Recursos Genéticos & Melhoramento



Plantas

Editores

Luciano Lourenço Nass
Afonso Celso Candeira Valois
Itamar Soares de Melo
Maria Cléria Valadares-Inglis



Recursos Genéticos & Melhoramento Plantas

Luciano Lourenço Nass
Secretaria de Relações Internacionais
Embrapa / Mat. 257039

RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO - PLANTAS

Editores

Luciano Lourenço Nass
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Afonso Celso Candeira Valois
Embrapa Sede

Itamar Soares de Melo
Embrapa Meio Ambiente

Maria Cléria Valadares-Inglis
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Fundação MT
Rondonópolis, MT - 2001

Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária do Mato Grosso - Fundação MT
R. Pernambuco, 1267 - C.P. 79
78705-040 - Rondonópolis, MT

Capa
Itamar Soares de Melo

Foto/Capa
"**King of the Night** ", cortesia de *Cy DeCosse*, fotógrafo - Jonh Stevenson Gallery, New York, NY.

Projeto Gráfico/Editoração Eletrônica
Claudete Rodrigues Pereira

Normatização/Índice Remissivo
Nilce T. Puga Nass

Tiragem 1000 exemplares

©Dos Editores

Recursos genéticos e melhoramento - plantas / editores Luciano
R311 Lourenço Nass, Afonso Celso Candeira Valois, Itamar Soares de Melo, Maria Cléria Valadares-Inglis. - Rondonópolis: Fundação MT, 2001.
1183p.; cm.

ISBN 85-88473-01-1
Inclui bibliografia

1. Recurso genético vegetal 2. Melhoramento - Planta
I. Nass, Luciano Lourenço. II. Valois, Afonso Celso Candeira.
III. Melo, Itamar Soares. IV. Valadares-Inglis, Maria Cléria
CDD - 631.523
631.522

APRESENTAÇÃO

A agricultura surgiu há mais de 10 mil anos e é reconhecida como um dos alicerces da civilização. No entanto, muito pouco da biodiversidade disponível vem sendo explorada desde aquela época. O trabalho de domesticação, introdução e seleção, geralmente moroso, deverá ainda suscitar interesse dos melhoristas frente a uma demanda crescente de alimentos.

Os tópicos desenvolvidos neste livro, muitos dos quais ainda não abordados em língua portuguesa, foram selecionados em função da carência de publicações dessa natureza voltadas a atender estudantes e profissionais da área do melhoramento vegetal.

São discutidos aspectos relacionados ao manejo e conservação dos recursos genéticos vegetais, assim como aspectos teóricos e práticos em relação aos métodos de melhoramento, sendo particularmente enfatizados os resultados obtidos em diversas culturas pelos programas de melhoramento conduzidos no Brasil. Não houve preocupação em simplesmente descrever as metodologias empregadas no melhoramento de plantas, já cobertas por publicações anteriores; ressalta-se a utilização dos métodos clássicos e das novas metodologias, desenvolvidas com base no conhecimento pormenorizado do DNA, na solução de problemas reais, como também são indicadas alternativas visando à obtenção de genótipos superiores, considerando-se qualquer sistema reprodutivo, tanto em culturas anuais quanto perenes.

Há também, vários textos nos quais são feitas abordagens biométricas aplicadas ao melhoramento de plantas e que deverão auxiliar na manipulação e interpretação de dados gerados nos programas de melhoramento. Destaca-se ainda, a presença de discussões voltadas para condições específicas de melhoramento genético envolvendo fatores bióticos e abióticos. Aspectos relevantes das metodologias que envolvem marcadores genéticos são amplamente discutidos e, certamente, fornecerão subsídios importantes para a condução dos programas de melhoramento atuais e futuros em nosso país.

O desafio que se apresenta aos melhoristas para o novo século é o desenvolvimento de uma agricultura sustentável que seja benéfica ao ambiente e ao ser humano. Nesse sentido, enaltecemos a colaboração de todos os autores aqui reunidos pela disposição de apresentarem ao leitor temas tão relevantes e pela confiança depositada nesta proposta.

Os Editores

PREFÁCIO

Quando os editores deste livro procuraram a Fundação MT para apoiar a publicação deste trabalho, vimos que era o mínimo que uma instituição voltada para *melhorar a vida das pessoas através do desenvolvimento de tecnologias aplicadas à agricultura* poderia fazer. Na verdade este apoio era mesmo uma obrigação.

É motivo de palestras acadêmicas o quanto a genética e o melhoramento de plantas melhoram a vida das pessoas ligadas à agricultura, bem como os demais segmentos da sociedade em que vivemos.

Para visualizarmos realmente esta melhoria, não é preciso citar casos de outros países. Basta olharmos para o passado e lembrarmos o que foi a região do cerrado brasileiro há vinte anos atrás: apenas uma região cheia de arvores tortas, de terra improdutiva e com muita pobreza. A pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias capitaneadas pelo melhoramento genético permitiram transformar esta grande fronteira agrícola num dos mais prósperos celeiros do planeta.

Estas transformações só foram possíveis, porque o país investiu na formação de profissionais que puderam gerar as tecnologias transformadoras. Contribuir para formação de novos profissionais é investir na continuidade deste desenvolvimento.

Como produtor e usuário destas tecnologias gostaria de agradecer a todos os autores e demais profissionais da área de genética e melhoramento de plantas, pelo trabalho e esforço constante para o desenvolvimento econômico e social que estamos testemunhando.

Portanto é inquestionável a importância desta publicação diante das conquistas já realizadas e da competitividade que o mercado nos impõe a cada dia.

É com grande satisfação e honra que a FUNDAÇÃO MT apresenta este trabalho à comunidade científica brasileira voltada ao melhoramento de plantas. Esperamos em breve estarmos colhendo o frutos deste investimento através do trabalho de cada usuário desta obra.

Blairo Borges Maggi
Diretor Presidente
Fundação MT

SUMÁRIO

1 Melhoramento genético no Brasil – realizações e perspectivas 1
Manoel Abilio de Queiróz

2 Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento 29
Luciano Lourenço Nass

3 O processo evolutivo e o melhoramento de plantas 57
Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Fabrizio D'ayala Valva

4 Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento 79
João Rodrigues de Paiva, Afonso Celso Candeira Valois

5 Uso de germoplasma exótico no melhoramento 101
Luciano Lourenço Nass, José B. Miranda Filho, Manoel Xavier dos Santos

6 Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais 123
Afonso Celso Candeira Valois, Luciano Lourenço Nass, Marisa de Goes

7 Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais 149
Paulo Kageyama, Flávio B. Gandara, Roland Vencovsky

8 Melhoramento de espécies alógamas 159
Cláudio Lopes de Souza Jr.

9 Melhoramento de espécies autógamas 201
Magno Antonio Patto Ramalho, Ângela de Fátima Barbosa Abreu, João Bosco dos Santos

10 Genética e melhoramento de populações mistas 231
Roland Vencovsky, Mauricio Ballesteiro Pereira, João Ribeiro Crisóstomo, Maria Aldete J. da F. Ferreira

11 Melhoramento de espécies de propagação vegetativa 283

Afonso Celso Candeira Valois, João Rodrigues de Paiva, Francisco Ricardo Ferreira, Walter dos Santos Soares Filho, Jorge Luiz Loyola Dantas

12 Melhoramento de hortaliças 293

Antonio Ismael Inácio Cardoso

13 Heterose e emprego de híbridos F_1 em hortaliças 327

Wilson Roberto Maluf

14 Melhoramento de espécies perenes 357

Marcos Deon Vilela de Resende

15 Melhoramento de espécies nativas 423

Charles R. Clement

16 Melhoramento genético de fruteiras temperadas 443

Maria do C. B. Raseira, Bonifacio H. Nakasu

17 Melhoramento de fruteiras de clima tropical 479

Jorge Luiz Loyola Dantas, Walter dos Santos Soares Filho, João Roberto Pereira Oliveira, José Renato Santos Cabral, Luciana Veiga Barbosa, Mario Augusto Pinto da Cunha, Rogério Ritzinger, Sebastião de Oliveira e Silva

18 Melhoramento de forrageiras tropicais 549

Antônio Vander Pereira, Cacilda Borges do Valle, Reinaldo de Paula Ferreira, John W. Miles

19 Hibridação no melhoramento 603

José B. Miranda Filho, Luciano Lourenço Nass

20 Endogamia ou consangüinidade 629

José B. Miranda Filho

21 Cruzamentos com testadores e dialelos 649

José B. Miranda Filho, Eliana Patrícia Gorgulho

22 Interação de genótipos com ambientes 673

Lázaro José Chaves

23 Melhoramento de plantas visando resistência a doenças 715

José Tadashi Yorinori, Romeu Afonso de Souza Kiihl

24 Melhoramento para resistência a insetos 737

José Djair Vendramim, Marcelo Akira Naime Nishikawa

25 Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos 783

Sidney Netto Parentoni, Vera Maria C. Alves, Sandra K. Milach, Geraldo M. Almeida Cançado, Antonio F. C. Bahia Filho

26 Genética bioquímica aplicada ao melhoramento 853
Ricardo Antunes Azevedo, Silvia Maria Guerra Molina

27 Citogenética aplicada ao melhoramento 871
Maria Suely Pagliarini

28 Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento 911
Maria Lucia Carneiro Vieira, Beatriz Appezzato-da-Glória

29 Biologia Molecular Aplicada ao Melhoramento 939
Anete Pereira de Souza

30 Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo 967
Dario Grattaplagia

31 Plantas transgênicas no melhoramento 1011
Marcio Castro Silva-Filho, Maria Cristina Falco

32 Marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças 995
Luis Eduardo Aranha Camargo

33 Expressão de proteínas heterólogas em plantas 1057
Adilson Leite

34 A informática no melhoramento genético 1085
Cosme Damião Cruz

35 Uso de simulação no melhoramento 1119
Daniel Furtado Ferreira

36 Gestão de direitos de propriedade intelectual aplicada aos produtos e processos do setor agrícola 1143
Maria José Amstalden Sampaio, Marcio de Miranda Santos

37 Parcerias para o desenvolvimento de pesquisa em melhoramento no Brasil: O exemplo da soja 1161
José Francisco Ferraz de Toledo, Romeu Afonso de Souza Kiihl, Leones Alves de Almeida, Luis Carlos Miranda, Carlos Alberto Arrabal Arias

Índice Remissivo 1171

Índice Autores 1183

1

MELHORAMENTO GENÉTICO NO BRASIL – REALIZAÇÕES E PERSPECTIVAS

MANOEL ABILIO DE QUEIRÓZ

Embrapa Semi-Árido, C.P. 23 - CEP: 56300-970 - Petrolina, PE.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas tem sido definido como a "arte e a ciência que visam à modificação gênica das plantas para torná-las mais úteis ao homem" (Borém, 1998). Esta definição, vista de uma forma mais ampla, contempla todo o processo de desenvolvimento da agricultura, mencionado na literatura corrente como de ocorrência nos últimos dez mil anos, permitindo a mudança do hábito das populações humanas primitivas do nomadismo para o sedentarismo, quando decidiram a abandonar o extrativismo para iniciar o plantio dos tipos de plantas que lhes eram mais adequados. O fato de se plantar os tipos desejáveis provocou a mudança nas freqüências gênicas das espécies escolhidas, embora toda a teoria do melhoramento de plantas só tenha progredido após os clássicos experimentos de Mendel e seus redescobridores nos últimos cem anos. Assim, o melhoramento como arte foi praticado por um longo período proporcionando contribuições muito grandes na agricultura mundial, pois, como se sabe, a domesticação de novas espécies em tempos recentes tem sido muito limitada. Com efeito, a maioria das espécies que alimenta a humanidade foi domesticada em tempos remotos, especialmente os grãos. O trigo, uma das primeiras espécies a serem domesticadas, por exemplo, teve o seu cultivo iniciado há cerca de 9.000 anos (Feldman, 1976). Muitos outros exemplos podem ser examinados em Simmonds (1976).

Com o advento da teoria do melhoramento genético, a ciência passou a desempenhar um papel preponderante no desenvolvimento de plantas de importância para o homem. Vários textos descrevem as principais áreas do conhecimento (Poehlman & Borthakur, 1969; Borém, 1998), além dos diversos ramos da genética, inclusive os marcadores genéticos de DNA, que são relevantes para o melhoramento de plantas (Milach,1998), especialmente visando torná-lo mais eficiente na busca da melhoria dos caracteres que atendam à sociedade de produtores e de consumidores. Para os primeiros, os requisitos de produtividade, uniformidade para permitir o uso de máquinas para colheita e beneficiamento; adaptação a novos ambientes para permitir a expansão de fronteiras agrícolas; resistência a doenças e pragas foram, e deverão ser, os caracteres de maior significância a serem considerados pelos melhoristas. Nos tempos recentes, contudo, os consumidores, numa tendência crescente, estão influenciando no direcionamento das ações do melhoramento de plantas, seja pela busca de alimentos com qualidades nutricionais específicas (teor de proteína, vitaminas, sais minerais, baixo teor de gordura, entre outras); sabores diferentes; aparência; frutos sem sementes e, principalmente, preços competitivos, o que novamente, tem íntimo relacionamento com os aspectos de produtividade e outros itens relevantes na redução de custos de produção. Todas essas características estão passando a ter um papel decisivo no melhoramento de plantas obrigando o melhorista a estabelecer uma estratégia de visão de futuro sobre o seu trabalho, principalmente enfocando os aspectos do negócio agrícola e suas implicações para o melhoramento de plantas.

É importante salientar que os textos especializados de melhoramento de plantas e disponíveis no Brasil, enfocam, formalmente os aspectos biológicos e agronômicos que são importantes dentro da área produtiva, tendo-se pouca abordagem sobre o melhoramento para outros elos da cadeia produtiva, particularmente os elos que estão fora da área de produção. Assim os caracteres que impliquem em maior resistência ao transporte e duração de prateleira, poderão ser de grande significado para as espécies frutícolas e olerícolas, por exemplo. Caracteres que sejam relevantes para a aparência de produtos expostos nas redes de supermercados como coloração externa e formato, poderão significar um diferencial importante na aceitação de uma determinada cultivar melhorada.

Recentemente, Paterniani (1999) relatou a contribuição do melhoramento de plantas no Brasil e Borém (1999) editou um livro onde estão descritas as contribuições do melhoramento de plantas para dezesseis espécies cultivadas além de três capítulos sobre grupos de espécies (forrageiras, florestais e frutíferas). Nesta mesma direção, Queiróz *et al.* (1999) editaram um livro que relata as contribuições do melhoramento de plantas e dos recursos genéticos no Nordeste brasileiro, considerando várias espécies olerícolas, frutícolas, grãos, oleaginosas, fibrosas e medicinais. Assim sendo, procurou-se, no presente capítulo, complementar o enfoque dado pelos autores mencionados, de modo a ampliar o conhecimento sobre a contribuição do melhoramento de plantas no Brasil.

