

10

Avanços da Biologia Molecular



Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli
Marcos Aparecido Gimenes

319 O que é biologia molecular?

É o estudo da biologia em nível de moléculas, com especial foco no estudo das estrutura e função dos genes, e dos seus produtos, as proteínas.

A biologia molecular também investiga as interações entre os diversos sistemas celulares e desse complexo de sistemas em relação a diferentes estímulos, como os promovidos por insetos e doenças.

320 A biologia molecular é restrita apenas ao estudo de DNA?

Não. Ela é voltada também para o "produto" dos genes, que são as proteínas.

Atualmente, técnicas de proteômica permitem a identificação de proteínas expressas somente ou preferencialmente diante de um determinado estímulo, como, déficit hídrico.

Quando as proteínas são sequenciadas, permitem que sejam inferidas as prováveis sequências de DNAs que as codificam, informação esta que pode ser usada no processo de identificação do gene que codifica essa proteína.

321 Quais as ferramentas da biologia molecular para o estudo do DNA?

Uma vez estabelecida sua estrutura, o estudo do DNA voltou-se principalmente para a identificação das partes codificantes, determinação de seus produtos e associação com a expressão de uma determinada característica fenotípica.

Inicialmente, procurou-se associar a variação na sequência com determinada característica e a primeira maneira encontrada foi a avaliação de seus produtos por meio de sua mobilidade, determinada pelo comprimento e tipo de aminoácidos que a compõem, usando-se eletroforese e técnicas de histoquímica de detecção de proteínas e de enzimas.

Como dessa maneira a variabilidade encontrada era frequentemente baixa, a procura de associação entre genótipo e fenótipo voltou-se para a avaliação da variação nas sequências dos DNAs de indivíduos que divergiam para características de interesse agrônomo.

No início, foram usadas enzimas que cortavam os DNAs em sequências específicas (enzimas de restrição) que são encontradas em números variáveis entre indivíduos de uma mesma espécie.

Em 1988, com o surgimento da técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*), houve a possibilidade de se obter fragmentos individuais de DNA que facilitavam a avaliação do polimorfismo devido a diferenças tanto em tamanho, resultantes de inserções ou deleções (variação de tamanho de fragmento), quanto de sequências devido a mutações pontuais.

Atualmente, devido à grande disponibilidade de sequências de DNAs e à maior facilidade de análise de locos individuais em larga escala, os trabalhos de associação genótipo-fenótipo têm se voltado para a avaliação de variações nas sequências ponto a ponto.

É oportuno lembrar que, o sucesso na aplicação de biotecnologia no melhoramento de uma cultura não depende apenas da disponibilidade de técnicas de biologia molecular, mas também de material vegetal adequado, isto é, material avaliado adequadamente, gerando informações básicas importantes como número de genes envolvidos e herdabilidade, além de populações que estejam segregando para as características de interesse.

322

A biologia molecular é capaz de substituir o melhoramento genético clássico de amendoim e de outras culturas?

Não. A biologia molecular pode auxiliar o melhoramento genético pela identificação de sequências de DNA que fazem parte ou estão próximas a genes de interesse, facilitando a seleção de genótipos de interesse obtidos por cruzamentos.

Além disso, também pode introduzir genes que confirmam características agronomicamente interessantes em genótipos previamente obtidos por métodos convencionais de melhoramento.

323 O que são marcadores moleculares?

São fragmentos de DNA que diferenciam e segregam genótipos. São detectados em plantas parentais e suas proporções podem ser observadas nas progênies resultantes e podem ser obtidos por diferentes técnicas de biologia molecular.

324 O que é seleção assistida por marcadores moleculares e como difere da seleção tradicional?

A seleção assistida por marcadores moleculares é aquela monitorada por meio da detecção de fragmento(s) de DNA (marcadores moleculares – sequências específicas no seu DNA) comprovadamente associados à característica de interesse.

Os métodos tradicionais de seleção, usados em programas de melhoramento, baseiam-se em descritores qualitativos e quantitativos, ou seja, na característica que pode ser avaliada ou mensurada como peso dos frutos, altura, cor, textura, conteúdo proteico, resistência a doenças, etc.

325 Quais as vantagens da seleção assistida por marcadores moleculares em relação aos métodos convencionais?

O uso de marcadores moleculares oferece vantagens de tempo e precisão, principalmente em casos em que a avaliação da característica é demorada ou demanda muito trabalho.

Atualmente, o maior potencial para uso de marcadores moleculares está na seleção para plantas resistentes a fatores bióticos ou abióticos.

