

DESENVOLVIMENTO E CONTRIBUIÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO

MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO

CARNEIRO, N. P E PAIVA, E

HISTÓRICO DE BIOTECNOLOGIA EM PLANTAS

A biotecnologia vegetal teve início com o aparecimento de propagação de plantas em cultura de tecido. Essa tecnologia é usada na multiplicação de plantas em larga escala (eucalipto, orquídeas, crisântemo, dendê, tamareira, morango, batata, bananeira, etc), no manejo e conservação de germoplasma (alho, batata, mandioca, batata-doce, cará, inhame), na transferência de genes de uma espécie silvestre para uma cultivar-elite (eliminando barreiras de incompatibilidade genética), na obtenção de plantas haplóides, e na eliminação de doenças através do cultivo "in vitro" de meristemas. A segunda fase da biotecnologia, meados dos anos 80, surgiu com o advento dos marcadores moleculares. Essa tecnologia permite a identificação de regiões no genoma de plantas responsáveis por importantes características agrônômicas e sua rápida transferência para outros genótipos. Além disso, marcadores moleculares, podem servir como apoio na identificação de grupos heteróticos e na proteção legal de cultivares. A terceira fase da biotecnologia vegetal veio com o advento das plantas transgênicas. Melhoristas de plantas dependem de variabilidade genética existente na natureza como matéria prima para desenvolvimento de cultivares melhoradas. O advento da tecnologia de DNA recombinante e a possibilidade de se transformar plantas, dá ao melhorista acesso a um novo e variado "pool" de genes, possibilitando a transferência de caracteres além dos limites permitidos pelo melhoramento tradicional. Desta forma, o desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivas e adaptadas às mais diversas condições de cultivo, que tem sido tradicionalmente obtidas através do melhoramento genético tradicional, pode ser dramaticamente acelerado com a utilização de técnicas de mapeamento, manipulação gênica e transformação.

PLANTAS TRANSGÊNICAS NO MUNDO

As primeiras plantas transgênicas obtidas por engenharia genética começaram a ser liberadas no campo em meados de 1990. Atualmente, já foram autorizados mais de 25 mil testes de campo no mundo, metade deles nos Estados Unidos, no Canadá e na Europa, Ásia e África estão mais atrasados. Na América Latina, o maior número de liberações ocorreu na Argentina (3/4 dos testes realizados na América Latina) e México. O Brasil promoveu 800 liberações para teste de plantas transgênicas a partir de 1996, tendo aprovado sua legislação de biossegurança de 1995. A comercialização de plantas transgênicas começou no final da década de 1990. Atualmente, soja, milho e canola geneticamente modificados já têm participação relevante na agricultura dos Estados Unidos, Canadá e Argentina. A soja transgênica tolerante ao glifosato ocupa 54% e 75% da área cultivada com soja nos Estados Unidos e na Argentina, respectivamente. A área cultivada com plantas transgênicas deve atingir 40 milhões de hectares no início do próximo século. As plantas citadas

têm como características a resistência a insetos, vírus, herbicidas e uma melhor qualidade nutricional, como no caso da canola (Destaques de palestra de Alberto Duque Portugal, Diretor-presidente da Empresa Brasileira da Pesquisa Agropecuária/ EMBRAPA, realizada em agosto de 1999- *Correio Braziliense* - 04/11/1999, pag. 15)

<http://www.mct.gov.br/ctnbiotec/midia/midia05.htm>

PROCESSO DE LIBERAÇÃO PLANEJADA DE OGMS CULTURA DO MILHO NO BRASIL

A seguir apresentamos uma tabela com as principais companhias produtoras de milho, genes de resistência e tolerância usados na produção de plantas transgênicas, organismos de onde originaram os genes transferidos e os locais de plantio.