2. AGRONEGÓCIO BRASILEIRO E SUAS IMPLICAÇÕES COM O MELHORAMENTO DE PLANTAS

O conceito de negócio agrícola ou agronegócio implica na idéia de cadeia produtiva com seus elos entrelaçados e sua interdependência, significando que a atividade agrícola extrapolou os limites físicos da propriedade (Brandão & Medeiros, 1998). A agricultura depende cada vez mais de insumos adquiridos fora da fazenda e a decisão de o que e quanto produzir está fortemente baseada no mercado. Portanto, o agronegócio compreende atividades econômicas ligadas a: a) insumos para a agricultura como sementes, mudas, fertilizantes, corretivos e defensivos; b) produção agrícola, compreendendo lavouras, pecuária, florestas e extrativismo, contemplando também os processos; c) agroindustrialização dos produtos primários; d) transporte e comercialização de produtos primários e processados. Dessa forma se depreende que o agronegócio inclui atividades antes da "porteira", dentro da unidade produtiva e depois da "porteira".

Como se pode observar, o melhoramento de plantas no passado ficou, em grande parte, confinado ao elo da produção dentro das fazendas e um pouco na transformação e processamento. Contudo, pouco foi dedicado aos aspectos da distribuição e do consumo final, isto é, ao mercado. No entanto, hoje é sabido, que os elos de transformação, distribuição e consumo representam a maior parte do valor da cadeia produtiva, e, portanto, podem representar um grande fator de interação com os ganhos que podem ser obtidos com o melhoramento de plantas propriamente dito, os quais são atingidos principalmente dentro das unidades produtivas ou fazendas. Por exemplo, a distribuição de renda na cadeia produtiva da amêndoa da castanha de caju, estimada em R$ 613 milhões no período de 1995/96, foi de 8%

para a parte agrícola, 20% para o setor industrial de beneficiamento da castanha e 72% para as organizações de mercado, que são externas e compreendem a distribuição e o consumo (Paula Pessoa & Leite, 1998). Estes valores tornam-se mais evidentes quando transformados em quantitativos financeiros para cada segmento, pois, a parte agrícola fica com R$ 49 milhões, o segmento industrial com R$ 122 milhões e o segmento de mercado com o restante, ou seja, R$ 442 milhões. De acordo com os mesmos autores, os segmentos agrícola e industrial empregam cerca de 36 mil e 16 mil pessoas, respectivamente. A parte de mercado é realizada principalmente nos Estados Unidos (80%), Canadá (10%) e o restante na Europa. Dessa forma o Brasil só internaliza 28% do faturamento com a venda da amêndoa da castanha de caju.

Os resultados obtidos com a distribuição de renda nos elos da cadeia produtiva da castanha do caju, demonstram que o melhorista tem um grande desafio quando planeja suas estratégias e rotas tecnológicas, pois, se adotar a estratégia clássica de elevar a produtividade de castanhas de caju, os produtores só irão se beneficiar de uma pequena fatia dos seus resultados, ao passo que ao promover a melhoria de amêndoas quanto aos aspectos de beneficiamento terá um aproveitamento adicional de 20% do segmento industrial. Porém, a grande fatia permanecerá com o mercado, pois, como Paula Pessoa & Leite (1998) mostram, o mercado paga preços diferenciados para os tipos de amêndoas que são classificadas em distintos tipos de acordo com a cor e tamanho. Por exemplo, o tipo com a melhor coloração (marfim pálido) e grandes (*special large whole* – SLW) recebe o índice 100, ou seja, tem a cotação máxima enquanto que amêndoas de tamanho inferior, mesmo de coloração ideal só atingem índice 64. Percebe-se que grande parte da ação do melhoramento do caju, quando se fez a obtenção de clones de caju de castanhas maiores, foi direcionada para o mercado, agregando valor ao produto. Os ganhos obtidos, porém, ficam fora do país uma vez que a rede de distribuição de amêndoas de alta qualidade é no exterior. Aliás, a participação dos consumidores e distribuidores na definição dos produtos que necessitam, implica que o melhorista deve considerar as preferências expostas pela sociedade para incluir caracteres importantes dentro das suas rotas tecnológicas.

Vários exemplos de cadeias produtivas de diferentes espécies importantes para a agricultura brasileira podem ser vistos em Castro *et al.* (1998). Em cada caso o melhorista poderá exercitar os desafios que o melhorista enfrentará para que os resultados do seu trabalho possam ser apropriados para os produtores e consumidores.

É importante também destacar o significado do agronegócio na geração de renda e riqueza no país. Quando se considera apenas o valor da produção agrícola, é estimado que o mesmo está situado ao redor de 10% do Produto Interno Bruto, estimado em US$ 750 bilhões (Silveira, 1997). Entretanto, quando se considera o negócio agrícola a participação está estimada em 32%, ou seja, US$ 240 bilhões, além de ser responsável por 36% das exportações brasileiras. Aqui está incluída a participação dos produtos oriundos do melhoramento de plantas através de cultivares melhoradas (sementes e mudas). Por exemplo, considerando-se a cadeia produtiva da fruticultura, aí incluída algumas olerícolas de frutos, pode-se ter uma idéia dos volumes produzidos (Tabela 1) e do valor da produção, incluindo-se apenas os valores da exportação brasileira (Tabela 2).

TABELA 1. Produção de frutas no Brasil no período de 1993 a 1995.

Frutas	Unidade	Anos		
		1993	1994	1995
Laranja	t	14.804.736	14.389.196	16.361.999
Banana	t	5.318.520	5.726.190	5.577.990
Abacaxi	t	1.053.606	1.385.370	1.330.587
Pêssego	mil frutos	1.290.430	1.361.874	1.498.668
Uva	t	798.883	807.520	836.545
Manga	t	716.129	767.363	820.763
Limão	t	649.183	631.800	5.894.528
Tangerina	t	582.284	607.920	599.323
Caqui	mil frutos	521.080	554.062	516.851
Melancia	t	441.472	447.963	763.236
Maçã	t	697.606	436.880	686.372
Abacate	t	323.485	348.989	318.809
Mamão	t	272.007	305.657	489.762
Figo	mil frutos	312.422	298.825	318.490
Goiaba	t	250.565	174.332	255.986
Melão	t	153.933	146.585	215.012

Fonte: Fernandes (1998)

TABELA 2. Valores da cadeia produtiva de frutos e olerícolas e o balanço entre os quantitativos de exportação e importação.

Produtos	Valor da exportação (milhões de dólares)	Valor da importação (milhões de dólares)	Saldos (milhões de dólares)
Frutas frescas	108,8	236,7	- 127,9
Frutas secas	0,3	43,4	- 43,1
Frutas cristalizadas e glaceadas	0,8	1,3	- 0,5
Frutos secos, castanhas e nozes	87,7	58,9	28,8
Suco de laranja	1007,0	0,8	1006,2
Outros sucos de frutas	51,0	13,6	37,4
Polpas de frutas	6,0	1,2	4,8
Geléias e doces em pasta	3,6	6,4	- 2,8
Frutas em conserva	6,6	23,6	- 17,0
Total	1371,8	385,9	985,9

Fonte: Fernandes (1998)

Na Tabela 2, observa-se que o valor total da produção de frutas exportadas, em suas diversas modalidades, chega a cerca de 1,4 bilhões de dólares. Este número será substancialmente aumentado se for adicionado o valor da produção destinada ao mercado interno.

É importante ressaltar que uma grande parte do valor da produção, mostrado na Tabela 2, é devida ao genótipo das principais espécies de fruteiras consideradas. A parcela mais significativa é proveniente dos *Citrus*, os quais foram extensivamente trabalhados no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em São Paulo. Os dados permitem inferir, dentro da ótica apresentada, que os gastos públicos com a pesquisa

no desenvolvimento de diversas cultivares de fruteiras foram mais que retornados com o desenvolvimento socioeconômico produzido, nas diferentes formas, como empregos, recolhimento de impostos, e várias outras formas de ganho. Considerando-se que o melhoramento de plantas tem um forte componente no valor final do fenótipo, ao se observar os valores da cadeia produtiva de frutas, pode-se inferir o grande significado econômico do melhoramento genético na composição da receita das principais cadeias produtivas da agricultura brasileira. Um exercício semelhante poderá ser elaborado para diversas cadeias produtivas, várias delas descritas em Castro *et al.* (1998).

Outro aspecto importante do melhoramento de plantas, dentro do contexto do agronegócio, diz respeito à competitividade de preços dos produtos agrícolas, hoje um fator de extrema importância para que os produtores consigam manter a atividade de produção, pois, com uma economia globalizada, onde os produtos podem vir de lugares os mais distantes e a preços, muitas vezes, artificialmente manipulados pelos países de origem, não raro obrigam os agricultores a abandonarem a produção de determinadas espécies. Dessa forma, a produtividade é um componente de grande significado para o agronegócio, pois permite aos produtores a remuneração adequada e os preços baixos para os demais elos da cadeia, especialmente para os consumidores que são os principais decisores de todo o processo, no qual o melhoramento genético vegetal está inserido. Entretanto, apesar de a produtividade de uma determinada espécie refletir o componente genotípico também está embutida uma parte ambiental que é outro componente de grande significado para a expressão do fenótipo. Este aspecto será examinado na próxima seção.

3. IMPORTÂNCIA DO AMBIENTE NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

A produção de qualquer planta depende basicamente do seu potencial genotípico e das condições ambientais em que está sendo desenvolvida, podendo tais fatores serem decompostos em dois grandes grupos, a saber: fatores imprevisíveis e fatores previsíveis. Os primeiros envolvem os dados climáticos (precipitação pluvial, temperatura do ar e solo, radiação solar, fotoperíodo e velocidade do vento) e os estresses bióticos como pragas e doenças. Nos segundos estão inseridas as práticas culturais, os tipos de solos e suas variações físicas e químicas, o teor de umidade de solo, particularmente, na agricultura irrigada entre outras. Adaptar as culturas aos ambientes nos quais serão cultivadas, deve ser uma grande prioridade dos produtores, e para tanto necessitam da participação efetiva dos melhoristas de plantas e dos fitotecnistas. Porém, essa é uma tarefa muito complexa em virtude do grande número de fatores envolvidos como mencionado, acrescida da imprevisibilidade das interações dos genótipos com os fatores ambientais. Por outro lado, na literatura corrente sobre os estudos de genótipos em diferentes ambientes a ênfase é dada para a produção de grãos (Hallauer & Miranda Filho, 1988; Borém, 1998; Paterniani, 1999), onde existem muitos estudos, capitaneados pelo milho. De um modo geral, é aceito, pelo menos para os grãos, que os genótipos mais heterozigotos sofrem menos os efeitos do ambiente do que os genótipos homozigotos. Teoricamente, os híbridos simples deverão apresentar maior interação com o ambiente do que genótipos de maior

heterozigosidade como os híbridos duplos e compostos. Entretanto, Costa (1976) fazendo um estudo envolvendo populações de milho de base genética ampla, híbridos duplos e híbridos simples em muitos ambientes dos Estados do Piauí e Maranhão mostrou que os híbridos simples foram tão estáveis quanto populações mais heterozigotas. Este comportamento indica que cada genótipo responde às variações de ambiente de modo diferente.

De fato, considerando um determinado ambiente, os genótipos ali cultivados podem encontrar o seu limite de adaptabilidade, pois se o estresse ambiental limitar a sua produtividade, é preciso procurar outros genótipos que sejam mais adaptados a este ambiente, sendo que em alguns casos, a depender a variabilidade genética, seja necessário buscá-la em outra espécie. Entretanto, algumas vezes genótipos tradicionalmente cultivados num ambiente podem apresentar adaptação em outros ambientes completamente diferentes, nunca antes pensado para seus cultivos. Por exemplo, o aspargo era normalmente cultivado em áreas subtropicais no Rio Grande do Sul, onde apresentava produtividades em torno de 2,5 t ha^{-1} (Augustin, 1999). Porém quando testado em condições irrigadas no semi-árido do Nordeste brasileiro, essa espécie passou a produzir cerca de 6 t ha^{-1}. Fato semelhante foi observado com a produção de palmito de pupunha (Flori, 1999), pois originalmente era cultivada em condições de alta precipitação pluvial na região amazônica e, posteriormente, se adaptou muito bem ao cultivo irrigado em condições semi-áridas, chegando a produzir cerca de 1,5 toneladas de palmito extra por hectare.

De acordo com Borém (1998) o ambiente é subdividido em macro e micro, isto é, um macroambiente é composto por uma série de microambientes. Deve-se examinar o ambiente para o qual está se desejando desenvolver uma cultivar decidindo se a mesma deve apresentar potencial máximo de produção em um espectro amplo de ambientes ou deve ser adaptada a ambientes específicos, o que pode ser medido em termos da magnitude da interação genótipo x ambiente, definida por Borém (1998) como a variação do desempenho relativo de dois genótipos de um ambiente para outro.

Essa questão é importante, pois obriga o melhorista a verificar, antecipadamente, quais os ambientes potenciais em que sua cultivar será implantada. Por exemplo, o cultivo de milho e soja era realizado nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Todavia, com o desenvolvimento de cultivares de milho adaptadas às condições dos cerrados brasileiros e de soja insensíveis ao fotoperíodo, as áreas de cultivo dessas duas espécies passaram a ter uma nova distribuição geográfica. De forma similar, a produção de fruteiras em ambientes irrigados do semi-árido brasileiro, acarretou na introdução de novas espécies em um ambiente para os quais os genótipos não haviam sido desenvolvidos. Este é o caso das cultivares de manga melhoradas como Tommy Atkins e Haden, das cultivares de uva Itália e Red Globe e, mais recentemente, das cultivares de uvas sem sementes como Perlette, Centenial, Thompson Sedless, Superior, entre outros casos. Situação semelhante ocorreu com a melancia Crimson Sweet, criada para as condições americanas e cultivada em todo o Brasil, inclusive nos perímetros irrigados do semi-árido. O coco anão verde e o caju, inicialmente, cultivados em condições de chuva, na faixa litorânea e tabuleiros costeiros do Nordeste do Brasil, passaram a ser cultivados, com sucesso, em condições irrigadas do semi-árido. Um exame minucioso poderá detectar muitos outros exemplos de cultivares

que estão sendo cultivadas em novos ambientes, no Brasil, para os quais não foram melhoradas geneticamente. Como conseqüência, é esperado que tais cultivares não estejam expressando o seu verdadeiro potencial em tais ambientes. Por exemplo, as cultivares de mangueira Tommy Atkins, Haden, Kensington entre outras inicialmente desenvolvidas para as condições subtropicais dos Estados Unidos e Austrália, apresentam problemas de frutificação nos meses de temperatura elevadas que ocorrem em áreas irrigadas do semi-árido, porque a temperatura afeta a viabilidade do pólen quando o florescimento ocorre nos meses mais quentes (Issarakraisila & Considine, 1992). O florescimento durante os meses mais quentes acontece em decorrência da necessidade de escalonamento da produção de manga ao longo do ano. Ainda mais, essas cultivares necessitam do uso de reguladores de crescimento a fim de que seja possível manejar o florescimento das mesmas de modo adequado (Souza & Assis, 1999; Costa & Assis, 1999). Contudo, o uso continuado de reguladores de crescimento poderá afetar o desempenho produtivo dos genótipos no futuro, bem como, poderá produzir resíduo dos fitorreguladores no solo com implicações sérias para o meio ambiente em geral. As cultivares de uvas sem sementes, apresentam situação similar apesar de terem alta demanda nos grandes centros consumidores, pois, não apresentam desempenho produtivo adequado em condições de cultivo irrigado no semi-árido brasileiro, uma vez que o tamanho das bagas, o número de bagas por cacho e o número de cachos por planta apresentam desempenhos insatisfatórios, em decorrência baixa fertilidade das gemas, necessitando do uso de fitohormônios. Mesmo assim, muitas vezes não é possível alcançar os padrões comerciais exigidos pelos produtores e consumidores. Novamente, o uso continuado de fitohormônios poderá não ser aceitável no futuro tanto por questões fitotécnicas como por questões ambientais.

