagens sobre os métodos clássicos de mapeamento de genes. Como não são produtos de transcrição, são independentes do estágio de desenvolvimento do organismo, apresentam herdabilidade de 100%, pois não são afetados pelos fatores ambientais, e não sofrem efeitos de epistasia e pleiotropia. São herdados de maneira co-dominante, e podem ser utilizados para mapear um número praticamente ilimitado de "loci" (posição ocupada pelo gene no germoplasma). Os mapas genéticos de RFLP estão sendo utilizados em programas de melhoramento de milho para prever combinações heteróticas, identificar genótipos divergentes, caracterizar herança citoplasmática e, o mais importante, separar características quantitativas nos seus componentes individuais, ou seja, tratar caracteres quantitativos segundo os conceitos da genética qualitativa ou mendeliana.

Técnicas imunológicas estão também sendo empregadas na produção de kits para a diagnose de doenças viróticas e caracterização e diagnose de microorganismos envolvidos na fixação biológica de nitrogênio em milho. O princípio básico das técnicas imunológicas é a introdução

de corpos estranhos em organismos vivos, induzindo os últimos a produzir anticorpos. Devido à sua alta especificidade, os anticorpos servem então como sondas biológicas altamente eficazes. Anticorpos estão também sendo utilizados na identificação e quantificação de proteínas de milho, bem como na marcação não radioativa de fragmentos de DNA.

Outra área dentro da cultura do milho onde as técnicas de biologia molecular têm apresentado contribuição significativa é no controle biológico de insetos-pragas do milho. Vírus do grupo Baculovírus já foram isolados e purificados, e os resultados obtidos com a sua aplicação mostram a sua viabilidade como poderosos e específicos bioinseticidas no controle da lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*).

Técnicas de biologia celular, como produção e fusão de protoplastos, cultura de células, calos e órgãos, estão também sendo utilizadas em milho. Algumas delas, como cultura de antera e ovário para produção de haplóides, fusão somática e transformação de protoplastos (células sem a parede celular) para transferência de caracteres codificados nas organelas e produção de plantas transgênicas podem, a curto prazo, apresentar contribuição significativa ao melhoramento do milho. Técnicas de cultura de calos estão sendo utilizadas em estudos de regeneração de plantas, a partir de tecido somático e em estudos de fatores que conferem tolerância a insetos e doenças. Culturas de células estão sendo empregadas em estudo de vias metabólicas e de seleção *in vitro*, onde células tolerantes a herbicidas, toxinas de microorganismos, altos teores de sais, por exemplo, são identificadas. Embora estas técnicas de biologia celular venham sendo utilizadas rotineiramente em plantas dicotiledôneas, elas não tem apresentado os mesmos resultados em monocotiledôneas, como no caso do milho. Por exemplo, já se consegue, sem maiores problemas, transformar geneticamente células de milho *in vitro*. Não é possível ainda, no entanto, obter regeneração de plantas de milho, a partir de células individuais e/ou de protoplastos. As técnicas de biologia molecular em milho estão bem mais avançadas do que as de biologia celular. Assim, o potencial total da biotecnologia só se fará sentir na cultura do milho com o desenvolvimento destas úl-



timas técnicas.

Reconhecendo que os progressos marginais obtidos na produção de alimentos requerem importantes investimentos em programas de pesquisas fundamentais, é urgente e recomendável que se busque utilizar as novas técnicas de biologia celular e molecular como ferramentas de auxílio às metodologias atualmente em uso nos programas de melhoramento de milho.