Outro caso interessante é quando a característica aparece apenas no final do ciclo da planta. Nesses casos, a seleção auxiliada por marcadores diminui o tempo para a identificação das plantas, com a característica desejada.

A tecnologia de marcadores moleculares tem tido um impacto grande no melhoramento genético de amendoim?

Apesar de já haver grupos trabalhando com marcadores para identificação de acessos geneticamente distantes, visando ao uso em mapeamento genético, as aplicações ainda são limitadas.

Até há pouco tempo, o uso de marcadores moleculares concentrava-se apenas na espécie de amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*), que, apesar de ser classificado em subespécies e variedades agronômicas, apresenta pouca variabilidade genética detectada por marcadores, dificultando seu uso, de maneira efetiva.

Atualmente, marcadores moleculares têm sido aplicados em espécies silvestres relacionadas ao amendoim cultivado, que possuem grande variabilidade morfológica e molecular, com o intuito de contribuir para o uso nessas espécies, no melhoramento do amendoim.

A baixa variabilidade genética, a qual é detectável com marcadores moleculares, significa que nunca existirá um mapa de ligação de *Arachis hypogaea*?

Não. Além do grande número de marcadores moleculares hoje disponíveis, ainda existe a possibilidade de detecção de polimorfismo entre amostras, sem que haja necessidade de avaliação de comprimento de fragmentos de DNA.

Os polimorfismos são base a base e por isso são chamados polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs). Até há pouco tempo, a técnica era bastante limitada devido ao alto custo para sequenciamento. Contudo, atualmente, esse custo é muito mais acessível.

Uma primeira versão de mapa de *A. hypogaea*, derivado de técnicas baseadas em PCR, foi recém-finalizada num consórcio entre o International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Icrisat/Índia), a Embrapa e a Universidade Católica de Brasília, DF.

328

Como a tecnologia de marcadores moleculares poderia contribuir no uso de plantas silvestres no melhoramento do amendoim?

As espécies silvestres apresentam várias características de interesse para o melhoramento do amendoim, como resistência às doenças fúngicas, ao déficit hídrico, boas propriedades nos teores de óleo e de proteína das sementes, etc.

Entretanto, quando essas espécies são cruzadas com o amendoim cultivado, também são transferidas características indesejáveis, como baixa produtividade.

É preciso então fazer vários retrocruzamentos com o amendoim cultivado, para gerar uma cultivar com a característica herdada da espécie silvestre, além de características importantes para a produção, como produtividade, tamanho e forma da semente, ciclo, etc.

Marcadores moleculares poderiam identificar os indivíduos com as maiores porções do genoma do parental recorrente a cada ciclo de cruzamento, acelerando o processo de seleção.

329

Atualmente, o que tem sido feito com seleção assistida por marcadores, no melhoramento de amendoim, no Brasil?

Mais de 300 marcadores moleculares e dois mapas genéticos foram construídos por uma rede de laboratórios brasileiros. Esses mapas são os primeiros com tipos de marcadores transferíveis para o amendoim cultivado.

Testes para associação desses marcadores, com características de interesse, estão em condução, além das análises de similaridade com outras plantas da mesma família (sintenia).

330

Para quais características morfológicas já existem marcadores associados?

Já existem marcadores associados para as seguintes características morfológicas:

- Pilosidade das folhas (que pode estar associada a resistência a doenças).
- Porte (rasteiro ou ereto).
- Cor de flor.
- Tamanho de fruto.
- Número de sementes por fruto.
- Tamanho do istmo, entre outras.

331 Já existem marcadores moleculares ligados a doenças?

Recentemente, alguns marcadores foram encontrados associados com a resistência à pinta-preta (*Cercosporidium personatum*).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia também está em processo de desenvolvimento de marcadores ligados a doenças foliares e a nematoides. Para isso, foi preciso obter híbridos entre diferentes espécies silvestres, além de híbridos entre as espécies silvestres e a cultivada.

Também foi feito longo trabalho de desenvolvimento de marcadores moleculares e de estudos da posição desses marcadores no genoma de cada um desses cruzamentos. Esse trabalho está em franca expansão e os primeiros resultados devem aparecer em breve.

332 Que tipo de estrutura é necessária para uso de marcadores?

É necessário um laboratório básico de biologia molecular e um técnico especializado com treinamento em extração de DNA e genotipagem. Isso é viável, em centros de melhoramento genético. A maioria dos centros de pesquisa e das universidades brasileiras já dispõe dessa estrutura.