Cultivares introduzidas em novos ambientes poderão também não apresentar desempenho satisfatório quanto à resistência a doenças e pragas. Como exemplo pode-se citar a cultivar de melancia Crimson Sweet suscetível aos principais estresses bióticos mais importantes para a cultura a saber: oídio, micosferela e três viroses, além de baixa produtividade. Vale lembrar que a cultivar nos Estados Unidos não apresenta nenhuma limitação quanto à resistência a doenças (Mohr, 1986), possivelmente devido a ausência desses estresses bióticos ou devido à ocorrência de raças diferentes dos mesmos no ambiente brasileiro.

As cultivares de cebola utilizadas comercialmente no Brasil também apresentam condições interessantes no contexto de cultivo em novos ambientes. As cultivares de cebolas baias piriformes, de maior conservação de bulbos, inicialmente eram cultivadas no Rio Grande do Sul e posteriormente foram trazidas para São Paulo, para serem empregadas em programas de melhoramento (Dias, 1970). No entanto, esse germoplasma quando introduzido no semi-árido irrigado, apresentou várias deficiências na formação de bulbos e ciclo mais longo quando comparado com cultivares de cebola tradicionalmente utilizadas pelos produtores locais. Cultivares de tomate industrial provenientes de programas de melhoramento dos Estados Unidos e da França também apresentaram grandes diferenças comportamentais quando cultivadas no Submédio São Francisco (Dias *et al.*, 1973).

Em um estudo mais minucioso Paterniani (1999) ao comparar a pluviosidade da cidade de Ames, Iowa, USA (42°N e 93°W) e a cidade de Piracicaba

(22°S e 47°W) verificou que o ambiente temperado é bem mais estável para a produção de milho do que o ambiente subtropical. Confrontando dados pluviométricos dos meses de julho e agosto, de uma série de 70 anos (1917 a 1987), observou que o desvio padrão no ambiente temperado, foi de 35,51mm e 40,74 mm, respectivamente para os meses considerados, enquanto que para o ambiente subtropical os valores foram 75,88mm e 94,10mm, respectivamente. Estes valores tenderão a se acentuar se for incluído o ambiente dos cerrados uma das principais fronteiras de produção de grãos do país.

Assim sendo, o desempenho observado para um determinado fenótipo num dado ambiente, caso o genótipo não seja adaptado ao mesmo, não será otimizado mesmo que se façam as correções do ambiente. Aliás, o ajuste do ambiente nem sempre é possível e mesmo quando possível, tem um custo adicional, seja pelo uso intenso de defensivos e/ou fitorreguladores, com todas as conseqüências possíveis. Além disso, nem sempre é possível atingir produtividade elevada, um dos pontos importantes para manter o produto com preços competitivos.

Entretanto, na sua forma mais simples, o fenótipo é a soma dos efeitos do genótipo mais os efeitos do ambiente. Como destacado por alguns autores e para determinadas espécies, o genótipo é responsável por cerca de 50% do fenótipo sendo os outros 50% provenientes das melhorias do ambiente, conforme relatado por Jensen (1978) para trigo e por Ramalho *et al.* (1990) para o milho. Vale a pena destacar que não se pode generalizar os resultados obtidos para o milho e o trigo para todas as espécies, porém, tais resultados são indicativos para se balizar as estimativas dos ganhos que podem ser atingidos com o emprego de cultivares adaptadas a determinados ambientes.

Pelo fato da produção agrícola brasileira estar concentrada em várias cadeias produtivas, envolvendo diversas espécies vegetais que foram trabalhadas em programas de melhoramento ao longo das últimas décadas, serão analisados os desempenhos de algumas cadeias produtivas. Daí, pode-se verificar os progressos obtidos e inferir a magnitude dos valores econômicos resultantes de alguns programas e com isso, aquilatar a dimensão do melhoramento de plantas para o crescimento da agricultura brasileira. Serão consideradas, a título de exemplo, três cadeias produtivas, a saber: grãos; olerícolas e fruteiras; escolhendo-se as espécies com os resultados mais significativos dentro de cada grupo para uma análise mais aprofundada da ação do melhoramento de plantas quanto aos reflexos na produção e produtividade.

4. AÇÕES DO MELHORAMENTO GENÉTICO EM ALGUMAS CADEIAS PRODUTIVAS

4.1 GRÃOS

Ao averiguar a produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo, as principais culturas produtoras de grãos alimentares do Brasil, verifica-se que tem ocorrido incremento na produção de grãos, durante a década de 90 (Tabela 3) como relatado por Pereira (1999). A participação do melhoramento genético no aumento da produção de grãos das espécies mencionadas é bastante diferenciada.

O trigo apesar de ter sido beneficiado com a criação de muitas cultivares de rendimentos superiores às cultivares mais antigas, tanto em termos de produtividade quanto em relação à adaptação a novos ambientes como os cerrados (Sousa, 1997), estratégias de mercado com países importadores e exportadores, não permitiram uma produção maior de trigo no Brasil (Bacaltchuk, 1998).

A cultura do arroz também foi beneficiada com a criação de muitas variedades para o cultivo em condições de sequeiro e em condições irrigadas, porém não houve aumento substancial na produção total de grãos.

O feijão é produzido em três macroambientes distintos, ou seja, o feijão das "águas", o feijão da "seca" ou "safrinha" no norte do Paraná, São Paulo, Triângulo Mineiro e Goiás; o feijão irrigado, com cultivo iniciado a partir da década de 80 com a utilização de pivô-central, em vários Estados do Sudeste e Centro-Oeste (Pereira, 1999). A produção de grãos de feijão, todavia, apresentou um pequeno aumento nos primeiros anos da década de 1990 e a partir daí estabilizou-se. É importante frisar que a produção de feijão envolve duas espécies, o *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro comum) e o *Vigna unguiculata* (feijão de corda), sendo a segunda espécie restrita a alguns Estados da região Nordeste e Norte do país. De acordo com Peloso *et al.* (1997) o feijoeiro comum representa cerca de 80% do total da produção de feijão, sendo que o maior destaque, em termos de produtividade, se deve ao cultivo irrigado (Tabelas 3 e 4), em virtude da alteração do ambiente, uma vez que as cultivares utilizadas praticamente são as mesmas desenvolvidas para os demais ambientes de cultivo do feijoeiro.

Contudo, observando-se a Tabela 3, nota-se um crescimento consistente na produção de grãos do milho e da soja. No caso do milho, apesar da criação de muitas cultivares com aptidões diversas (Fornasieri Filho, 1992) foi a criação do híbrido BR 201, tolerante à toxidez de alumínio, o qual foi lançado oficialmente em 1988 (Magnavaca *et al.*, 1991), associada a um processo de transferência de tecnologia por meio de uma franquia rural, aliás, a primeira do Brasil, onde um conjunto de vinte empresas produtoras de sementes de milho compuseram a UNIMILHO, que permitiu uma grande expansão da cultura do milho nos cerrados brasileiros (Ramalho & Vasconcelos, 1993). O melhoramento para tolerância ao alumínio tóxico, representou um grande avanço na expansão da cultura do milho nesse novo ambiente, amplamente explorado na década de 90 representando uma contribuição expressiva do

TABELA 3. Produção de grãos das principais culturas brasileiras durante a década de 90.

Ano	Milhões de toneladas					
	Arroz	Feijão	Milho	Soja	Trigo	Total
1990	8,0	2,1	22,3	20,1	3,3	55,8
1991	10,0	2,5	24,1	15,4	3,1	55,1
1992	10,1	2,6	30,8	19,4	2,7	65,6
1993	9,9	2,0	29,2	23,0	2,1	66,2
1994	10,5	3,0	33,2	25,1	2,1	73,9
1995	11,2	2,9	37,4	25,9	1,5	78,9
1996	10,0	2,7	32,4	23,2	3,2	71,5
1997	9,5	2,9	32,7	26,2	2,4	73,7

Fonte: Pereira (1999)

TABELA 4. Área e produtividade de feijão, no Brasil, durante o período de 1984 a 1997, considerando-se os três tipos de ambientes de cultivo.

Safra	Área (1.000 ha)			Produtividade (kg ha^{-1})		
	Águas	Seca	Irrigado	Águas	Seca	Irrigado
84/85	2.845,5	2.371,8	95,8	512	423	894
85/86	2.865,9	2.514,8	103,9	351	445	901
86/87	2.875,8	2.206,5	139,5	364	379	882
87/88	3.282,8	2.327,5	154,8	492	447	952
88/89	2.624,3	2.394,1	156,8	408	446	1087
89/90	2.491,3	1.981,4	207,4	444	468	960
90/91	2.974,9	2.262,1	205,9	465	492	1232
91/92	2.928,4	2.040,6	181,4	530	499	1256
92/93	2.323,8	1.355,8	205,6	578	629	1357
93/94	2.922,3	2.319,4	227,4	574	601	1308
94/95	2.622,6	2.195,7	177,8	529	597	1400
95/96	2.706,7	2.104,5	145,7	491	620	1395
96/97	2.482,8	2.236,6	161,1	563	638	1549

Fonte: Pereira (1999)

melhoramento de plantas no Brasil. Essa contribuição poderá ser significativamente ampliada, uma vez que estima-se que exista cerca de 200 milhões de hectares de cerrados, dos quais uma grande porcentagem é propícia para o cultivo das espécies consideradas, sendo que no momento, somente 20 milhões de hectares são cultivados (Leite, 1999), mostrando que existe uma ampla fronteira potencialmente explorável.

Dentro dessa cadeia produtiva, a soja tem tido uma grande participação na produção de grãos, especialmente nos cerrados, consistindo no exemplo mais expressivo na demonstração da contribuição do melhoramento de plantas no país. O crescimento da soja apresenta forte correlação com o porte e a produtividade e é função do período vegetativo o qual é encurtado onde a amplitude entre o dia mais curto e o dia mais longo é menor, como ocorre nas regiões tropicais (Almeida *et al.*, 1999). Por outro lado, foi encontrada variabilidade genética, em acessos do Banco de Germoplasma de Soja como, por exemplo, o acesso PI240664 que apresentava período juvenil longo, tornando-o assim insensível ao fotoperíodo. Esta característica foi transferida para cultivares comerciais como Tropical e Timbira. Mais tarde foram encontrados mutantes quanto às exigências em fotoperíodo, em variedades comerciais, os quais foram extensivamente utilizados em programas de melhoramento, visando criar variedades adaptadas ao cultivo em baixas latitudes (Almeida *et al.*, 1999).

De acordo com Sedyama *et al.* (1999) programas de melhoramento de soja devem enfocar os seguintes caracteres: adaptação quanto ao ciclo; hábito de crescimento; altura da planta e da inserção da primeira vagem; acamamento; deiscência das vagens; qualidade da semente; adaptação quanto ao nível de fertilidade do solo; resistência a doenças e pragas; aspectos qualitativos; tolerância a herbicidas; produtividade e período juvenil longo. Foi a criação de variedades com período juvenil longo que possibilitou a expansão da cultura para latitudes bem inferiores àquelas onde era normalmente cultivada antes da década de 80.

O grande avanço conseguido com o melhoramento da soja permitiu que o Brasil passasse de um país inexpressivo ao posto de segundo produtor mundial atendendo não só ao mercado interno como também ao mercado externo.

O programa de melhoramento de soja conduzido pela Embrapa Soja em colaboração com a Embrapa Meio Norte, sediado em Teresina-PI, desenvolveu e avaliou um conjunto de variedades adaptadas ao cultivo em baixas latitudes, como se mostra na Tabela 5. Essas variedades podem ser cultivadas tanto no Nordeste quanto no Norte do país, em regiões de baixas latitudes.

A criação de várias cultivares disponibilizadas aos produtores instalados nos cerrados brasileiros, reforça que o melhoramento de soja foi muito proativo no desenvolvimento de cultivares e em conseqüência, na expansão da área cultivada. Evidentemente, muitos outros caracteres foram aprimorados e muitas cultivares foram desenvolvidas e lançadas no mercado, como se pode observar na relação de variedades apresentadas por Sedyama *et al.* (1999).

A disponibilidade de variedades adaptadas às baixas latitudes aliada à melhoria do sistema de cultivo da soja, permitiu, nos últimos anos, um crescimento considerável na produção de grãos nos Estados do Maranhão e Piauí, como é possível verificar na Tabela 6. A área de cerrado nesses Estados é estimada em 21,7 milhões de hectares, dos quais, 6 milhões são agricultáveis (Castro, 1997). Considerando um aumento da área cultivada, a partir da série histórica da Tabela 6, Frota & Campelo (1999) estimam que, mantidas as tendências atuais, em 2003 a região Meio Norte estará com uma área de cerca de um milhão de hectares de soja movimentando cerca de US$ 400 milhões por ano.

As cultivares de soja adaptadas às baixas latitudes também estão sendo implementadas em outros Estados como Tocantins, Pará e outros Estados da região Norte. Assim sendo, a verdadeira contribuição do melhoramento de soja, com a criação de cultivares insensíveis ao fotoperíodo poderá ser substancialmente ampliada.

TABELA 5. Cultivares de soja adaptadas ao cultivo em baixas latitudes de acordo com a cronologia de lançamento.

Designação da cultivar	Ano de lançamento	Designação da cultivar	Ano de lançamento
Tropical	1980	Embrapa 30 - Vale do Rio Doce	1994
Timbira	1982	Embrapa 31 - Mina	1994
BR 10 - Teresina	1983	Embrapa 33 - Cariri RC	1994
BR 11 - Carajás	1983	Embrapa 34 - Teresina RC	1994
BR 27- Seridó	1987	Embrapa 63 - Mirador	1996
BR 28 - Cariri	1987	MA/BRS 64 - Parnaíba	1997
Nova Tropical	1988	MA/BRS 65 - Sambaíba	1997
BR/EMGOPA 312 - Potiguar	1989	MA/BRS 163 - Patí	1998
BR 35 - Rio Balsas	1989	MA/BRS 164 - Seridó RCH	1998
Embrapa 9 - Bays	1991		

Fonte: Campelo *et al.* (1999)

TABELA 6. Evolução da área cultivada e da produtividade da soja no Meio Norte do Brasil no período de 1980 a 1997.