Requerente	Resistência / Tolerância	Gene Inserido	Origem do Gene	Locais
Novartis Seeds Ltda.	1) glufosinato de amônio 2) insetos e glufosinato de amônio	1) <i>pat</i> 2) <i>cryIA(b)</i> e <i>pat</i>	1) <i>Streptomyces higroscopicus</i> 2) <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Streptomyces viridochromogene</i>	Uberlândia - MG, Cascavel - PR
Hoechst Schering Agrevo do Brasil Ltda.	glufosinato de amônio	<i>bar</i>	<i>Streptomyces higroscopicus</i>	
Monsanto do Brasil Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>crwt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rolândia - PR, Castro - PR, Uberlândia - MG, Não Me Toque - RS, Santa Cruz das Palmeiras - SP
BRASKA LB Agropecuária Brasileira Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Guaíra - SP, Itapetinga - SP, Casabrancia - SP, Guarapuava - PR, Cascavel - PR, Ponta Grossa - PR, Bom Sucesso do Sul - PR, Campo Mourão - PR, Não Me Toque - RS, Coronel Bicaco - RS, Vacaria - RS, Panambi - RS, Passo Fundo - RS, Campo Erê - SC, Xanxerê - SC, Campos Novos - SC, Unai - MG, Presidente Olegário - MG, Santa Juliana - MG, Chapadão do Céu - GO, Indiará - GO, Santa Helena de Goiás - GO, Acreúna - GO, Rio Verde - GO, Montevídiu - GO, Barreiras - BA
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Guarapuava - PR; Ponta Grossa - PR; Campos Novos - SC; Palmasola - SC
Sementes Monsanto Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Maracá - SP, Paranapanema - SP, Pirassununga - SP, Toledo - PR, Guarapuava - PR, Campo Mourão - PR, Cambé - PR, Ponta Grossa - PR, Vacaria - RS, Palmeiras das Missões - RS, Campo Erê - SC, Canoinhas - SC, Sacramento - MG, Luziânia - GO, Vianópolis - GO, Montevídiu - GO, Ceres - GO, Ipameri - GO, Sorriso - MT, Poxoréu - MT, Luiz Eduardo Magalhães - BA
Sementes Agrocere S.A.	insetos	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Palotina - PR, Ponta Grossa - PR, Campo Mourão - PR, Cascavel - PR, Chapecó - SC, Uberlândia - MG, Conquista - MG
Sementes Agrocere S.A.	insetos	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Pirassununga - SP, Itapetinga - SP, Cascavel - PR, Guarapuava - PR, Campo Mourão - PR, Carambei - PR, Rolândia - PR, Encantado - RS, Passo Fundo - RS, Santa Bárbara do Sul - RS, Vacaria - RS, Campos Novos - SC, Chapecó - SC, Aberlardo Luz - SC, Mafra - SC, Rio Paranaíba - MG, Uberaba - MG, Presidente Olegário - MG, Conquista - MG, Rio Verde - GO, Posse - GO, Bisilva - DF, Chapadão do Sul - MS
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Rio Verde - GO; Costa Rica - MS; Pirassununga - SP; Conquista - MG; Itapetinga - SP; Cristalina - GO; São Francisco do Sul - SC; Aracruz - ES

S.A.				Chapecó - SC, Uberlândia - MG, Conquista - MG
Sementes Agrocere s S.A.	insetos	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Pirassununga - SP, Itapetininga - SP, Cascavel - PR, Guarapuava - PR, Campo Mourão - PR, Carambei - PR, Rolândia - PR, Encantado - RS, Passo Fundo - RS, Santa Bárbara do Sul - RS, Vacaria - RS, Campos Novos - SC, Chapecó - SC, Aberlardo Luz - SC, Mafra - SC, Rio Paranaíba - MG, Uberaba - MG, Presidente Olegário - MG, Conquista - MG, Rio Verde - GO, Posse - GO, Brasília - DF, Chapadão do Sul - MS
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Rio Verde - GO; Costa Rica - MS; Pirassununga - SP; Conquista - MG; Itapetininga - SP; Cristalina - GO; São Desidério - BA; Amambai - MS
Morsanto do Brasil Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Rolândia - PR, Castro - PR, Uberlândia - MG, Não Me Toque - RS, Santa Cruz das Palmeiras - SP
Sementes Morsanto Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Santa Helena - GO
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Toledo - PR; Itumbiara - GO
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Toledo - PR; Itumbiara - GO
Pioneer Sementes Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Toledo - PR; Itumbiara - GO, Rio Verde - GO
Sementes Morsanto Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Uberlândia - MG
Sementes Morsanto Ltda.	insetos da ordem Lepidóptera	<i>cryIA(b)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>	Uberlândia - MG
Sementes Morsanto Ltda.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Cachoeira Dourada - MG
BRASKA LB Agropecuária Brasileira Ltda.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Cascavel - PR, Palotina - PR, Ponta Grossa - PR, Chapecó - SC, Uberlândia - MG, Conquista - MG
Sementes Morsanto Ltda.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Cascavel - PR, Ponta Grossa - PR, Uberlândia - MG, Mauá da Serra - PR, Campos Novos - SC, Chapecó - SC
Sementes Agrocere s S.A.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Palotina - PR, Ponta Grossa - PR, Campo Mourão - PR, Cascavel - PR, Chapecó - SC, Uberlândia - MG, Conquista - MG
Sementes Morsanto Ltda.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Uberlândia - MG
Sementes Morsanto Ltda.	glifosate	<i>epsps</i>	<i>Helianthus annuus</i> e Milho - <i>Zea mays</i>	Uberlândia - MG
Pioneer Sementes Ltda.	glufosinato de amônio	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Toledo - PR; Itumbiara - GO, Rio Verde - GO
Sementes Morsanto Ltda.	glufosinato de amônio	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Uberlândia - MG
Sementes Morsanto Ltda.	glufosinato de amônio	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Uberlândia - MG