333

Se existe pouca variabilidade molecular no amendoim cultivado, como explicar tanta variabilidade morfológica?

Como existe variação morfológica, provavelmente a variação observada no amendoim deve ser devida a variações pequenas em genes principais ou nas regiões promotoras dos genes, determinando que o mesmo lote de genes tenha expressão diferenciada entre diferentes genótipos. Entretanto, todo o resto do genoma apresenta grande uniformidade.

334

Genes com expressão diferencial em diferentes genótipos podem ser avaliados? Qual seria sua importância?

Sim. Existem técnicas de biologia molecular que permitem a identificação dos genes que estão se expressando diferencialmente entre os genótipos e entre diferentes fases do desenvolvimento do mesmo genótipo.

Muitos dos genes que possuem uma expressão diferenciada podem estar relacionados com a característica em análise. Existem vários exemplos interessantes, como trabalhos mostrando diferenças em transcritos relacionados com estresse hídrico e com infecção por mancha-preta. Tais produtos apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas no nível de expressão gênica.

335

Quais as outras maneiras para se estudar esses genes?

Atualmente, existem várias maneiras para o estabelecimento de padrões de expressão de genes. A mais potente é a técnica de arranjos densos de DNA (microarranjos).

Essa técnica tem potencial para avaliar grande parte dos genes de uma espécie de uma só vez, permitindo uma visão geral do padrão de expressão dos genes de uma planta numa fase do desenvolvimento ou diante de determinado estímulo.

336

Em quais características essas técnicas de expressão poderiam ser usadas e por quê?

No momento, as maiores aplicações são voltadas para busca de genes relacionados a estresses bióticos e abióticos, sendo tolerância à seca e resistência às doenças as características mais expressivas, por serem um dos principais alvos em programas de melhoramento.

A resistência e a tolerância podem ser conferidas por características constitutivas (aquelas presentes na planta, em qualquer situação) ou pela capacidade de adaptação da planta (as que só aparecem quando a planta está sendo estressada).

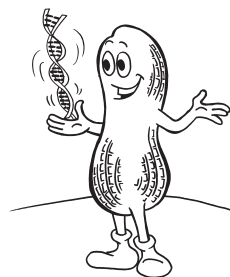
As características constitutivas são muito complexas, sendo difíceis de serem alteradas geneticamente por métodos convencionais (ou não), enquanto as adaptativas são expressas diante do estímulo e podem ser controladas por poucos genes, facilitando a manipulação.

Por exemplo, plantas com raízes vigorosas – que atinjam maiores profundidades – podem ser menos suscetíveis ao déficit hídrico. Assim, essa característica constitutiva só seria vantajosa em solos profundos. Já as características adaptativas seriam vantajosas em qualquer situação.

337

Os genes encontrados nas técnicas de expressão podem ser considerados de importância agrônômica?

Depende do que está sendo prospectado. Por exemplo, se a busca de genes está relacionada a fatores bióticos ou abióticos, a importância maior é em nível fisiológico, porque muitos genes são ativados como consequência de estímulos secundários, e não por estarem envolvidos diretamente na expressão da característica em análise. Portanto, alguns cuidados devem ser tomados na interpretação de experimentos dessa natureza.



338

Como esses genes seriam usados no melhoramento do amendoim?

Eles poderiam ser convertidos em marcadores moleculares, para serem usados em seleção assistida, ou poderiam ser usados para se obter plantas transgênicas.

339

Uma vez que uma característica interessante é detectada num acesso silvestre, é possível passar essa característica para o amendoim cultivado?

Sim, por meio de cruzamentos, desde que haja compatibilidade cromossômica, ou por transgenia.

O amendoim cultivado tem-se mantido isolado dos seus parentes silvestres porque seus genomas não são compatíveis.

Esse produto tem o dobro de cromossomos da grande maioria das espécies silvestres. Por isso, não ocorrem cruzamentos espontaneamente, dificultando a transferência dos genes das espécies silvestres para a cultivada.

Apesar disso, a introdução de genes de plantas silvestres de amendoim em cultivares foi feita pela Universidade do Texas, nos Estados Unidos, por meio de cruzamentos de espécies silvestres e de duplicação artificial dos cromossomos da planta híbrida.

Assim, as plantas resultantes (anfidiplóides) se tornaram compatíveis com o amendoim. Com esse trabalho, foram produzidas duas variedades com resistência ao nematoide-das-galhas.