Ano	Piauí		Maranhão		Região Meio Norte	
	Área ha	Produtividade t ha^{-1}	Área ha	Produtividade t ha^{-1}	Área ha	Produtividade t ha^{-1}
1980	-	-	80	1200	80	1200
1981	-	-	66	1697	66	1697
1982	10	2000	215	2000	225	2000
1983	-	-	430	1132	430	1132
1984	546	1430	4263	1784	4809	1607
1985	606	1314	10000	900	10666	1107
1986	740	1459	8700	1563	9400	1511
1987	-	-	8500	1035	8500	1035
1988	200	1000	16200	1802	16400	1401
1989	330	1657	21900	1698	22230	1677
1990	1560	580	16000	418	17560	499
1991	1900	1500	4600	1804	6500	1652
1992	1590	452	21100	1199	22690	825
1993	1860	1670	42700	2136	44560	1903
1994	6800	1794	62800	2200	69600	1997
1995	13600	1853	91700	1848	105300	1850
1996	10251	2255	89100	2240	99351	2247
1997	18075	2548	129090	1988	147165	2268

Fonte: Anuário Estatístico do Brasil, 1980/1997

Para concluir os comentários sobre a cadeia produtiva de grãos, deve-se ressaltar que o crescimento da agricultura brasileira sempre foi analisado apenas pela produção de grãos com a divulgação da produção de safras recordes nessa cadeia produtiva. Entretanto, outras cadeias produtivas apresentaram crescimento considerável nas últimas décadas, com participação expressiva do melhoramento de plantas e, que portanto, têm contribuído com o crescimento do agronegócio brasileiro. As cadeias produtivas das essências florestais, das fibras, das olerícolas, das fruteiras, entre outras, têm apresentado um desempenho significativo, em muitos casos transformando o país de importador a exportador. Para exemplificar a contribuição do melhoramento genético serão analisadas as cadeias produtivas das olerícolas e das fruteiras.

4.2 OLERÍCOLAS

O grupo de olerícolas compreende uma grande quantidade de espécies, as quais são cultivadas em diferentes partes do país e em variados volumes de produção. A cadeia produtiva desse grupo caracteriza-se por utilizar áreas reduzidas, intensa mão-de-obra, ambientes relativamente controlados, exceto, em alguns casos, quanto às questões climáticas, muitas hortaliças são cultivadas em casa de vegetação, principalmente no Sul e Sudeste, permitindo que os genótipos expressem ao máximo o potencial. Na Tabela 7 constam os volumes e os valores da produção das principais olerícolas, no ano de 1987.

TABELA 7. Volume e valor da produção das principais olerícolas no Brasil em 1987.

Cultura	Quantidade 1.000 t	Valor US$ 1.000	Cultura	Quantidade 1.000 t	Valor US$ 1.000
Tomate	2043	359,000	Beterraba	76	18,190
Batata	2343	334,900	Quiabo	42	16,250
Batata-doce	747	98,360	Morango	13	16,150
Cebola	857	97,040	Ervilha (vagem)	18	13,320
Alho	76	84,310	Melão	58	11,680
Cenoura	294	69,080	Jiló	35	10,430
Pimentão	118	63,520	Couve	24	10,180
Melancia	1349	57,040	Mandioquinha-salsa	19	10,070
Abóbora	217	42,850	Berinjela	36	9,390
Chuchu	249	41,200	Agrião	15	8,140
Vagem	70	39,160	Milho-verde	99	7,832
Pepino	114	31,150	Espinafre	13	4,490
Alface	91	30,380	Salsa	8	3,930
Repolho	317	20,790	Brócolos	14	3,3340
Abobrinha	81	20,410	Cará	9	1,480
Couve-flor	73	19,620	Rabanete	5	1,330
Inhame	74	19,360	Outras	505	77,671
TOTAL	9113	1428,170		989	223,867

Fonte: Cobbe & Jabuonski (1993)

A produção de hortaliças no Brasil, em 1997, foi de 12.782 mil toneladas[1] implicando que o crescimento anual entre 1987 e 1997 foi um pouco inferior a 2,5% ao ano, considerando-se as espécies olerícolas listadas na Tabela 7.

O melão apresenta uma área cultivada de 12.200 hectares no país, dos quais 9.800 estão localizados em cinco Estados do Nordeste com uma produção de cerca de 244 mil toneladas, portanto superior ao volume de produção esperado com base no crescimento médio das olerícolas observadas na Tabela 7. O crescimento da produção ocorreu com a expansão da cultura no semi-árido irrigado com os híbridos de melões amarelos como o Gold Mine, tanto para o mercado interno como para o mercado externo (Dias *et al.*, 1998). Este híbrido não foi desenvolvido para as condições do semi-árido e apesar de apresentar uma boa produtividade tem apresentado baixo de teor de açúcar, uma das principais características de qualidade dos frutos de melão.

A melancia apresenta uma área de produção estimada ao redor de 70 mil hectares com um agronegócio estimado em cerca de R$ 300 milhões anuais. O cultivo é disperso em vários Estados do país e, diferentemente do melão, não tem apresentado modificação no volume de produção ao longo dos últimos anos, tendo a produção baseada na cultivar Crimson Sweet, que foi desenvolvida para as condições dos Estados Unidos e em poucas cultivares outras, também americanas ou japonesas. Estudos recentes, no entanto, têm mostrado que o Nordeste brasileiro é um centro de diversidade secundário para a melancia (Romão, 1995), tendo-se encontrado uma grande variação genética para características de fruto e resistência a doenças (Dias,

[1]VILELA, N. J. (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF). Comunicação pessoal, 1999.

1993; Ferreira, 1996; Souza *et al.*, 1999). É provável que a síntese de híbridos produtivos, com diferentes padrões de frutos e sem sementes possa influenciar o agronegócio da melancia no país.

O melhoramento de plantas desenvolveu uma grande quantidade de cultivares das principais olerícolas, como descrito por Giordano (1991). No caso das abóboras (*Cucurbita maxima*, *C. moschata* e *C. pepo*) foram desenvolvidas 13 cultivares em diversas instituições de pesquisa e desenvolvimento. O mesmo autor enumera 11 cultivares de alface (*Latuca sativa*) e 15 cultivares de batata, destacando as características de cada cultivar, especialmente resistência a doenças. Para a berinjela foram listados dois híbridos, sendo um bastante antigo, o F100 resistente a doenças e o híbrido Ciça, que apresenta maior amplitude de resistência a doenças. São citadas 15 cultivares de cebola, sendo seis da série IPA, atualmente Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. A cebola é produzida, principalmente nos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, perfazendo um total de aproximadamente 70 mil hectares.

Vale salientar, que o programa de melhoramento de cebola no IPA continua bastante ativo, sendo que no momento existe grande aceitação da cultivar de cebola IPA 10 que caracteriza-se por possuir bulbos roxos, boa conservação pós-colheita, resistência ao mal de sete voltas, causado pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e alternaria, causado por *Alternaria porri* (Costa *et al.*, 1999). Os mesmos autores descrevem várias outras cultivares de cebola disponíveis e em processo de difusão pelo país. As cultivares de cebola criadas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária são mais produtivas, possuem bulbos que apresentam maior conservação pós-colheita, maior nível de resistência às doenças e às pragas presentes no Vale do São Francisco, além de serem mais adaptadas às condições de temperatura prevalecentes nessa região (Costa *et al.*, 1999).

Quanto às brássicas, Giordano (1991) descreve quatro cultivares de brócolos, adaptadas a diferentes épocas de cultivo e resistentes à *Xanthomonas campestris*; 12 cultivares de couve-flor adaptadas a diferentes ambientes de cultivo, principalmente em temperaturas mais elevadas, como ocorre com a cultivar Vitória de Verão, que pode ser cultivada em temperaturas em torno de 28°C a 30°C, superiores às temperaturas que ocorrem nas áreas de cultivos das regiões Sul e Sudeste; e seis cultivares de repolho. Para o feijão vagem são mencionadas 11 cultivares, destacando-se principalmente a resistência a doenças como principal característica das mesmas. Também são listadas 13 cultivares de pepino, distintas em relação às várias características, porém, resistentes a doenças e 11 cultivares de pimentão resistentes às viroses.

No caso do tomate, são citadas 12 cultivares sendo a maioria pertencente ao grupo de tomate de mesa e duas cultivares destinadas ao mercado de processamento industrial. A característica marcante das cultivares de tomate também é a resistência a doenças da parte aérea e de solo.

Vale enfatizar, que as duas cultivares de tomate industrial mencionadas por Giordano (1991), são a IPA 5 e a IPA 6, desenvolvidas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, as quais chegaram a cobrir cerca de 60% da área cultivada de tomate no Vale do São Francisco, na década de 80 a 90 (Espinoza, 1991). Aliás, a

produção de tomate industrial no Vale do São Francisco com o emprego de cultivares específicas, adaptadas às condições ambientais da região, como, por exemplo, das cultivares IPA 5 e IPA 6, representa um exemplo significativo da contribuição do melhoramento de plantas no Brasil, pois a região chegou a produzir mais de 278 mil toneladas de frutos na década de 1980, das quais foram exportadas mais de 30 mil toneladas de polpa de tomate, o que gerou uma receita de exportação de cerca de US$ 40 milhões no ano de 1988 (Espinoza, 1991). O exemplo do tomate industrial no Submédio São Francisco ilustra a contribuição do melhoramento de plantas no incremento da cadeia produtiva das olerícolas no país.

Quanto à cenoura, estão disponíveis no mercado cinco cultivares. Destas, vale destacar a cultivar Brasília, desenvolvida pela Embrapa Hortaliças e que apresenta resistência à requeima das folhas causada por *Alternaria dauci*. Como salientado por Vilela[2], em 1998 a produção de cenoura no Brasil chegou a cerca de 720 mil toneladas, em conseqüência da difusão da cultivar Brasília, que proporcionou a redução do uso de agroquímicos, aumento de produtividade e da renda líquida dos produtores. A cultivar de cenoura Brasília permitiu também a implantação dessa olerícola em novos ambientes e, por conseguinte, eliminando a entressafra de produção e contribuindo ainda para a diminuição dos custos pagos pelos consumidores. Importante enfatizar que o incremento na produção de cenoura, com a disseminação da cultivar Brasília foi muito superior ao crescimento médio de olerícolas, estimado a partir da Tabela 7, situado em torno de 2,5% ao ano, pois representou um incremento ao redor de 10% ao ano, entre 1987 e 1998, demonstrando assim, uma grande contribuição do melhoramento genético para o crescimento da produção dessa olerícola no país.

O exemplo do tomate industrial no Vale do São Francisco também ilustra como o sucesso do melhoramento de plantas depende de muitos outros fatores que estão fora dos limites da propriedade, porque apesar do sucesso das cultivares de tomate IPA, no final da década de 1990 a cultura do tomate industrial nessa região começou a enfrentar sérios obstáculos ao seu desenvolvimento e até mesmo à sua manutenção, especialmente devido à concorrência com a produtividade da fruticultura tropical, que começava a despontar na região, passando a integrar uma cadeia produtiva já desenvolvida em outras regiões do país e resultando em um componente significativo do agronegócio brasileiro, inclusive contribuindo para que a cultura do tomate industrial se deslocasse para os cerrados brasileiros. Essa cadeia será discutida a seguir.

4.3 FRUTEIRAS

A cadeia produtiva da fruticultura representa uma parcela preponderante do agronegócio brasileiro. Como mostrado anteriormente (Tabela 2), a cadeia produtiva da fruticultura aliada à cadeia produtiva das olerícolas, resultará em uma cadeia produtiva de hortifruticultura de grande potencial econômico, já que ao acrescentar essa nova cadeia produtiva o valor deverá duplicar. Os dados da Tabela 2 ainda indicam os segmentos da cadeia produtiva que apresentam possibilidades de expansão para atender ao mercado interno, surgindo novas perspectivas para o uso de cultivares específicas, como no caso das frutas secas e das frutas em conserva, onde o Brasil é dependente do mercado externo, para o seu abastecimento.

[2]VILELA, N. J. (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF). Comunicação pessoal, 1999.

O papel do melhoramento de plantas nessa cadeia se reveste de grande importância, apesar da dificuldade em desenvolver novas cultivares de plantas perenes, como ocorre com a maioria das fruteiras, embora algumas delas iniciem a frutificação em um período menor de tempo como ocorre com a acerola e o maracujá. O número de espécies agrupadas na cadeia produtiva da fruticultura, à semelhança das olerícolas, é bastante elevado. Assim, serão destacadas somente algumas espécies, a fim de exemplificar a contribuição do melhoramento de plantas na produção dessa cadeia produtiva.

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) é uma fruteira que vem sendo cultivada no país, em uma área de cerca de 5 mil hectares distribuídos em vários Estados do país, seja em condições de chuva ou com irrigação (Gonzaga Neto, 1999). Os frutos são destinados ao processamento de polpa, fabricação de suco e para extração de vitamina C. Porém, não se dispõe de cultivares melhoradas, uma vez que os plantios foram feitos a partir de sementes provenientes dos campos de produção comercial. Contudo, recentemente foi criada a cultivar Sertaneja BRS 152, que apresenta produtividade de até 60 t ha^{-1}, em condições irrigadas, com produção distribuída em seis a sete meses e um conteúdo de vitamina C superior a 1500 mg por 100 g de polpa (Gonzaga Neto, 1999). Quanto ao teor de vitamina C, Paiva *et al.* (1999) encontraram uma variabilidade expressiva em uma determinada população, chegando até 2.494 mg por 100 g de polpa.

O umbuzeiro (*Spondia tuberosa* Arr. Cam.) ocorre naturalmente na caatinga do Nordeste brasileiro (Giacometti, 1993), existindo uma ampla variabilidade genética nas populações naturais as quais são exploradas através do extrativismo para obtenção dos frutos, destinados à fabricação de sucos e processamento de polpa, sendo, geralmente, comercializados para consumo *in natura*. Santos *et al.* (1999) fizeram uma prospecção nas áreas de ocorrência da espécie, verificando grande variação em relação a alguns caracteres, especialmente para características do fruto. Destacaram-se os acessos coletados em Anagé e América Dourada no Estado da Bahia, com frutos, que em média, pesam 87 e 85 g, respectivamente. Os teores de sólidos solúveis foram superiores a 12,0°Brix. Os acessos coletados em Janaúba e Lontra no Estado de Minas Gerais também apresentaram frutos, que em média, pesam 85 e 96 g e teor de açúcar médio de 10,0°Brix. Esses acessos foram propagados vegetativamente e estão sendo avaliados no Banco de Germoplasma de Umbuzeiro *in vivo* da Embrapa Semi-Árido a fim de que alguns deles sejam liberados como cultivares para plantios comerciais que visem a produção de frutos para consumo *in natura* para serem comercializados à semelhança da ameixa.

A área de plantio comercial do abacaxi engloba cerca de 55 mil hectares, dos quais 83% estão concentrados nos Estados da Paraíba, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo (Cabral *et al.*, 1999). As principais cultivares implantadas no Brasil foram introduzidas como a Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen e Española Roja, sendo que a primeira é a mais plantada no mundo. Em nosso país a cultivar mais utilizada é a Pérola, principalmente nos Estados do Nordeste. Como se observa, o número de cultivares é bastante limitado, tornando necessário a ampliação da base genética com a criação de novas cultivares. Entretanto, no caso das fruteiras perenes, em grande parte multiplicadas vegetativamente, acessos introduzidos têm constituído grande parte das cultivares utilizadas comercialmente.