http://www.mct.gov.br/ctnbiotec/tab_milho.htm

PRINCIPAIS AVANÇOS NA CULTURA DO MILHO POR BIOTECNOLOGIA

Os principais avanços não só do milho, mas como uma série de outros organismos por biotecnologia foram e têm sido alcançados devido ao seqüenciamento de genes pela iniciativa pública e privada. Esse processo de seqüenciamento de genes vem acontecendo a cerca de 10 anos e está cada vez mais causando um grande impacto na comunidade científica. A princípio tratava de um projeto interminável de grande custo que geraria uma grande quantidade de dados que seriam pouco usados. Mas com o decorrer do tempo foi verificado que os dados gerados por essa tecnologia de seqüenciamento começaram a ajudar a finalização de outros projetos de pesquisa que não seriam terminados no mesmo espaço de tempo usando apenas os métodos "tradicionais". O seqüenciamento gênico tem sido uma forte ferramenta em um diferente tipo de genética chamada "reversa". A diferença da genética direta em relação à genética reversa é que a primeira tem por objetivo a identificação do gene que esteja relacionado com uma característica conhecida e a segunda genética, pelo próprio nome, inicia-se com o conhecimento da seqüência do gene (projetos genomas de seqüenciamento) para tentar então identificar a característica a qual esteja relacionada

Atualmente, existe um grande número de seqüências de genes expressos ou ESTs (*Expressed Sequences Tagged*) disponíveis para vários organismos, nos setores públicos e privados. Apesar da seqüência de nucleotídeos conter importantes informações sobre os genes, várias outras metodologias têm sido empregadas para a identificação da sua função. Com isso, a genética reversa tem ganho grande importância, uma vez que grandes volumes de seqüências de ESTs vêm sendo depositadas diariamente em bancos de dados.

Hoje existem um grande número de projetos de seqüenciamento de plantas com o objetivo de desvendar os genes que estão envolvidos nos processos agrônômicos importantes. Em plantas, o acúmulo de seqüências de DNA tem sido comparável ao de outros organismos. Em 1992, menos de 500 seqüências de plantas estavam disponíveis em bancos de dados. Em milho, o primeiro trabalho de seqüenciamento publicado foi em 1993 com um total de 130 cDNAs descritos. Mais tarde (1994) foi publicado o seqüenciamento e mapeamento de cerca de 300 clones de cDNAs utilizando linhagens recombinantes de milho e os resultados demonstraram que a combinação dessas análises fornecerão informações que, eventualmente, ajudarão a deduzir a função gênica.

A Tabela 1 apresenta um sumário do número de ESTs disponíveis (abril 2000) em bancos de dados de seqüência de domínio público. Ref:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html

Nome Científico	Nome Vulgar	Número de ESTS (abril/2000)
<i>Glycine max</i>	Soja	63,062
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	59,073
<i>Zea mays</i>	Milho	56,157
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	49,102
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	45,801
<i>Pinus taeda</i>	Pinus	10,815
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	9,337
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	8,029
ESTs Públicos*		3.828.199

* = Esse número inclui todos os organismo de do núcleo público

Apesar do número de ESTs de milho registrados até essa data ser de 56.157 clones de livre acesso, empresas privadas como Monsanto e Pioneer-DuPont detêm mais de 300.000 clones de milho seqüenciados (comunicação pessoal). Maiores detalhes do número de clones de milho sequenciados, disponíveis e mapeados podem ser encontrados no endereço eletrônico:

http://nucleus.agron.missouri.edu/cgi-bin/est_summary.pl).

Com o seqüenciamento massivo de DNAs, isolamento de um gene passou a não ser mais um problema. O grande desafio, agora, é saber qual as características que esses genes estão relacionados. A seguir descrevo dois projetos de biotecnologia que estão sendo feito no EUA com o objetivo de correlacionar genes com características agronômicas importantes.

USO DE TRANSPOSON PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNÇÃO GÊNICA EM MILHO

Transposons são elementos de DNA que têm a capacidade de sair de uma região do genoma e incorporar em outra. Sendo o movimento do transposon um processo aleatório, quando estes elementos "pulam" em um genoma, podem inserir em um gene tornando o mesmo inativo. Em plantas, uma série de transposons têm sido usados como ferramentas tanto na genética direta quanto na reversa para isolamento e caracterização de vários gene ou fenótipo. O princípio da técnica do uso de transposon em milho por genética direta está descrito na figura 1.