#### REFERÊNCIAS

- BRIGHT, S.W.J. & JONES, M.G.K. **Cereal tissue and cell culture**. Boston, Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Pub., 1985. 303 p.
- EVOLA, S.V.; BURR, F.R.; BURR, B. The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 71:765-71, 1987.
- HELENTJARIS, T. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in Genetics*, 3:217-21, 1987.
- HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOLUM, M.; SIEDENSTRANG, C.; WEGMAN, S. Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Molec. Biol.*, 5:109-18, 1985.
- HELENTJARIS, T.; WEBER, D.F.; WRIGHT, S. Use of monosomics to map cloned DNA fragments in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6035-9, 1986.
- JONES, M.G.K. Transformation of cereal crops by direct gene transfer. *Nature*, 317:17-23, 1985.
- LANDRY, B.S. & MICHELMORE, R.W. Methods and applications of restriction fragment length polymorphism analysis to plant. In: BRUENING, G.; HARADA, J.; KOSUGE, T.; HOLLAENDER, A. **Tailoring genes for crop improvement**. Plenum Press, 1987. p. 25-44.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z.E. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* CL in cereal root. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2):358-64, 1987.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Quality-protein maize**. Washington, National Academy Press, 1988. 100 p.
- PHILLIPS, R.L. Implications of molecular genetics in plant breeding and opportunities for collaboration. In: THE 1984 PLANT Breeding Research Forum. Des Moines Iowa, Pioneer Hi-Bred International Inc., 1985. p. 115-51.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELLER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M.V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 327(6125):33-7, 1987.
- VALICENTE, F.H.; PEIXOTO, M.J.V.V.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E.W. Identificação e purificação de um vírus-de-granulose em lagartas-do-cartucho-do-milho. *Pesq. agropec. bras.*, 23(9):291-6, 1988.

# SITUAÇÃO DAS DOENÇAS DE MILHO NO BRASIL

Fernando Tavares Fernandes 1/  
Eric Balmer 2/

A cultura de milho ocupa, no Brasil, 13,6 milhões de hectares. Conquanto o milho seja cultivado em todo o país, há uma forte concentração nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, onde observou-se, pelos dados da safra 1985/86, 73% da área plantada e 88% da produção.

O aumento da produção de milho nos próximos anos deverá ocorrer tanto pelo aumento da área cultivada como pelo aumento da produtividade, sendo que o balanceamento entre estes dois fatores será variável de acordo com as características de cada região fisiográfica.

Para o aumento da produtividade, prevê-se a utilização intensiva de tecnologias como uso de irrigação, utilização de plantas mais produtivas, precoces, aumento na fertilidade do solo, etc.

Em uma cultura com estas características, isto é, abrangendo várias regiões que diferem entre si e dentro delas quanto ao clima e utilizando tecnologias que se relacionam diretamente com o aparecimento das doenças, é de se esperar a ocorrência de um elevado número de doenças. Assim, mais de 20 já foram identificadas na cultura de milho no Brasil. Contudo, pela frequência e intensidade com que ocorrem, somente algumas apresentam importância econômica.

Por outro lado, por ser doença o resultado da interação entre dois seres vivos (patógeno e hospedeiro), influenciada pelas condições ambientais, basta que estas sejam favoráveis à interação ou que ocorra variação no patógeno para que

doenças de importância secundária passem a se constituir em problemas fitopatológicos para a cultura do milho. Assim, é necessário àqueles que trabalham com esta cultura, não só conhecerem a distribuição geográfica das doenças como também as possíveis variações que venham a ocorrer nos patógenos.

O presente trabalho, apresentado no Simpósio sobre Moléstias de Milho, realizado de 28 a 29 de julho de 1987, em Campinas, teve como finalidade reunir informações sobre as doenças mais importantes da cultura do milho, nas principais regiões produtoras. Estas informações, obtidas também através de consultas feitas a técnicos ligados a instituições oficiais de pesquisa, como IAPAR, EMPASC e companhias particulares produtoras de sementes, como Sementes Cargill Ltda. e Sementes Agrocere S/A, estão contidas nos Quadros 1, 2 e 3, e nos mostram as seguintes situações para as doenças de milho nas diferentes regiões.

#### REGIÃO CENTRO-OESTE

Esta região compreende os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, sendo responsável por 11% do total da área plantada e 16% do total da produção de milho no Brasil. A época de plantio normalmente é de outubro até a primeira quinzena de novembro. Plantios mais tardios podem ocorrer da segunda quinzena de novembro ao início de dezembro. Em condições de irrigação, os plantios são realizados durante todo o ano.

As podridões-do-colmo e do topo, causadas por bactérias (*Erwinia chrysan-*

1/ Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, M.Sc. - EMBRAPA/CNPMS - Caixa Postal 151 - CEP 35700 Sete Lagoas, MG.

2/ Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D., Prof. ESALQ/Dep<sup>o</sup> Fitopatologia - Caixa Postal 9 - CEP 13400 Piracicaba, SP.