No caso do abacaxi, além das cultivares introduzidas antigamente, recentemente chegou da China um acesso que caracteriza-se por apresentar frutilhos ou gomos facilmente separáveis, que no Instituto Agronômico de Campinas-SP foi realizada a multiplicação e liberação de uma cultivar designada de IAC gomo-de-mel (Guimarães, 1999).

Outra fruteira tropical amplamente cultivada no Brasil é a banana. Em 1997 a área cultivada foi de cerca de 515 mil hectares, distribuídos em todo o país. Na região Sul, as cultivares Nanica e Nanicão representam cerca de 70% da área plantada, enquanto que no Nordeste, predominam as cultivares do grupo Prata enquanto na região Centro-Oeste predomina a cultivar Maçã. Várias cultivares são utilizadas no mercado interno, porém, foi introduzida a cultivar Grande Naine que tem apresentado uma boa produção, além de ser um tipo aceito no mercado externo. Atualmente, foi desenvolvida a cultivar Pioneira que está em processo de difusão (Silva *et al.*, 1999).

A mangueira ocupa uma área cultivada no Brasil de 57,1 mil hectares, dos quais 49,6% estão na região Sudeste e 42,3% na região Nordeste do Brasil, sendo que 88% dos frutos exportados, estimados em US$ 28,7 milhões, provêm desta última região (Pinto & Ferreira, 1999). Os plantios comerciais dessa fruteira no país, são constituídos por 75% da cultivar Tommy Atkins, concentração esta ainda maior nos perímetros irrigados do Nordeste brasileiro. Todavia, esta cultivar foi desenvolvida para as condições da Flórida - EUA e introduzida no Brasil na década de 70 como também a cultivar Haden (Donadio, 1996). Observa-se que existe grande vulnerabilidade nos cultivos comerciais, uma vez que apenas duas cultivares são responsáveis por mais de 80% da cultura implantada no país, podendo ser dizimada por uma nova praga ou doença. Além deste aspecto, as duas cultivares apresentam suscetibilidade a doenças e são de difícil manejo, com vistas ao escalonamento da produção ao longo do ano, apresentando problemas quanto à regularidade da oferta do produto para o mercado consumidor. Portanto, torna-se necessário dispor de cultivares que floresçam em diferentes épocas do ano, inclusive em épocas de temperaturas mais elevadas como ocorre nos cultivos da região semi-árida.

A Embrapa Cerrados, localizada em Brasília, vem desenvolvendo um programa de melhoramento, o qual já disponibilizou duas cultivares de mangas, a Roxa Embrapa 141 e Alfa Embrapa 142, além de dispor de um grande número de combinações híbridas em processo de avaliação para a produção de novas cultivares que sejam resistentes aos principais estresses da cultura, bem como, apresentem melhor adaptação às condições de cultivo irrigado, principalmente no que se refere ao florescimento em diferentes épocas do ano, sem necessidade de utilização de fitohormônios reguladores. Existe grande variabilidade genética nos diversos Bancos de Germoplasma de Mangueiras, localizados em diversas partes do mundo, sendo que no Brasil já estão documentados mais de 400 acessos, embora exista a possibilidade de ocorrência de duplicatas, uma vez que grande parte das denominações dos acessos são feitas a partir dos nomes adotados pelos produtores (Pinto & Ferreira, 1999). O agronegócio da mangueira no Brasil, contudo, está fundamentado nas cultivares introduzidas.

A introdução de novas cultivares também causou grande impacto no agronegócio da maçã. No Brasil, no início da década de 70 a produção nacional era de 1.400 toneladas, tendo crescido substancialmente nas décadas de 80 e 90, chegando

em 1997, a cerca de 669 mil toneladas, sendo que 94% desta produção vem dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e o restante, dos Estados do Paraná e São Paulo (Borges Jr., 1998). O preço médio da tonelada de maçã, no período 1985-1995 foi de US$ 994,2 (Maçã, 1998) indicando que o valor da produção brasileira está estimado em cerca de US$ 630 milhões/ano.

No início da década de 70, quase toda a demanda nacional de maçã era importada, principalmente da Argentina, cujas cultivares apresentavam cores vistosas e aroma forte, porém, não apresentavam bom sabor. Posteriormente, foram introduzidas duas cultivares, a Gala de origem neozelandesa, mais preferida pelos europeus e a Fuji, de origem japonesa e mais preferida pelos americanos. Ambas tiveram grande aceitação dos consumidores brasileiros, embora possuam frutos de tamanhos menores e não apresentem as características das antigas cultivares de cor externa e aroma. Essas duas cultivares ocupam hoje cerca de 80% da área cultivada de maçã do país. A expansão da cultura também foi favorecida pelas práticas de conservação pós-colheita que permitem armazenar os frutos por até oito meses, em condições de atmosfera controlada (FNP Consultoria & Comércio, 1996).

O programa de melhoramento da maçã, com a introdução das cultivares Fuji e Gala, apresentou uma grande contribuição ao agronegócio brasileiro. Contudo, novas ações de melhoramento genético deverão ser realizadas visando encontrar fontes de resistência à mancha foliar causada por *Colletotrichum* sp. para a cultivar Gala e à podridão do fruto causada por *Botryosphaeria* sp. para a cultivar Fuji, pois são doenças que causam sérios prejuízos à produção de frutos das duas cultivares. Além das doenças mencionadas ocorrem doenças e pragas que atacam os porta-enxertos (Petri, 1998). O melhoramento deve considerar também os aspectos de cor externa dos frutos e aroma. A maçã necessita de temperaturas baixas durante o período de dormência, sendo que diferentes cultivares necessitam de 750 a 1.250 horas de frio abaixo de 7,2°C para apresentarem uma boa frutificação (Petri, 1976). A busca de clones com adaptação às exigências climáticas para a quebra de dormência sem o uso de fitorreguladores, deverá ser uma prioridade uma vez que a sociedade está cada vez mais exigente quanto à qualidade dos alimentos e às questões ambientais.

A contribuição do melhoramento para o agronegócio de fruteiras pode ser melhor exemplificada com a cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Para se ter uma idéia da importância da cultura, são mostrados dados de área colhida e dos rendimentos de castanha nos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, os principais produtores de caju (Tabela 8).

A cadeia produtiva do caju é formada por uma grande quantidade de produtos (Paula Pessoa & Leite, 1998), destacando-se a castanha (o verdadeiro fruto) da qual se extraem a amêndoa da castanha do caju (ACC), o líquido da casca da castanha do caju (LCC) e o pseudofruto (o pedúnculo) que produz vários produtos, sendo o mais importante o suco. A exportação desses três produtos vem crescendo significativamente, desde o ano de 1990, chegando em 1996 ao valor de US$ 171,7 milhões. Ainda, segundo os mesmos autores, a produção total da amêndoa, no ano agrícola 95/96, foi de 158.770 t. Levando-se em conta os valores dos segmentos agrícola, processamento e mercado chega-se a um valor total de US$ 854,5 milhões (Paula Pessoa & Leite, 1998).

TABELA 8. Área colhida e rendimento de castanha de caju nos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte no período de 1976 a 1996.

Ano	Ceará		Piauí		Rio Grande do Norte	
	Área ha	Rendimento kg ha^{-1}	Área ha	Rendimento kg ha^{-1}	Área ha	Rendimento kg ha^{-1}
1976-79	81.120	592	11.026	356	34.495	246
1980-83	124.699	364	22.958	301	49.801	145
1984-87	223.152	231	86.349	325	56.517	125
1988	262.511	250	121.052	205	66.444	568
1989	263.221	222	159.317	189	91.940	514
1990	267.151	195	168.155	142	116.536	199
1991	295.719	257	192.155	224	128.800	441
1992	324.065	139	212.871	120	127.746	204
1993	327.474	68	233.106	128	128.724	78
1994	326.740	210	191.093	171	102.852	363
1995	332.882	243	201.324	234	113.293	318
1996	345.546	253	207.767	192	102.852	362

Fonte: Paula Pessoa & Leite (1998)

Com o avanço do programa de melhoramento foram desenvolvidos e avaliados clones (conjunto de indivíduos originados de um genótipo comum, por isto mesmo com as mesmas características genéticas) de cajueiro anão precoce, o que culminou com a recomendação da série de clones CCP (Clone de Cajueiro de Pacajus). Foram liberados os clones CCP 06, CCP 76 no ano de 1983 e CCP 09 e CCP 1001 no ano de 1987, todos do tipo anão precoce, para o plantio comercial (Barros *et al.*, 1984; Almeida *et al.*, 1993; Barros & Crisóstomo, 1995). Como conseqüência, a produtividade de castanha saltou de 214 kg ha^{-1} (Tabela 8) para cerca de 1.200 kg ha^{-1}, nos pomares que utilizam clones melhorados em cultivo de sequeiro. Constatou-se, entretanto, que a base genética desse material é estreita, como resultado do baixo número de plantas introduzidas, originadas de um único local, o Sítio Furnas, no município de Maranguape-CE (Barros *et al.*, 1999). Esta é uma situação indesejável não só pelas dificuldades para obtenção de novos ganhos com a seleção, mas também pelos riscos impostos pela vulnerabilidade genética. Para ampliar a base genética dos caracteres de interesse agroindustrial, a estratégia tem sido a introdução de novos genótipos, selecionados em plantios feitos por sementes assim como a seleção de plantas em populações segregantes, seguida da formação de novas populações, com a recombinação genética pelo método do policruzamento, além da hibridação artificial entre plantas superiores do tipo anão precoce (Barros & Crisóstomo, 1995).

Mais recentemente, tem-se dado atenção ao caju cultivado no ambiente irrigado, incluindo o aproveitamento, também, do pedúnculo para o consumo *in natura*. A seleção está orientada para plantas com características de porte baixo para facilitar a colheita manual; pedúnculo com boas características de coloração, sabor, textura, maior período de conservação, consistência e teor de tanino adequados às preferências do consumidor; castanha de tamanho e peso adequados (≥10 g); facilidade de destaque do pedúnculo; rendimento (≥ 28%); facilidade na despeliculagem;

coloração dentro dos padrões internacionais; e amêndoas resistentes ao quebramento. Na fase de avaliação dos clones, recomenda-se testá-los tanto em condições irrigadas como de sequeiro e em diferentes ecossistemas. Os clones em avaliação apresentaram produtividade de pedúnculo variando entre 22,8 e 34,7 t por hectare, quando cultivados sob irrigação.

Assim, comparando-se a situação da cajucultura baseada em pomares comerciais, provenientes de mudas obtidas a partir de sementes com produtividade de castanha de caju um pouco acima de 200 kg ha^{-1} (Tabela 8), com a produção de mais de uma tonelada de castanha dos clones melhorados em condições de sequeiro e de até três toneladas em condições irrigadas, pode-se avaliar a contribuição da liberação dos clones de cajueiros anões melhorados para o agronegócio brasileiro. Acrescente-se, ainda, o valor agregado que está sendo adicionado, utilizando-se os clones anões, com a exploração do pedúnculo para consumo *in natura* ou para a indústria de sucos. É, pois, o exemplo mais significativo na cadeia produtiva das fruteiras.

5. PERSPECTIVAS

A contribuição do melhoramento de plantas para a agricultura brasileira tem sido expressiva, como se detalhou nas seções anteriores. Contudo, deve-se fazer uma apreciação dos cenários que poderão ser esperados quanto a novas contribuições nessas ou em outras cadeias produtivas.

Vários aspectos necessitam ser enfocados para fundamentar as análises dos cenários. Em primeiro lugar deve-se levar em conta que a execução de programas de melhoramento de plantas no Brasil tem sido, e não existem indícios fortes que a situação vai mudar, uma atividade predominantemente do setor público, com algumas exceções como a soja e outras poucas culturas, onde existem empresas privadas que estão investindo no setor. Porém, com a aprovação da lei de proteção de cultivares no Brasil, poderá haver mudanças substanciais.

Por outro lado, as atividades de melhoramento necessitam, para que sejam alcançados resultados consistentes, que existam continuidade de ações, que sejam utilizados métodos de trabalho atualizados e que exista uma transferência de tecnologia apropriada. Entretanto, não se vislumbra que existam grandes mudanças na disponibilidade de recursos financeiros do setor público para apoiar a condução de programas de melhoramento de plantas. Assim sendo, deve-se otimizar os recursos humanos, materiais e financeiros disponíveis.

O crescimento do número de melhoristas deverá seguir a tendência normal verificada nas duas últimas décadas, onde o setor público vem absorvendo alguns profissionais da área. Todavia, os melhoristas do setor público, especialmente de órgãos estaduais e federais de pesquisa, poderão aumentar a produtividade por meio de parcerias estratégicas com Universidades, especificamente com os professores dos cursos de Pós-Graduação da área de Melhoramento de Plantas e áreas afins, visando aprofundar conhecimentos básicos e aplicados, como por exemplo com o estudo de germoplasma e das potencialidades genéticas de novas populações segregantes.

No que tange ao uso de métodos atualizados, além de novos conhecimentos para modificação nos métodos de melhoramento clássicos aplicados às diversas espécies

de plantas, torna-se necessário um maior aprofundamento para os melhoristas no que se refere a área da Biologia Molecular e Biotecnologia porque estão sendo disponibilizadas novas ferramentas em programas de melhoramento de plantas, principalmente, no caso de plantas perenes. Os marcadores genéticos moleculares, por exemplo, têm sido extensivamente estudados em várias áreas de aplicação como a seleção de indivíduos resistentes a patógenos e em programas de pré-melhoramento que possibilitam a caracterização molecular de acessos de Bancos de Germoplasma, obtenção de coleções nucleares, identificação de grupos heteróticos entre outros. Ferreira & Grattapaglia (1998) fazem uma abordagem ampla da aplicação de técnicas moleculares em programas de melhoramento. As técnicas biotecnológicas também deverão ser empregadas em programas de recursos genéticos, inclusive na manutenção *in vitro* de germoplasma, no pré-melhoramento e no melhoramento. Poderão também serem utilizadas para a seleção *in vitro* de alguns fatores abióticos, como por exemplo, tolerância ao alumínio tóxico, chegando-se ao desenvolvimento de cultivares transgênicas, apesar da grande controvérsia que ainda ocorre no momento, pela falta de informação em algumas situações e, principalmente devido a grandes conflitos na disputa de potenciais mercados por empresas transnacionais. Assim, a biologia molecular deverá ter seu uso incrementado pelos melhoristas, necessitando para tal que se estabeleçam parcerias estratégicas entre os profissionais das diversas áreas afins.

A transferência dos produtos do melhoramento de plantas para os produtores também deverá ser objeto de análise, pois, além do processo normalmente estabelecido de produção de sementes e mudas pelo setor privado nacional para as espécies de reconhecido volume comercial, em áreas bem estabelecidas, a criação de novas formas de atendimento aos produtores, principalmente para a distribuição de novas cultivares, deverá ser intensificada, a exemplo da distribuição dos híbridos de milho tolerantes ao alumínio tóxico através de uma franquia rural da UNIMILHO, como descrito anteriormente por Ramalho & Vasconcellos (1993).