Essa capacidade dos transposons de causar mutação é uma interessante ferramenta para tentar identificar genes de importância agronômica. A tecnologia de caracterização de funções gênicas através do transposon *Mu* foi utilizada pela primeira vez em milho pela Pioneer Hi-Bred Co., e foi denominada *Trait Utility System* (TUSC) (Fig. 2). Uma versão pública desse mesmo projeto tem sido realizada nos laboratórios de Cold Spring Harbor (Dr. Rob Martienssen)

Um outro projeto também usando transposon *Mu* foi recentemente financiado pela National Science Foundation (NSF) coordenado pela Dra. Virginia Walbot (Universidade de Stanford, EUA) e tem por objetivo demonstrar a funcionalidade de genes de milho usando dois métodos complementares, o seqüenciamento de DNA genômico flanqueando as inserções do transposon *Mu* e a identificação e caracterização dos indivíduos mutantes contendo esses transposons.

Um banco de mutantes está sendo criado usando plantas transformadas com os elementos *Mu* contendo o plasmídeo Bluescript (Fig. 3). A nova inserção contendo o transposon poderá ser seletivamente clonada direto em *E. coli*, gerando uma biblioteca de mutação insercional para análise de DNA. Cada planta F₂ será autofecundada e as sementes serão estocadas no "Maize Genetics Cooperative Stock Center", um órgão especialmente criado para armazenar os estoques de sementes mutadas. Os usuários poderão utilizar a técnica de PCR para seleção de uma coleção de plasmídeos que foram inseridos em genes de interesse. A estimativa é de que 50.000 ESTs, flanqueadas pelo transposon *Mu*, sejam completamente seqüenciadas durante o primeiro ano do projeto. Sendo que o objetivo final é de sequenciar cerca de 150.000 segmentos de DNA genômico.

USO DE MICROARRAYS DE DNA NA CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A medida que acompanhamos os avanços da da biotecnologia, principalmente no melhoramento do milho, fica cada vez mais evidente a importância dos projetos de seqüenciamento de genes e do uso desses para estudos básicos como é o caso do TUSC (Pioneer-DuPont) e aplicados como é o caso dos transgênicos. A seguir descreverei uma nova metodologia que irá auxiliar tremendamente o mapeamento e o entendimento da função de genes envolvidos em processos agrônômicos importantes.

O *microarray* é uma metodologia utilizada para comparar a expressão de um grande número de genes simultaneamente. O objetivo desta técnica é desenvolver arranjos ou *arrays*, grupos selecionados de DNAs, que contenham um grande número de genes que se deseja quantificar os níveis de expressão. A tecnologia de *microarray* é baseada em experimentos onde milhares de clones de cDNAs são roboticamente impressos em placas de vidro e, subseqüentemente são hibridados com duas sondas marcadas com fluorescências diferentes (geralmente uma que emite uma cor vermelha e outra verde). As sondas são conjuntos de cDNAs gerados a partir de células ou tecidos em duas situações diferentes que se desejam comparar, por exemplo resistência e suscetibilidade ao alumínio. Os resultados são produzidos sob forma de diferentes intensidades de fluorescência que são captadas por microscopia de fluorescência à laser em função dos diferentes níveis de expressão de cada gene. A imagem dos pontos fluorescentes é processada por computadores e programas específicos, sendo gerada uma grande quantidade de informação simultaneamente (Fig. 4).

Uma máquina de *microarray* é operada por um robô que é capaz de colocar 16 amostras em 48 placas de vidro, lavar e secar a sonda para o próximo grupo de cDNA em 70 segundos. Assim, cerca de 10.000 amostras podem ser impressas em aproximadamente 12 horas. Vários sistemas robotizados mais rápidos e eficientes para a impressão e processamento dos cDNA nas placas de vidro, além de metodologias cada vez mais sensíveis e precisas para a detecção e análise dos resultados têm sido desenvolvidos e disponibilizados para os pesquisadores.

A tecnologia de *microarrays* não fornece apenas informações sobre a função de genes anônimos, o que favorecerá bastante os processos de genética reversa, mas também constitui uma ferramenta indispensável para estudos globais de expressão gênica, com grandes aplicações nos estudos de biologia molecular e fisiologia vegetal.