A Embrapa e o International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Icrisat)/Índia também têm linhagens anfidiplóides sintéticas com perspectiva de desenvolvimento de cultivares.

340

Atualmente, o que tem sido feito com transferência de genes de plantas silvestres para o amendoim cultivado no Brasil?

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem gerado vários poliploides sintéticos por cruzamentos entre espécies diploides

da seção *Arachis*, os quais contêm espécies mais relacionadas ao amendoim cultivado.

Já foram elaborados mapas genéticos para os genomas A e B de *Arachis*, o que garantirá que boa amostragem do genoma será feita, pois permitirá que marcadores de todos os cromossomos (grupos de ligação) sejam usados no processo.

As espécies usadas para se obter poliploides sintéticos foram selecionadas por possuírem características de grande interesse para o melhoramento do amendoim, como resistência a manchas foliares e ao estresse hídrico.

Em alguns estados do Nordeste, essas populações encontram-se em ensaio de rede e têm sido direcionadas como recurso forrageiro, devido à riqueza de sua matéria seca em proteína e em minerais.

341

Se o amendoim tem tanta resistência à seca, para que se buscam genes de resistência em material silvestre?

A resistência à seca é um caráter complexo e de natureza varietal. Assim, depende não apenas da resposta do acesso, mas também da intensidade da duração e da fase ontogenética em que o déficit hídrico ocorre na planta.

Os materiais silvestres são encontrados nas mais variáveis condições ambientais, demonstrando níveis de tolerância a diversos fatores ambientais não encontrados no amendoim cultivado.

Assim, a transferência desses genes para o amendoim pode ser de grande benefício e viabilidade, desde que haja compatibilidade cromossômica.

342

De que maneira a biotecnologia pode contribuir no combate às doenças foliares?

Pode auxiliar no melhoramento genético e no desenvolvimento de marcadores para seleção assistida.

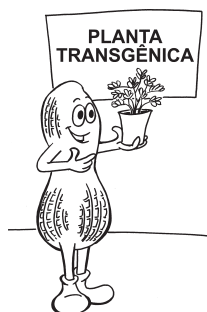
No Brasil, já existem alguns marcadores que parecem estar ligados a essas doenças, conhecidas como cercosporioses.

Esse estudo foi feito numa população silvestre, devido à sua maior variabilidade, mas precisa ser validado numa população tetraploide dotada de genes de resistência a cercosporioses. Essa população encontra-se em programas de melhoramento no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), SP, e na Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB.

Quando esses marcadores forem validados, será possível transferir o(s) gene(s) ao(s) qual(is) os marcadores estão ligados com maior eficiência, para linhagens ou cultivares. A transgenia é outra alternativa que pode ser de grande auxílio para se obter plantas resistentes.

343

Já existe alguma planta transgênica de amendoim, com resistência a doenças?



Sim. Os trabalhos mais conhecidos são os de obtenção de plantas de amendoim com resistência ao vírus-do-vira-cabeça (*Tomato spotted wilt virus*) do tomate, ao *Peanut stripe virus* (PSTV) à pinta-preta (*Cercosporidium personatum*) e à lagarta-elasm (*Elasmopalpus lignosellus*).

Entretanto, geralmente os níveis de resistência são moderados, e nenhuma planta foi lançada no mercado.

344

Na área molecular, o que a Embrapa está fazendo para resistência à doenças?

No momento, os trabalhos estão mais voltados para nematoides, que afetam a cultura do amendoim. Os nematoides causam sérios prejuízos em várias partes do mundo.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está mapeando marcadores associados à resistência a uma espécie de nematoide das galhas, resistência esta que ocorre em quase todos os acessos silvestres.

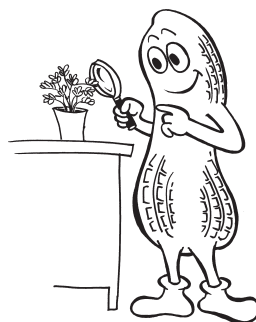
345 Já existe amendoim transgênico no Brasil?

Não. Em nível experimental, alguns trabalhos têm sido conduzidos por universidades e pela Embrapa, enfocando o aprimoramento de técnicas de transformação e regeneração de plantas transformadas, devido à dificuldade de se obter regeneração de amendoim transgênico.

Contudo, não há nenhum amendoim transgênico com características de interesse agrônômico.

346 Caso haja demanda para o amendoim transgênico no Brasil, quais características teriam possibilidade de contribuir na produção da cultura?