O perfil do melhorista também deverá ser objeto de mudanças, porque em um ambiente de escassez de recursos financeiros e de forte pressão da sociedade de produtores e consumidores, os quais exigem produtos adequados, deve-se buscar formas criativas para superar os obstáculos que, normalmente, surgem durante a execução das pesquisas. Em um estudo recente, Duvick (1999) analisa o perfil do melhorista para atuar no terceiro milênio. É abordada uma grande quantidade de atributos, porém, baseado em um levantamento que realizou entre melhoristas e especialistas de disciplinas relacionadas, destaca quatro qualidades primordiais: paciência e persistência, aliás a qualidade mais lembrada pelos entrevistados; habilidade interpessoal para estabelecer relacionamentos; espírito de liderança e vontade de trabalhar com afinco. Quanto aos conhecimentos Duvick (1999) destaca que as disciplinas a serem consideradas pelos melhoristas do futuro são a genética, a estatística e o melhoramento de plantas, seguidas por indicação de várias disciplinas como a entomologia, a fitopatologia, entre outras. Surpreendentemente, a familiarização com os recursos genéticos não recebeu prioridade na análise do autor. Acredita-se, contudo, que o melhorista do futuro deverá ter uma boa noção de como trabalhar com os recursos genéticos, especialmente para buscar a variabilidade

genética de que necessita. O profissional também deverá saber trabalhar em parceria, porque dificilmente um melhorista terá condições de desempenhar com eficiência e profundidade todas as disciplinas consideradas prioritárias para o profissional de melhoramento de plantas.

As cadeias produtivas deverão ser levadas em conta cada vez mais no estabelecimento das prioridades das ações em programas de melhoramento, pois, são tendências observadas pelos produtores e consumidores. Assim o melhoramento de grãos deverá liderar as ações nos cerrados brasileiros, por ser uma grande fronteira agrícola, sendo provável que haja aumento na demanda interna e externa. As olerícolas deverão ser trabalhadas com o objetivo de se ofertar produtos de alta qualidade a fim de que seja possível incrementar a produção tanto para o mercado interno como para exportação. É possível que a busca de cultivares resistentes a doenças e pragas seja crescente em todas as cadeias produtivas devido a grande consciência que está se formando no meio da sociedade pela preservação ambiental. A cadeia da fruticultura deverá continuar recebendo grande atenção dos produtores e consumidores, inclusive no semi-árido brasileiro, devido ao potencial de produção de frutos com qualidade, não só para o mercado interno como para a exportação. A busca por cultivares que sejam mais convenientes (sem sementes e de tamanhos adequados) e de boa aparência para a distribuição em supermercados que estão se tornando canais cada vez mais fortes, na distribuição de alimentos no país, deverá ser intensificada.

Os melhoristas devem fundamentar os seus programas de melhoramento nos Bancos de Germoplasma da espécie de interesse, pois existem muitos acessos disponíveis no Brasil (Wetzel & Bustamante, 1999) os quais começam a ser estudados em maior profundidade, pois, o pré-melhoramento está sendo realizado, ainda que em proporções reduzidas. Alguns exemplos podem ser citados. Queiróz *et al.* (1996) mostram que no manejo do Banco de Germoplasma de melancia vários caracteres de importância para o melhoramento da cultura foram identificados nos acessos das populações tradicionais coletadas no Nordeste brasileiro. Os genitores com características identificadas estão sendo cruzados com variedades comerciais e linhas avançadas para obtenção de populações segregantes para posterior seleção. Nass (1999) também relata o resultado de alguns programas de pré-melhoramento em milho, envolvendo o setor público e o setor privado mostrando que esses trabalhos estão tendo grande repercussão em programas de melhoramento de milho de vários países.

É importante ressaltar que uma vez realizado o pré-melhoramento para uma determinada espécie, a exploração da variabilidade genética passa a ser feita em uma escala muito maior. Talvez seja essa a forma de atrair o setor privado para participar do processo, porque o tempo até a liberação de uma nova cultivar fica bastante encurtado.

Apesar dos ganhos expressivos que já foram atingidos com a produção de grãos, nas duas últimas décadas, várias outras cadeias produtivas ainda não conseguiram sucesso semelhante, com exceção de uma ou outra espécie. No conjunto, olerícolas, fruteiras, forrageiras, florestais e medicinais apresentam um grande potencial para serem desenvolvidas nas cinco regiões brasileiras, considerando-se as características macroambientais das mesmas.

6. CONCLUSÕES

Observando-se os fatos expostos, verifica-se que a contribuição do melhoramento de plantas no Brasil tem sido muito significativa em várias espécies. Em particular, na cadeia produtiva de grãos, foi destacado como de grande contribuição ao país, o melhoramento da soja para baixas latitudes, com o desenvolvimento de várias cultivares que estão sendo utilizadas pelos produtores do Nordeste e Norte do país. Assim, foi possível incorporar grandes áreas dos cerrados brasileiros no cultivo da soja. Essa área poderá ser expandida, devido à grande extensão de cerrados ainda não cultivados, desde que exista uma demanda de grãos que justifique esse crescimento.

Na cadeia produtiva das olerícolas enfatizou-se a criação da cultivar de cenoura Brasília, que promoveu um aumento substancial na produção de raízes no país, como também mostrou uma taxa muito superior às taxas de crescimento de outras espécies olerícolas como expandiu a produção para novos ambientes possibilitando a oferta de raízes o ano inteiro. As cultivares de tomate industrial desenvolvidas para o cultivo no Submédio São Francisco, também representam contribuição significativa do melhoramento de plantas, porém, devido à grande competição com outras culturas mais rentáveis a mesma está sendo deslocada para os cerrados brasileiros, com maior capacidade de competição em termos de preços. Este exemplo mostra também que o enfoque do agronegócio é o que prevalece no estabelecimento e manutenção das atividades agrícolas, e que os melhoristas deverão estar atentos às mudanças que estão ocorrendo com a exploração das diversas espécies vegetais, inclusive nas novas oportunidades que poderão surgir para a produção de novas cultivares adaptadas aos novos ambientes no país. Aliás, o melhorista deverá ter uma visão de futuro para o estabelecimento das estratégias de melhoramento, pois as novas cultivares desenvolvidas sempre irão estar disponíveis para os produtores e consumidores muitos anos depois do início das pesquisas.

Na cadeia produtiva das fruteiras destacou-se a criação de clones melhorados de caju anão precoce, os quais estão permitindo um incremento de mais de três vezes na produção de castanhas em condições de chuva e de quase dez vezes na produção de castanhas em condições de irrigação. Ainda mais, estão permitindo o uso do pedúnculo para a produção de frutos *in natura* o que tem proporcionado um aumento substancial na rentabilidade da cultura, tornando-a muito atrativa dentro da cadeia de fruteiras irrigadas.

A receita das três cadeias produtivas foi substancialmente incrementada com a contribuição das espécies que conseguiram a liberação de cultivares melhoradas como ocorreu com a soja, o milho, a cenoura, o tomate industrial, a maçã e o caju, tiveram grande repercussão econômica na produção agrícola brasileira. Esse resultado demonstra a grande contribuição do melhoramento de plantas para o agronegócio brasileiro, representando também, um exemplo de um investimento de grande retorno tanto no setor público como no setor privado. É importante que se estabeleçam empresas de produção e distribuição de sementes e mudas das cultivares melhoradas para que os benefícios obtidos com a introdução e o desenvolvimento das novas cultivares possam chegar aos produtores e consumidores. Consolidar e expandir as ações da melhoria genética de plantas e da transferência dos produtos melhorados aos produtores e consumidores serão a base do desenvolvimento do agronegócio do país nas próximas décadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.I.L.; ARAÚJO, F.E.; LOPES, J.G.V. **Evolução do cajueiro anão precoce na Estação Experimental de Pacajus, Ceará**. Fortaleza: EPACE, 1993. 17p. (Documentos, 6)

ALMEIDA, L.A; KIIHL, R.A. de S.; MIRANDA, M.A.C. de; CAMPELO, G.J. de A. Melhoramento da soja para regiões de baixas latitudes. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, v.41/47, 1980/1997.

AUGUSTIN, E. Melhoramento do aspargo no Brasil: avanços e perspectivas. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>

BACALTCHUK, B. **Visão estratégica para a triticultura brasileira**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1998. 22p. (Documentos 46).

BARROS, L.M.; ARAÚJO, F.E.; ALMEIDA, J.I.L.; TEIXEIRA, L.M.S. **A cultura do cajueiro anão**. Fortaleza: EPACE, 1984. 67p. (Documentos, 3).

BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura**: modernas técnicas de produção. Fortaleza: EMBRAPA, CNPAT, 1995. p.73-96.

BARROS, L. de M.; PAIVA, J.R. de; CAVALCANTI, J.J.V. Recursos genéticos do cajueiro. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817p.

BORGES JR., L. Mercado atual e perspectivas para a maçã. In: REUNIÃO SOBRE O SISTEMA DE PRODUÇÃO INGRADA DA MACIEIRA NO BRASIL, 1., Bento Gonçalves, 1998. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. p.3-5.

BRANDÃO, G.E.; MEDEIROS, J.X. de. Programa de C & T para o desenvolvimento do agronegócio: CNPq. In: CALDAS, R. de A.; PINHEIRO, L.E.L.; MEDEIROS, J.X. de; MIZUTA, K.; GAMA, G.B.M.N. da; CUNHA, P. R.D.L.; KUABARA, M.Y.; BLUMENSCHEIN, A. (Ed.) **Agronegócio brasileiro**: ciência, tecnologia e competitividade. Brasília: CNPq, 1998. p.11-25.

CABRAL, J.R.S.; SOUZA, J. da S.; FERREIRA, F.R. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, R. R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>

CAMPELO, G.J. de A.; KIIHL, R.A. de S.; ALMEIDA, L.A. de. Características agronômicas e morfológicas das cultivares de soja desenvolvidas para as regiões de baixas latitudes. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina,PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

CASTRO, A.A.J.F. Características da vegetação do Meio-Norte. In: SIMPÓSIO SOBRE CERRADOS DO MEIO-NORTE, Teresina, 1997. **Anais**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 1997. p.45-56.

CASTRO. A.M.G. de; LIMA, S.M.V.; GOEDERT, W.J.; FREITAS FILHO, A. de; VASCONCELOS, J.R.P. (Ed.) **Cadeias produtivas e sistemas naturais**: prospecção tecnológica. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, DPD, 1998. 564p.

COBBE, R.V.; JABUONSKY, R.E. A importância econômica e social das plantas olerícolas. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P. da. **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: Potafós, 1993. p.1-14.

COSTA, N.D.; CANDEIA, J.A.; ARAÚJO, M. de T. Importância econômica e melhoramento genético da cebola no Nordeste do Brasil. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

COSTA, S.N. da. Interação cultivares de milho (*Zea mays* L.) x anos x localidades nos Estados do Piauí e Maranhão-Brasil. Piracicaba: ESALQ/USP, 1976. 82p. Dissertação, Mestrado.

COSTA, T.S. da;. ASSIS, J.S. de. Aplicação do cloreto de mepiquat para a antecipação do ciclo produtivo da mangueira Tommy Atkins. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNEB, 3., Salvador, 1999. **Anais**. Salvador: UNEB, 1999. p.39-40.

DIAS, M. de S. Transferência de genes de variedades de dia longo para variedades de dia curto em cebola. **Relatório Científico do Depto. de Genétca**, Piracicaba, p.46, 1970.

DIAS, M. de S.; QUEIRÓZ, M.A. de; COSTA, C.P. da; WANDERLEY, L.J. da G.; SANTOS, M.A.C. dos; YOKOYAMA, S.; LIMA, D.T. de. Ensaio de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) visando industrialização. **Revista de Olericultura**, v.13, 1973. p.42-44.

DIAS, R. de C.S. Características fisiológicas de *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm e fontes de resistência em melancia (*Citrullus lanatus*) (Thunb) Mansf. Recife: UFRPE, 1993. 143p. Dissertação, Mestrado.

DIAS, R. de C.S.; COSTA, N.D.; CERDAN, C.; SILVA, P.C.G. da; QUIERÓZ, M.A. de; OLIVEIRA, F.Z. de; LEITE, L.A. de S.; PAULA PESSOA, P.F.A. de; TERAO, D.A cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO. A.M.G. de; LIMA, S.M.V.; GOEDERT, W. J.; FREITAS FILHO, A. de; VASCONCELOS, J.R.P. (Ed.) **Cadeias produtivas e sistemas naturais**: prospecção tecnológica. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, DPD, 1998. p.441-494.

DONADIO, L.C. **Variedades brasileiras de manga**. São Paulo: Fundação Ed. da UNESP, 1996. 74p.

DUVICK, D. The profile of a plant breeder for the third millennium. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Ed.) **Plant breeding in the turn of the millennium**. Viçosa: UFV, 1999. p.133-182.

ESPINOZA, W. **Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco**. Brasília: IICA, 1991. 301p.

FELDMAN, M. Wheats. In: SIMMONDS, N.W. (Ed.) **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p.120-128.

FERNANDES, M.S. A cadeia produtiva da fruticultura. In: CALDAS, R. de A.; PINHEIRO, L.E.L.; MEDEIROS, J. X. de; MIZUTA, K.; GAMA, G.B.M.N. da; CUNHA, P.R.D.L.; KUABARA, M.Y.; BLUMENSCHEIN, A. (Ed.) **Agronegócio brasileiro**: ciência, tecnologia e competitividade. Brasília: CNPq, 1998. p.201-214.

FERREIRA, M.A.J. da F. Análise dialélica em melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. Jaboticabal: UNESP, FCAVJ, 1996. 83p. Dissertação, Mestrado.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FLORI, J.E. Avaliação da pupunha inerme no Vale do São Francisco. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

FNP Consultoria & Comérico. **Maça**: tortas alemãs com fruta nossa; **Agrianual**. São Paulo, 1996. p.259-267.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

FROTA, A.B.; CAMPELO, G.J. de A. Evolução e perspectivas da produção de soja na região Meio Norte do Brasil. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., Cruz das Almas, 1992. **Anais**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1993. p.13-27.

GIORDANO, L. de B. Cultivares de hortaliças desenvolvidas pela pesquisa nacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 31., Belo Horizonte, 1991. **Palestras**. Belo Horizonte: EMATER-MG, 1991. p.119-156.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semi-Árido. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>

GUIMARÃES, O. Abacaxi: doçura em gomos. **Globo Rural**, v.14, 1999. p.8-10.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. de. **Quantitative genetics in maize breeding.** Ames: Iowa University Press, 1988. 468p.

ISSARAKRAISILA, M.; CONSIDINE, J. Effects of temperature on microsporogenesis and pollen viability in mango cv. Kensington Pride. In: INTERNATIONAL MANGO SYMPOSIUM, 4., Miami Beach, 1992. **Abstracts**. Miami Beach: University of Florida, 1992. p.64.

JENSEN, N.F. Limits to growth in world food production. **Science**, n.201, p.317-320, 1978.