Em milho essa tecnologia tem sido usada em várias partes do mundo, mas principalmente nos EUA. Um exemplo é o projeto de descobrimento, sequenciamento e análise fenotípica de genes de milho descrita anteriormente nesse texto. Ref.: <http://www.zmdb.iastate.edu/>

OUTROS EXEMPLOS DA BIOTECNOLOGIA NA CULTURA DO MILHO

Milho Transgênico na Embrapa

A Embrapa Milho e Sorgo tem duas linhas de pesquisa na área de transgênicos. Uma delas é o aumento da qualidade protéica do grão e a outra é a criação de variedades de milho resistentes à *Spodoptera frugiperda* através da caracterização e isolamento de genes *vip* e *cry* do *Bacillus thuringiensis*.

O endosperma, 80% do grão de milho, tem sido de especial interesse devido à sua importância como fonte de energia e proteínas. Embora, o endosperma do grão de milho apresente em média 9% de proteína na matéria seca, esta proteína é de baixa

qualidade quando utilizada na alimentação humana ou de outros animais monogástricos, uma vez que possui baixos teores de aminoácidos essenciais como metionina, triptofano e lisina. O principal objetivo deste trabalho é a obtenção de plantas transgênicas de milho com uma melhor qualidade nutricional do grão através da super-expressão no endosperma de uma proteína rica em metionina, a delta zeína. Os resultados obtidos servirão como base para a produção de linhagens de milho tropical transgênicos que poderão ser incorporadas à programas de melhoramento tradicional, diminuindo o tempo e o custo na produção de novos genótipos adaptados às condições de estresses abióticos/bióticos dos trópicos e de melhor qualidade nutricional.

Os genes *vip* e *cry* de *Bacillus thuringiensis* têm sido isolados e caracterizados de cepas encontradas nos solos brasileiros com o objetivo de identificação de variações na eficiência da morte da inseto *Spodoptera frugiperda*. Esse processo será feito em plantas de tabaco inicialmente. Plantas de tabaco tem sido usado como modelo nos estudos genéticos e bioquímicos de transgênicos. Esses resultados serão de grande importância na utilização dessas construções gênicas no milho.

Milho para produção de hormônio humano

Há anos os centro de pesquisa do mundo inteiro procuram induzir vegetais a produzir substâncias úteis para a saúde humana e animal. O pesquisador Adilson Leite com sua equipe, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), desenvolveu um milho produtor de hormônio de crescimento ou hGH (do inglês *human Growth Hormone*) que tem-se mostrado idêntico ao produzido pelo organismo humano. Esse hormônio atualmente é produzido em bactérias. Esse processo abre caminho para fabricação em larga escala e a custos reduzidos de um composto químico de grande interesse médico. Segundo Adilson Leite, uma tonelada de milho seria suficiente para tratamento de aproximadamente mil crianças por ano. (Ref.: Revista Pesquisa – Fapesp – Dezembro 1999, N49, pg 20).

Bt (*Bacillus thuringiensis*) diminui lagartas famintas

No milho geneticamente engenheirado, a toxina Bt é produzida pela própria planta onde a lagarta se alimenta. A toxina do Bt não é tóxica para humanos, gado, insetos benéficos e outros animais. Mas na lagarta do milho a toxina destroi tecidos do intestino. Como resultado as lagartas param de se alimentar e, conseqüentemente, morrem. Em experimentos, em casa de vegetação, foi mostrado que 100% das lagartas morreram quando alimentadas pelo milho Bt transgênico. Teste de campo tem sido feitos no Brasil como mostra a tabela 1. O híbrido Bt leva o gene Novartis licenciado pela Monsanto Co. Esses híbridos têm a capacidade de reduzir a aplicação de inseticidas químicos. Na Florida, agricultores tem de aplicar insetidas químicos até 40 vezes por estação para assegurar espigas livres de larvas. Essas aplicações colocam em risco o ambiente e insetos benéficos.

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/1998/980402.htm>

Milho é doador de genes que aumentam a produtividade no arroz

Uma das situações que vem chamando mais a atenção nos transgênicos é a

manipulação de características poligênicas. Características complexas como produtividade são resultados de muitos genes que atuam durante todo o desenvolvimento da planta. Recentemente foi anunciado o aumento de produção de sementes em um arroz transgênico transformado com apenas um gene de milho. Esse gene presente em todas as plantas é expresso em milho em um processo metabólico não presente nas plantas chamadas C3. Nesse processo das plantas C3 muito CO₂, componente necessário na fotossíntese, é perdido. Esse trabalho foi realizado pelo cientista Maurice Ku e colaboradores (Universidade Estadual de Washington) e publicado no Nat-biotechnol. New York, NY : Nature America, Inc. Jan 1999. v. 17 (1) p. 76-80. A mesma notícia foi disponibilizada também pelo Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI da singla em inglês) (Folha de São Paulo, 31/3, p 1-16)

O novo milho poderia diminuir a poluição por fósforo

A poluição das águas com esterco de galinhas e porcos pode ser grandemente reduzido através do uso de uma nova variedade de milho, que possui uma concentração de ácido fítico reduzido, nas rações. Ácido fítico, abundante em milho normal, armazena fósforo na forma não usável por animais monogástricos. A chuva pode carregar excesso de fósforo para os rios, o que pode causar a morte das algas e um desbalanço no oxigênio, o que conseqüentemente pode terminar com a vida aquática. A perda de fósforo é de 25 a 40% menos com o milho geneticamente engenheirado de baixo ácido fítico.