Considerando-se os genes já conhecidos e de função comprovada, as características introduzidas seriam aquelas que já têm sido usadas nas grandes lavouras, como soja, milho e algodão, ou seja, resistência a insetos e a herbicidas. Resistências a vírus e a fungos foliares também seriam de grande impacto.



347 Caso fosse introduzido um gene de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para controle de lagartas em amendoim, isso poderia auxiliar no controle da produção de aflatoxinas?

Sim. Em 1997, esse experimento foi desenvolvido na Universidade da Geórgia, nos Estados Unidos. Nele, plantas de amendoim foram transformadas com um gene de Bt.

Quando expresso em altos níveis, além de reduzir o ataque por lagartas de solo, indiretamente esse gene também reduziu o nível de infecção de *Aspergillus*, o fungo produtor de aflatoxinas, e os níveis de aflatoxinas.

Num manejo integrado, trabalhos desse nível são muito válidos como uma peça em que boas práticas agrícolas e pós-colheita são o fator mais importante para se minimizar a contaminação por aflatoxinas.

348

A alergenicidade natural do amendoim pode ser eliminada por meio de transgenia?

A alergenicidade do amendoim é conferida por proteínas muito abundantes na semente, que chegam a constituir mais de 50% de todo o conteúdo proteico. Atualmente, são conhecidas pelo menos nove tipos de proteínas alergênicas.

Na área molecular, uma tentativa para se obter amendoim com menor nível de alergenicidade é por modificação dos epítopos das moléculas alergênicas. Epítopos são os sítios das proteínas reconhecidas pelos anticorpos humanos, que por sua vez, disparam a reação alérgica.

A modificação desses sítios tem o potencial de diminuir a capacidade de reconhecimento por parte dos anticorpos e a resposta alérgica. Existem outros estudos com tecnologias modernas de indução de mutação nos genes que codificam para as proteínas alergênicas pela técnica chamada de *tilling*.

Isso leva à modificação no conteúdo e na composição dessas proteínas nas sementes de amendoim. Entretanto, o que tem tido maior sucesso são mesmo as drogas administradas aos pacientes contaminados, para diminuir os níveis da resposta alérgica.

349

Produtos contendo material transgênico podem apresentar efeito colateral?

Essa questão é uma grande preocupação da sociedade. Entretanto, é importante ter em mente que efeitos colaterais podem

ocorrer devido ao consumo de qualquer produto, seja de origem animal, vegetal ou químico.

Até hoje, não há dados concretos que sugiram que plantas transgênicas ofereçam maior risco à saúde humana do que uma planta obtida por melhoramento tradicional.

Portanto, embora justificadas, as preocupações devem ser colocadas num contexto maior, onde o que poderia oferecer risco seria a proteína codificada pelo gene transferido e não o método de transferência (por transgênia ou por melhoramento tradicional).

350 Quais as etapas para se obter plantas transgênicas?

Essas etapas são:

- Identificação e isolamento do gene desejado.
- Clonagem ou introdução do gene ou do fragmento de DNA no genoma do hospedeiro.
- Regeneração da plântula transformada por cultivo de tecidos.
- Introdução da planta geneticamente modificada em programa de melhoramento específico da espécie transformada.

351 Há possibilidade de uma planta transgênica de amendoim cruzar com a planta não transformada da mesma espécie?

Essa possibilidade é muito remota, pois, naturalmente, a taxa de polinização cruzada do amendoim é baixa, menor que 2%. Além disso, independentemente de qual seja o transgene ou a espécie, são necessárias barreiras de contenção no ato do plantio, para evitar esse risco.

352 Geralmente, qual tem sido o impacto da biotecnologia na cultura do amendoim?

Não só a biotecnologia, mas conhecimentos envolvendo diversos temas da genética – adquiridos nos últimos anos –, só agora geraram grandes benefícios para essa cultura.

Características peculiares que dificultaram os estudos do amendoim nessa área:

- Baixa variabilidade genética detectada por marcadores moleculares.
- Tamanho exagerado de genoma.
- Abundância de elementos repetitivos, que "confundem" os estudos, entre outras.

Felizmente, já se pode contar com maior conhecimento para transferência de genes de espécies silvestres, fruto de melhor compreensão do genoma do amendoim e de seus parentes silvestres, além da disponibilidade de ferramentas moleculares, como os marcadores e os mapas.

Todo esse conhecimento acumulado contribuiu para que, hoje, a transferência de características de interesse presentes em espécies silvestres seja possível.