LEITE, M. da C. Novas fronteiras de produção e o intermodal de transporte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.51-58.

MAGNAVACA, R.; GAMA, E.E.G. e; BAHIA FILHO, A.F.C.; FERNANDES, F.T. Obtenção de híbridos de milho com tolerância à toxidez de alumínio. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Relatório Técnico Anual**: 1985-1987. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1991. p.40.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.1, p.14-17, 1998.

MOHR, H. C. Watermelon breeding. In: BASSET, M. J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: AVI, 1986. p.37-66.

NASS, L.L. Pré-melhoramento em milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. /CD-ROM/

PAIVA, J.R. de; ALVES, R.E.; BARROS, L. de M. Melhoramento genético da acerola (*Malpighia emarginata* DC) na Embrapa Agroindústria Tropical. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

PATERNIANI, E. Plant breeding contributions in Brazil: history and perspectives. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Ed.) **Plant breeding in the turn of the millennium**. Viçosa: UFV, 1999. p.355-379.

PAULA PESSOA, P.F.A. de; LEITE, L.A. de S. Cadeia produtiva do caju: subsídios para pesquisa e desenvolvimento. In: CASTRO. A.M.G. de; LIMA, S.M.V.; GOEDERT, W.J.; FREITAS FILHO, A. de; VASCONCELOS, J.R.P. (Ed.) **Cadeias produtivas e sistemas naturais**: prospecção tecnológica. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, DPD, 1998. p.275-301.

PELOSO, M.J. del; YOKOYAMA, L.P.; PEREIRA, P.A.A. Situação atual da cultura do feijão no Brasil. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Ed.) **Tecnologia da produção do feijão Irrigado**. Piracicaba: Publique, 1997. p.135-139.

PEREIRA, P.A.A. A cultura do feijão no Brasil: situação atual e perspectivas. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Ed.) **Feijão irrigado**. Piracicaba: Publique, 1999. p.1-8.

PETRI, J.L. Desafios da pesquisa na produção integrada de maçã. In: REUNIÃO SOBRE O SISTEMA DE PRODUÇÃO INGRADA DA MACIEIRA NO BRASIL, 1., Bento Gonçalves, 1998. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. p.1-2.

PETRI, J.L. Efeitos do tipo e concentração de óleo mineral em combinação com DNOC na quebra da dormência da cultivar de macieira Golden Delicious (*Malus domestica*, Bork). Pelotas: UFPel, 1976. 54p. Dissertação, Mestrado.

PINTO, A.C. de Q.; FERREIRA, F.R. Recursos genéticos e melhoramento de manga no Brasil. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

POEHLMAN, J.M.; BORTHAKUR, D. **Breeding Asian field crops**. New Delhi: Oxford & IBH Publishing , 1969. 385p.

QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

QUEIRÓZ, M.A. de; ROMÃO, R.L.; DIAS, R. de C.S.; ASSIS, J.G.A. de ; BORGES, R.M.E.; FERREIRA, M.A.J. da F.; RAMOS, S.R.R.; COSTA, M.S.V.; MOURA, M. da C.C.L. Watermelon germplasm bank for northeast of Brazil, an integrated approach. In: EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETICS AND BREEDING, 6., Málaga, 1996. **Cucurbits Towards 2000**; proceedings. Málaga: European Association for Research on Plant Breeding; Estación Experimental La Mayora, C.S.I.C. ,1996. p. 97-103.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 2.ed. São Paulo: Globo, 1990. 359p.

RAMALHO, J.H.; VASCONCELLOS, J.H. Difusão e transferência de tecnologia do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Cultura do milho:** fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafós, 1993. p.281-292.

ROMÃO, R.L. Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai em três regiões do Nordeste brasileiro. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 75p. Dissertação, Mestrado.

SANTOS, C.A.F.; NASCIMENTO, C.E. de S.; OLIVEIRA, M.C. de. Recursos genéticos do umbuzeiro: preservação, utilização e abordagem metodológica. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R. R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

SEDYAMA, T.; TEIXEIRA, R. de C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.487-533.

SILVA, S. de O. e; ALVES, E.J.; CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A. P. de; JESUS, S.C. de. Variabilidade genética e melhoramento de bananeira. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. <http:\\ www.cpatsa.embrapa.br>.

SILVEIRA, M. R. Agribusiness: a ordem é inovar. **Empreendedor**, São Paulo, v. 4, n.37, 1997. p.38-39.

SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. 339p.

SOUSA, C.N.A. de. **Relação das cultivares comerciais de trigo no Brasil de 1922 a 1997**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1997. 46p. (Documentos 39).

SOUZA, F. de F.; QUEIRÓZ, M.A. de; DIAS, R. de C.S. Melancia sem sementes: desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides experimentais de melancia. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, 1999. p. 90-95.

SOUZA, S. O. de; ASSIS, J.S. de. Aplicação do cloreto de mepiquat para a antecipação do ciclo produtivo da mangueira Haden. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNEB, 3., Salvador, 1999. **Anais**. Salvador: UNEB, 1999. p.37-38.

WETZEL, M.M.V. da S.; BUSTAMANTE, P.G. **Diretório de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 140p.

2

UTILIZAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS NO MELHORAMENTO

LUCIANO LOURENÇO NASS

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

Biodiversidade ou diversidade biológica refere-se a totalidade de genes, espécies e ecossistemas do mundo ou de uma região. Pode-se considerar que a biodiversidade é resultante de processos evolutivos que ocorrem na Terra. Existem estimativas relativas ao total de organismos vivos na Terra variando da ordem de 5 até 50 milhões ou mais, sendo que a mais aceita situa-se em torno de 10 milhões de espécies. Entretanto, até o presente, apenas 1,4 milhão foram devidamente classificadas.

A biodiversidade é usualmente considerada em três categorias distintas: diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de ecossistemas (McNeely *et al.*, 1990). A diversidade genética refere-se à variação dos genes dentro das espécies, ou seja, a soma total da informação genética presente nos genes de plantas, animais e microrganismos. A diversidade de espécies corresponde a variedade de espécies, isto é, de organismos vivos existentes na Terra. Por sua vez, a diversidade de ecossistemas está relacionada a existência de diferentes habitats, comunidades biológicas e processos ecológicos na biosfera.

As principais causas de perda da biodiversidade de acordo com o Instituto de Recursos Mundiais (1992) são: a alta taxa de crescimento demográfico e o aumento no consumo de recursos naturais; os sistemas econômicos e políticas que não atribuem o devido valor ao ambiente e a seus recursos; a desigualdade na distribuição de propriedade, na gestão e no fluxo de benefícios advindos do uso e da conservação de recursos biológicos; o desconhecimento dos ecossistemas naturais e seus inúmeros componentes; os sistemas jurídicos e institucionais que estimulam a exploração insustentável.

Por outro lado, conservação da biodiversidade compreende o manejo das interações humanas com as distintas categorias da biodiversidade, oferecendo benefícios à geração atual, porém mantendo seu potencial para atender às necessidades e aspirações das próximas gerações. Conseqüentemente, a conservação da biodiversidade não deve resumir-se a proteção da Natureza frente ao desenvolvimento, mas procurar satisfazer a demanda humana por recursos biológicos, e simultaneamente, garantir a sustentabilidade a longo prazo da enorme riqueza biótica do planeta. Assim, a conservação da biodiversidade deve manter o sistema de apoio à vida humana fornecido pela Natureza e os recursos vivos essenciais para o desenvolvimento (Instituto de Recursos Mundiais, 1992).

Por recursos biológicos entende-se aqueles componentes da biodiversidade de uso atual ou potencial para a humanidade. Os recursos genéticos envolvem a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse socioeconômico atual ou potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras áreas afins. O termo recursos genéticos vegetais reduz o universo da biodiversidade para aquele relacionado com a flora. Também é possível fazer referência aos recursos genéticos de *Zea* ou aos

recursos genéticos de milho (*Zea mays* L.), sendo que nessa situação, indica-se a porção da diversidade genética relacionada ao gênero ou à espécie, respectivamente.

Estima-se que 300.000 espécies de plantas superiores foram descritas e que o Homem utilizou cerca de 3.000 na sua alimentação. Atualmente, são utilizadas aproximadamente 300, sendo que apenas 15 são responsáveis por 90% de toda a alimentação humana (Paterniani, 1988; Goodman, 1990). Essa situação reflete uma considerável redução da diversidade genética de espécies, o que representa uma erosão genética ao longo do tempo.

2. RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

A contribuição e o pioneirismo dos trabalhos conduzidos pelo botânico russo Nikolai Vavilov, no início do século XX, representam um marco inicial nos trabalhos com recursos genéticos vegetais (RGV). Vavilov foi o primeiro a compreeender a importância e os benefícios potenciais a serem alcançados pela coleta de sementes de várias espécies ao redor do mundo e pela organização dessas amostras em forma de coleções (Lacy, 1995). Esses esforços iniciais foram essenciais para a estruturação das coleções de germoplasma em todo o mundo.

Os RGV apresentam valor inestimável, atual e futuro, independente do seu aproveitamento pelos pesquisadores por métodos convencionais de melhoramento genético ou pelas técnicas recentes de engenharia genética (Esquinas-Alcázar,1993). Desta forma, os RGV podem ser considerados como um reservatório genético no qual podem ser encontradas as soluções para as diversas alterações ambientais pelas quais o mundo está passando, funcionando também como a matéria-prima para o desenvolvimento da agricultura.

Apesar da biodiversidade estar concentrada em países tropicais e subtropicais, nenhum país ou região pode ser considerado auto-suficiente em termos de RGV. Tomando-se o Brasil como exemplo, o qual é considerado um dos países de maior biodiversidade do mundo, pode-se notar que apenas algumas espécies são autóctones, entre elas: amendoim, abacaxi, cacau, caju, castanha-do-Brasil, guaraná, mandioca e seringueira. Percebe-se claramente que, para as demais culturas de importância econômica, e inclusive para as autóctones, a dependência de germoplasma de outras regiões do mundo é extremamente acentuada.

De acordo com Querol (1993), do ponto de vista etimológico, germoplasma é uma palavra de duas raízes: *germo*, do latim germen, que significa "princípio rudimentar de um novo ser orgânico"; e *plasma*, do grego plasma, que significa "a formação" e, em sentido geral, "a matéria não definida". Portanto, germoplasma significa a matéria onde se encontra um princípio que pode crescer e se desenvolver, sendo definido, segundo Allard (1960) como a soma total dos materiais hereditários de uma espécie. Desta forma, germoplasma é o material que constitui a base física da herança e que é transmitido de uma geração para outra.

A conotação do termo germoplasma é eminentemente técnica, não envolvendo sua importância econômica e política. Por sua vez, o termo recursos genéticos tem agregado um valor econômico presente nos genes, tal como ocorre com outros recursos: florestais, minerais, energéticos etc. (Querol, 1993). De acordo com Hoyt (1992) existem cinco categorias de germoplasma: a) parentes silvestres; b) populações locais

(*landraces*) ou cultivares primitivas; c) cultivares que foram substituídas; d) linhagens experimentais, mutações e outros produtos dos programas de melhoramento; e) cultivares modernas.

A partir da década de 50, verificou-se um maior interesse, em termos mundiais, com relação aos RGV. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) merece destaque nesse processo de conscientização. A FAO promoveu três Conferências Técnicas Internacionais sobre RGV realizadas em 1967, 1973 e 1981, as quais são apresentadas nos trabalhos de Frankel & Bennett (1970), Frankel & Hawkes (1975) e Holden & Williams (1984), respectivamente.

Na década de 70, sob a coordenação do *Consultive Group on International Agriculture Research* (CGIAR), foram criados vários Centros Internacionais de Pesquisa Agrícola (IARC). Em 1974, foi estabelecido o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR) com os objetivos de promover e coordenar os trabalhos com RGV ao nível mundial. A partir de 1992, o IBPGR deu origem ao *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), cuja missão é promover a conservação e o uso dos RGV em benefício das gerações atual e futuras. Na realidade, o IPGRI não possui bancos de germoplasma ou laboratórios, sua atuação é no sentido de colaborar com diferentes parceiros interessados na conservação e uso de RGV (Rao & Riley, 1994). Entre os parceiros estão incluídos os Programas Nacionais de Recursos Genéticos, Universidades, Organizações Não-Governamentais (ONGs), entre outros.

A Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e o Desenvolvimento (UNCED), também conhecida como Encontro da Terra, realizada em 1992 no Rio de Janeiro, permitiu o desenvolvimento de um documento marcante com relação aos RGV, o qual foi denominado de Convenção da Diversidade Biológica. Em junho de 1996, na Conferência Internacional de Recursos Genéticos em Leipzig, na Alemanha, foi aprovado o Plano Global de Ação (PGA) para Recursos Genéticos para Agricultura e Alimentação. O PGA foi adotado e está sendo colocado em prática pelos países que compõem a Comissão de Recursos Genéticos da FAO, inclusive o Brasil (Guedes *et al.*, 1998).

O PGA enfatiza que somente através do uso dos RGV é que os benefícios sociais e econômicos da conservação dos RGV podem ser compreendidos (Cooper *et al.*, 1998). De acordo com a FAO (1996) o PGA tem como principais objetivos: a) assegurar a conservação dos recursos genéticos para a alimentação e agricultura com base na segurança alimentar; b) promover seu uso sustentável fomentando o desenvolvimento e reduzindo a fome e a pobreza; c) promover justa e eqüitativa partição dos benefícios obtidos pelo uso dos recursos genéticos; d) auxiliar na definição de prioridades de ação tanto de países como de instituições voltadas à conservação e uso dos recursos genéticos; e) fortalecer os programas nacionais, regionais e internacionais envolvidos com recursos genéticos.

O PGA consiste de 20 atividades prioritárias reunidas em quatro áreas principais: conservação *in situ*, conservação *ex situ*, utilização dos RGV e capacitação institucional. Essas atividades encontram-se resumidas na Tabela 1.

Diversas atividades estão relacionadas com RGV incluindo: introdução e intercâmbio de germoplasma, coleta, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização. Na seqüência, alguns aspectos pertinentes a cada atividade

TABELA 1. Atividades prioritárias do Plano Global de Ação para Agricultura e Alimentação.

Conservação *in situ*
Levantamento e inventário dos RGV para agricultura e alimentação
Suporte ao manejo e melhoramento dos RGV para agricultura e alimentação *on-farm*
Auxiliar os agricultores a restaurar seus sistemas agrícolas em situações desastrosas
Promover a conservação *in situ* de parentais selvagens e espécies selvagens para a produção de alimentos
Conservação *ex situ*
Manter as coleções *ex situ* existentes
Regenerar os acessos *ex situ* ameaçados
Dar suporte ao planejamento e coleta de RGV para alimentação e agricultura
Expandir as atividades de conservação *ex situ*
Utilização de RGV
Expandir a caracterização, avaliação e o número de coleções nucleares para facilitar o uso dos RGV
Esforços para ampliar a base genética (*pre-breeding*)
Promover a agricultura sustentável pela diversificação dos cultivos e maior diversidade nas culturas
Promover o desenvolvimento e a comercialização de culturas e espécies subutilizadas
Dar suporte à produção e distribuição de sementes
Desenvolver novos mercados para as variedades locais e produtos "ricos em diversidade"
Capacitação institucional
Fortalecer programas nacionais de recursos genéticos
Promover uma rede de RGV para agricultura e alimentação
Gerar sistemas de informação compreensíveis de RGV para agricultura e alimentação
Monitorar as perdas de RGV
Expandir e melhorar a educação e os treinamentos
Promover a consciência pública do valor da conservação e uso dos RGV para agricultura e alimentação

Fonte: Cooper *et al.* (1998)

serão brevemente discutidos, uma vez que neste capítulo, ênfase será dada aos aspectos relativos à utilização de RGV no melhoramento. Informações adicionais sobre as fases de manejo do germoplasma são apresentadas em outro capítulo deste livro.