Ref: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/1998/980220.htm>

Baculovirus modificados podem acabar com larvas de milho

Na natureza o vírus pode infectar a larva a fim de multiplicar e espalhar, mas a larva não morre imediatamente e com isso ela continua alimentando-se da planta. Cientistas têm estudado alternativas para alterar geneticamente o baculovirus com gene que codifica para um hormônio que diminui o apetite das larvas, matando-as por anorexia. No sul do EUA as larvas custam aos fazendeiros cerca de US\$ 1.5 bilhões anualmente em perdas e controle químico. Agricultores podem colocar 20 vezes mais inseticidas para assegurar o problema e colocar em risco o ambiente e insetos benéficos. A vantagem do vírus é que fora do inseto ele é destruído pela luz ultravioleta o que o torna sem perigo para o homem, gado e plantas. O hormônio chamado helicokinin-II (Hez-HK-II), realmente vem da larva que ataca o milho, mas não do baculovirus. O gene foi descoberto em estudos com o sistema nervoso da larva. Na natureza esse hormônio ajuda a larva a regular processos fisiológicos, capacitando o inseto crescer de larva para adulto. A superprodução desse gene no baculovirus causa um desbalanço hormonal que leva a morte da larva por falta de apetite e perda de água.

Por que não jogar o hormônio diretamente na planta?

O preço para produção desse hormônio em laboratório tornaria a cultura inviável. Além disso o hormônio é degradado rapidamente no ambiente e só funcionaria com injeção. O hormônio não penetra na pele da larva. Em estudos de laboratório em temperaturas de 23°C, larvas recém eclodidas infectadas com o vírus param de comer após 48 horas e após 20 dias apenas 3% sobrevivem e empalham comparados com os 100% das larvas sem o vírus.

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar98/corn0398.htm>

Maysin— Um inseticida natural do cabelo da espiga.

Cientistas têm manipulado a via metabólica que origina o cabelo da espiga (estigma) para aumentar a produção de maysin, um composto que promove resistência natural a insetos. Esses genes serão também importantes para alfalfa, algodão, amendoim e tomate. Larvas nas espigas custam mais que \$100 milhões anualmente. Aumento das concentrações de maysin no cabelo da espiga poderia reduzir o uso de inseticida em cerca de 85%. Algumas vezes fazendeiros têm que aplicar 30 vezes mais inseticidas por estação para manter a larva fora do milho. Larva de vermes adultos põem ovos diretamente nos cabelos da espiga do milho, essas larvas eclodem três dias mais tarde. As larvas então comem o cabelo e os grãos e caem no solo. Doze dias mais tarde, novos adultos voam a procura de alimento. Cientistas já identificaram genes chamados P1 do milho que regulam mais do que a metade da quantidade de maysin produzida. A tentativa é superexpressar este gene e verificar a ocorrência da larva na planta transgênica. Maysin se liga os amino ácidos no intestino do inseto e eles não podem usá-los e morrem de fome.

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/1997/maysin0697.htm>

Agora citarei alguns exemplos interessantes na cultura do milho que a biotecnologia teve ou terá um papel indireto em acelerar o processo da obtenção de produtos de interesse agrônômicos

Milho abaixando os níveis de colesterol

Cientistas descobriram e patentearam um novo óleo de fibra de milhos que pode reduzir os níveis de colesterol. Um produto secundário que é uma goma de fibra de milho de alto valor. Essas pesquisas tiveram o interesse de duas grandes companhias Monsanto e National Starch and Chemical Company. Isso também pode diminuir o custo de produção de produtos derivado como o etanol combustível. Estudos preliminares da University of Massachusetts Center for Cardiovascular Disease Research, indicam que as novas fibras de milho diminuíram significativamente o nível de colesterol total e o colesterol LDL que provoca entupimento das arteriais. As fibras são extraídas de forma fácil e simples e a goma é branca, um fato extremamente importante para a indústria de alimentos. Essa goma pode ser usada em alimentos como emulsificadores, fibra dietética solúvel. Aplicações industriais podem incluir adesivos e engrossadores de tintas baseadas em água. As fibras de milho produzem 2% óleo e 40% goma.

Ref: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/dec97/corn1297.htm>

O milho chamado "Patinho Feio" repele a doença da broca (*Ostrinia nubilalis* Hubner)

Um milho "patinho feio" pode levar segredos que podem salvar o milho de seus piores inimigos a broca europeia. Esse milho "B-96" recebeu esse nome pois é fraco, com raízes pouco desenvolvidas, suas espigas são pequenas e as sementes se assemelham ao milho de pipoca. Mas esse milho, originado da Argentina, possui químicos que atrapalham na deposição de ovos pela broca europeia. Anualmente essa

broca causa perdas de \$350 millions para as culturas do país. Sem tratamento preventivo, perdas podem atingir \$1 billion. No Brasil esta praga causa poucos prejuízos (cerca de 10%). Além do controle químico, outra prática alternativa é o milho Bt – milho geneticamente modificado por conter o gene de *Bacillus thuringiensis* produzindo químico que mata a larva. Cientistas acreditam que podem combinar o milho tipo Bt com B-96 para realmente erradicar a doença no campo sem nenhuma aplicação de inseticida. Diferente do milho susceptível, B-96 possui químicos de defesa. Após trabalhar por 5 anos, cientistas acreditam que um dos químicos é o HMBOA. Cientistas isolaram e sintetizaram esse componente e, atualmente, estão desenvolvendo ensaios para testar a sua eficiência contra lagartas. Um outro químico é o DIMBOA, que protege o milho jovem da alimentação das larvas. Cientistas acharam que, ao contrário das outras plantas, o B-96 continua produzindo um alto nível de DIMBOA and HMBOA a medida que matura. Os compostos químicos, HMBOA e DIMBOA, diminuem a deposição de ovos, enquanto a característica Bt controla as larvas que possam eclodir. Recentemente, cientistas acharam na planta B-96 um outro componente chamado Illinois A (ILLA), que pode oferecer melhor resistência à deposição de ovos

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/apr00/duck0400.htm>

Fungo e variedades de milho se unem para o combate a broca européia

Existe um fungo (*Beauveria bassiana*) que pode ajudar a combater a broca européia. Cientistas acharam que o fungo pode viver dentro da planta sem prejudicá-la, mas é letal para a broca. A larva da broca alimenta dentro do colmo, enfraquecendo a planta e reduzindo a produção em 30%. Em testes de laboratório foram observado que 97% das larvas da broca foram mortas quando alimentadas com milho colonizado por esse fungo. Em testes de campo a mortalidade foi mais baixa, mas ainda significativa com um decréscimo de 53% em plantas tratadas com o fungo

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/nov97/fung1197.htm>

Nematódeo defende milho de praga

Uma nova espécie de nematódeo pode ser parte das soluções para controlar uma conhecida praga de milho que causa grande danos; o besouro *Carpophilus lugubris*. Cientistas descobriram o nematódeo, *Psammomermis nitiduesis*, vivendo em coleções de besouros próximos aos campos de Illinois (EUA) em 1992. Cerca de 80% dos besouros encontrados na campo estavam infectados com esse nematódeo. Esses besouros podem ser a maior praga dos campo de milho americanos. Ele também dissemina fungos tóxicos nos campos de milho. Os adultos se alimentam de resíduos deixados no campo após colheita. Esses resíduos geralmente contém esporos de *Aspergillus* e *Fusarium*, que são fungos que não só causam danos a plantação, mas produzem substâncias tóxicas ao homem e animais. Mais tarde quanto as plantas de milho são polinizadas, os besouros adultos voam para as plantas e espalham os esporos a medida que se alimentam do pólen que cai nas regiões axiais da folhas do milho. Esse região das folhas é úmida e quente e facilita o desenvolvimento do fungo. As colônias tornam-se fontes de esporos que infectam besouros e lagartas que os transportam para outros grãos. As larvas do besouro entram nas espigas e as tornam inaceitáveis pelos consumidores. Cientistas acreditam que o nematódeo *P. nitiduesis*

entra no corpo do besouro no final do verão, quando as larvas do besouro são impulsionadas no solo. Cientistas estão testando a transferência de besouros contendo o nematódeo em áreas onde ele não exista como um controle biológico
Ref: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/1997/sapbeetle0597.htm>

Cientistas descobrem nova maneira de combater fungo em milho

Pythium and *Fusarium* causam doenças nas raízes e podem diminuir a produção no milho em cerca de 30%. Foram identificados microrganismos benéficos que podem controlar esses fungos. Cientistas cobriram sementes com uma combinação de bactérias e fungos de raiz de plantas e da rizosfera. Esses microrganismos atacam os patógenos de várias formas. Eles competem com os fungos patógenos por nutrientes e produzem antibióticos que matam ou repelem os patógenos. Comparados com os fungicidas químicos, os microrganismos benéficos não impõem problemas ao ambiente e protegem as plantas tão bem quanto os fungicidas. *Pythium* aparece quando o solo está frio e úmido (primavera). Eles causam sérios problemas à raiz. O *Fusarium* prefere quente e seco (verão). Ele ataca da mesma forma que o *Pythium* as raízes do milho. No campo apenas metade das sementes germinam e crescem até planta madura quando infectadas por ambos os fungos. Mas nas frações cuja a semente foi coberta com uma combinação de fungo e bactéria, mais de 80% tornaram plantas adultas. Proteção por micróbios benéficos continua após o estágio de planta recém germinada. Plantas adultas com o biocontrole tiveram de 25 a 40% menos danos na raízes que as plantas crescidas sem o inóculo.

Ref.: <http://www.ars.usda.gov/is/pr/1997/970123.htm>

Uso de marcadores moleculares no melhoramento de milho (Embrapa Milho e Sorgo)

Os avanços na área de biotecnologia na última década abriram caminho para a utilização efetiva de marcadores moleculares: no melhoramento genético de plantas; na caracterização de microrganismos; na diagnose de doenças vegetais; na determinação de pureza genética de sementes e na caracterização molecular de cultivares e linhagens (fingerprinting). O objetivo geral na Embrapa Milho e Sorgo é utilizar essa tecnologia de marcadores moleculares como ferramenta de auxílio a solução de problemas considerados prioritários a cultura do milho e sorgo nas condições tropicais do Brasil. Assim, este projeto visa identificar marcadores moleculares (proteínas, anticorpos e sondas de DNA) que possam ser utilizados nos programas de melhoramento genético do milho e sorgo para tolerância a estresses abióticos (solos ácidos, seca, deficiência de fósforo), para melhoria da qualidade nutricional dos grãos, e também, de sondas que possam ser utilizadas na identificação e caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio, de fungos causadores de ferrugens e na avaliação de pureza genética e "fingerprinting" de linhagens e cultivares de milho e sorgo.

PROSPECÇÃO DE GENES EM OUTRAS GRAMÍNEAS

A Embrapa Milho e Sorgo vem procurando prospectar genes e sequências regulatórias em outras gramíneas utilizáveis no melhoramento da qualidade nutricional do milho. A qualidade nutricional do milho é baixa uma vez que suas

proteínas de reserva são deficientes nos principais aminoácidos essenciais para a nutrição humana e de animais monogástricos. Considerando o alto grau de sintonia entre os genomas de várias espécies de gramíneas e as evidências de que genes que codificam proteínas de reserva e seus elementos regulatórios foram conservados durante a evolução de várias espécies desta família (como milho, sorgo, teosinto, tripsacum, milheto e outras), há possibilidades de se identificar em espécies selvagens ou de menor interesse comercial, genes e sequências regulatórias de interesse para o melhoramento da qualidade nutricional de cereais. O objetivo desse projeto na Embrapa Milho e Sorgo é o de caracterizar milho transformado com genes de proteína de reserva com maior valor nutricional presentes em outras gramíneas.

OBSERVAÇÕES SOBRE TRANSGÊNICOS

Cerca de 1,2 bilhões de pessoas (1 de cada 5 humanos), vivem em estado de pobreza o equivalente a US\$1/day. Dois bilhões de pessoas são anêmicas, normamente resultado de deficiência de ferro. A população mundial crescerá 25% para 7.5 bilhões em 2020. Hoje soja resistente a herbicida, milho resistente a inseto e algodão melhorado geneticamente (contendo genes de resistência a herbicida e resistência a inseto) correspondem a 85% de todas as plantações. Existe um considerável debate sobre riscos no desenvolvimento de resistência a pestes, prejudicar insetos benéficos e polinização cruzada com plantas selvagens com novos genes. Biotecnologia não é a única ou melhor solução, mas junto com a agricultura tradicional ou convencional pode ser um forte ferramenta para agricultores e consumidores. Os potenciais benefícios são introdução de plantas resistentes a insetos e doenças, tolerância a condições de tempo adversas, melhoramento na qualidade nutricional, aumento da durabilidade durante a colheita e armazenamento, culturas que usam melhor a água no solo e extraem fósforo do solo mais eficientemente, etc. Com o aumento da produtividade através da ajuda da biotecnologia agrícola, poderá ocorrer uma redução na necessidade de se cultivar novas áreas, consequentemente ocorrerá uma maior preservação da biodiversidade e ecossistemas frágeis.