2.1 INTRODUÇÃO E INTERCÂMBIO DE GERMOPLASMA

Introdução é a transferência ordenada e sistemática de germoplasma para um novo local a fim de atender às necessidades dos programas de melhoramento genético e pesquisas correlatas (Giacometti, 1988a). Deve-se ressaltar que, qualquer procedimento relacionado à introdução de germoplasma necessariamente deve respeitar os regulamentos fitossanitários existentes no país. Em termos práticos diferentes tipos de introduções podem ser realizados, dependendo do interesse do pesquisador, tais como: a) espécie – introdução de uma espécie no país ou região; b) cultivar – introdução de uma população, variedade, híbrido, linhagem ou clone no país ou região; c) citoplasma – introdução de fontes de macho-esterilidade; d) gene – introdução de genes específicos para resistência a doenças e/ou pragas, ou outros genes potencialmente úteis para programas de melhoramento.

O intercâmbio de germoplasma consiste na aquisição recíproca de germoplasma. Entre os maiores fornecedores de germoplasma para o Brasil estão os Centros Internacionais de Pesquisa Agrícola (IARC), coordenados pelo CGIAR, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e as Universidades Americanas (Giacometti, 1988a). Embora os regulamentos fitossanitários possam parecer um entrave para o livre intercâmbio de germoplasma, eles se apresentam como mecanismos eficientes para impedir a entrada de pragas e patógenos inexistentes no país ou em uma região.

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) por meio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é credenciada a proceder o intercâmbio de germoplasma e a adotar os procedimentos de quarentena. Detalhes da legislação brasileira sobre intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal e uma discussão sobre como funciona o fluxo de germoplasma a ser introduzido e/ou exportado são apresentados por Batista *et al.* (1998). Quanto à importação de germoplasma, as espécies vegetais são classificadas em duas categorias: a) de livre importação – neste caso é necessário apenas o Certificado Fitossanitário para seu intercâmbio; b) de importação restrita – onde informações adicionais no Certificado Fitossanitário são exigidas de acordo com portarias governamentais pertinentes ao material em questão.

A quarentena vegetal envolve um determinado período de incubação onde pode ocorrer o aparecimento e detecção de pragas e sintomas de doenças. Seu principal objetivo é prevenir a entrada de pragas e patógenos em áreas até então isentas desses organismos, constituindo-se em um mecanismo eficiente para proteger a agricultura e o ambiente da entrada de pragas e doenças inexistentes no país. A quarentena utiliza duas formas de controle: a exclusão e a erradicação. A primeira, refere-se à constatação da ausência da praga no material vegetal, enquanto a erradicação da praga no germoplasma importado é conseguida por tratamento térmico/químico ou de cultura de tecidos. Batista *et al.* (1998) salientaram que o importante é disponibilizar ao melhorista o germoplasma solicitado com o menor risco possível de introdução de novas pragas e doenças.

A série de publicações, sob coordenação da FAO-IPGRI, denominada *Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm* apresenta-se como um guia bastante útil quando há interesse no intercâmbio internacional de germoplasma.

2.2 COLETA

Pode-se considerar que a atividade de coleta de RGV iniciou-se com a própria agricultura. Heiser Jr. (1977) salientou que o homem primitivo certamente experimentou quase todos os recursos vegetais, tornando-se um perito na distinção dos que serviam para sua alimentação.

Os estudos conduzidos por Gregor Mendel, aliados com os conceitos estabelecidos por Charles Darwin, proporcionaram o aparecimento de um novo tipo de coletor, atento à natureza variável das espécies. De acordo com Lleras (1988), Nikolai Vavilov e seus colaboradores foram os primeiros a compreender a importância da diversidade em plantas cultivadas e seus parentes silvestres para o melhoramento genético.

Ford-Lloyd & Jackson (1986) apontaram quatro tipos básicos de locais de coleta: a) lavouras e roças; b) hortas e pomares caseiros; c) mercados e feiras; d) habitats silvestres. A coleta em lavouras e roças é bastante variável, haja vista a existência de diferentes sistemas agrícolas, principalmente nos países em desenvolvimento. Nesses locais, geralmente são encontradas cultivares melhoradas recentemente introduzidas. Hortas e pomares caseiros são locais importantes como fonte de coleta pela alta probabilidade de se capturar raças locais (*landraces*), valiosas pela sua capacidade de adaptação à ambientes específicos. Nos mercados e feiras, em curto espaço de tempo, vários materiais podem ser obtidos. Entretanto, as informações a respeito do material coletado podem não ser plenamente confiáveis. Com relação aos habitats silvestres a principal dificuldade reside na delimitação do tamanho das populações.

Lleras (1988) definiu quatro tipos de prioridades que devem ser consideradas na coleta de recursos genéticos: a) resgate de cultivares que estão sendo substituídas por outras de maior potencial; b) resgate de raças locais (*landraces*) pelo seu alto valor adaptativo às condições ambientais específicas; c) áreas sujeitas a mudanças severas em função de alterações drásticas no ambiente, como hidrelétricas, ferrovias, rodovias, mineração e áreas de expansão da fronteira agrícola; d) incorporação de novas alternativas ao sistema de pesquisa agropecuário para uso futuro pela humanidade. Aspectos teóricos e práticos relacionados com a coleta de RGV podem ser encontrados nos trabalhos de Guarino *et al.* (1995) e Walter & Cavalcanti (2001), sendo que o último tem suas atenções voltadas principalmente para coletas no Brasil.

Por ocasião da coleta de germoplasma faz-se necessário o registro da maior quantidade de informações disponíveis. Tais informações constituem os chamados dados de passaporte, os quais devem ser os mais completos possíveis. Cada instituição pode desenvolver seu próprio modelo de passaporte, entretanto, dados básicos como a exata localização geográfica e uma descrição pormenorizada do ambiente são imprescindíveis para trabalhos futuros, onde o potencial de utilização do acesso será avaliado. Em termos práticos, os dados de passaporte representam a identidade do acesso coletado.

Acesso é o termo utilizado para denominar toda amostra de germoplasma que representa a variação genética de uma população ou de um indivíduo propagado clonalmente (Vilela-Morales *et al.*, 1997). Nesse contexto, o acesso pode ser constituído por diferentes estruturas, entre elas: plantas, animais, sementes, estacas, bulbos, esporos, cepas, estirpes, pólen, sêmen, óvulos, embriões, tecidos e células, além da conservação do DNA e seus fragmentos. Um fator essencial a ser considerado na composição das amostras é a sua representatividade, para tanto deve-se atentar para os princípios relacionados ao tamanho efetivo populacional e a freqüência alélica a ser considerada (Vencovsky, 1986; Vilela-Morales *et al.*, 1997).

Rao & Riley (1994) indicaram duas situações onde a biotecnologia pode auxiliar nas atividades de coleta reduzindo empecilhos de ordem prática e aumentando sua eficiência: a) fornecendo informações sobre a diversidade genética disponível em uma determinada área; b) desenvolvendo métodos *in vitro* para aplicação no campo, a fim de fornecer novas alternativas de coleta, especialmente para espécies de reprodução vegetativa e/ou espécies que apresentam sementes recalcitrantes.

2.3 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

Considerando que o germoplasma esteja disponível, seja por ações de coleta ou de introdução e intercâmbio, a seqüência dos trabalhos exige procedimentos no sentido da sua caracterização e avaliação. Nestas atividades merece destaque o papel do Curador de Germoplasma, que é o indivíduo responsável pela coordenação das informações sobre os acessos e toda a atividade pertinente ao seu produto.

No processo de caracterização e avaliação de qualquer acesso, Valls (1988) considerou a existência de cinco etapas subseqüentes e correlatas: a) correta identificação botânica; b) elaboração do cadastro de acessos por espécie; c) caracterização; d) avaliação preliminar; e) avaliação complementar. Essas etapas contribuem sobremaneira para um melhor conhecimento dos acessos, sendo possível a detecção de eventuais duplicações indesejáveis nas coleções.

O IPGRI tem publicado várias listagens de descritores para diversas culturas a fim de facilitar e uniformizar as atividades de caracterização e avaliação. Ambas as atividades resultam na tomada de dados de uma série de caracteres (descritores) que auxiliam o usuário a identificar os acessos com as características desejadas para sua utilização no melhoramento de plantas. Descritores podem ser definidos como os atributos ou características inerentes aos acessos de um banco de germoplasma, possibilitando a diferenciação entre acessos de uma mesma cultura (Howes, 1981). O uso de descritores na caracterização e também na avaliação de germoplasma, deve necessariamente resultar de um consenso entre curadores e melhoristas (Giacometti, 1988b); tomando-se o cuidado de não exagerar na quantidade de descritores a serem utilizados.

Querol (1993) definiu a caracterização como sendo a coleta de dados, sobretudo qualitativos, para descrever, e com isso diferenciar, acessos de uma mesma espécie. Nesse sentido, considerou também, que os principais dados de caracterização são características: da planta (altura, forma, hábito de crescimento e ramificações); da folha (forma, largura, comprimento, cor, tipo de borda e nervuras); da flor (forma, cor e tipo de cálice); do fruto (forma, cor, volume e número de sementes por fruto); da semente (tamanho, forma e cor); e das partes subterrâneas (tamanho, forma e cor).

O processo de caracterização permite a identificação de caracteres de alta herdabilidade, cuja expressão é pouco influenciada pelas condições ambientais; sendo geralmente conduzida pelos curadores de germoplasma. Diferentes níveis de caracterização são possíveis, entre eles: agronômica, bioquímica e molecular. A situação ideal é que todos os níveis de caracterização sejam realizados, cabendo aos pesquisadores e curadores a decisão do nível de informação desejado, tomando-se por base a demanda existente pelos acessos das diferentes culturas, como também a disponibilidade de recursos financeiros.

A biotecnologia também tem auxiliado bastante nos trabalhos de caracterização podendo-se identificar quatro áreas importantes: a) identificação de genótipos, incluindo acessos duplicados; b) *fingerprint* dos genótipos; c) análise da diversidade genética nas coleções ou em condições naturais; d) estabelecimento de coleções nucleares (Dodds & Watanabe, 1990). Várias técnicas envolvendo marcadores têm sido empregadas no estudo dos RGV, sendo que algumas dessas aplicações são apresentadas na Tabela 2.

A avaliação dos acessos é conduzida por uma equipe multidisciplinar e envolve caracteres quantitativos, isto é, controlados por muitos genes e que são altamente influenciados pelas condições ambientais. As ações relacionadas à avaliação dos RGV podem ser divididas em avaliação preliminar e complementar. Segundo Smith & Duvick (1989) a avaliação preliminar inclui informações sobre os caracteres agronômicos básicos como: ciclo, altura da planta, porcentagem de germinação e resistência a doenças. Tais informações são de grande importância e deveriam estar disponíveis para todos os acessos mantidos nos bancos de germoplasma. Entretanto, Peeters & Williams (1984) estimaram que mais de 90% dos acessos não possuíam dados de avaliação preliminar.

Aqueles acessos com melhor potencial devem ser submetidos a avaliação complementar, a qual necessariamente deve ser realizada por uma equipe multidisciplinar. Nessa etapa as informações são obtidas a partir de experimentos com repetições, sendo também interessante a utilização de vários ambientes.

TABELA 2. Características, usos e limitações das técnicas envolvendo marcadores genéticos aplicadas aos recursos genéticos vegetais.

Técnicas	Características	Usos	Limitações
Isoenzimas	Codominante	Estudos da estrutura populacional. Como complemento de outros marcadores dominantes.	Poucos locos disponíveis. Protocolos não universais.
Polimorfismo baseado em tamanho de fragmentos de restrição (RFLP)	Codominante	Caracterização de germoplasma. Mapeamento e seleção assistida por marcadores.	Exigência de bibliotecas de cDNA ou genômicas (sondas). Marcação radioativa. Dificuldade na análise da diversidade genética em larga escala.
Polimorfismo baseado em fragmentos amplificados (AFLP)	Dominante	Programas de *pre-breeding*. Estudo e avaliação da divergência genética (dendrogramas). Identificação de duplicatas (*fingerprinting* de cada material).	Pouca informação por loco. Marcação radioativa ou uso de sequenciadores automáticos.
DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)	Dominante. Utiliza Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Método simples, de baixo custo e rápido. Não envolve radioatividade. Adequado para grandes amostras.	Programas de *pre-breeding*. Estudos de divergência genética (dendrogramas). Identificação de duplicatas. Mapeamento e seleção assistida por marcadores. Uso conjunto com outros marcadores.	Pouca informação por loco.
Número variável de repetições aleatórias (VNTRs). Micro e Minissatélites	Codominante. Marcadores altamente informativos.	Indicados para a caracterização de recursos genéticos. Detecção de duplicatas com altíssima precisão. Estudos da estrutura populacional. Seleção assistida por marcadores.	Desenvolvimento do marcador e obtenção dos pares de iniciadores (*primers*).
PCR de DNA citoplasmático (cloroplasto e mitocôndria), com posterior sequenciamento	Codominante. Não segregam (herança materna).	Caracterização detalhada de germoplasma. Detecção de mutações (duplicações, inversões, deleções e inserções). Filogenia molecular	Custo elevado.

Informações sobre qualidade de grão, tolerância aos estresses bióticos e abióticos e produtividade devem ser obtidas com o objetivo de estimular o uso dos RGV. Considerações práticas e estratégias para avaliação de acessos são encontradas em Williams (1989) e Frankel (1989).

2.4 DOCUMENTAÇÃO

Vilela-Morales (1988) enfatizou que as ações de documentação envolvem o processamento das informações de uma série de atividades relacionadas ao germoplasma, entre elas: a) enriquecimento da variabilidade genética (intercâmbio de germoplasma, coleta e melhoramento genético); b) cadastramento das coleções (base, ativa e nuclear); c) conservação das coleções (câmaras frias, *in vitro* e *in vivo*); d) caracterização e avaliação de germoplasma (uso de descritores qualitativos e quantitativos).

O manejo adequado dos dados é essencial em todas as atividades relacionadas com RGV. Para ser eficiente, o sistema utilizado necessariamente deve conter dados facilmente recuperáveis e compreensíveis por parte dos usuários.

O avanço no campo da informática tem auxiliado sobremaneira os trabalhos de documentação em RGV (Costa, 1999). Com o advento da internet estas ações ganharam nova dimensão, fruto da agilidade e eficiência com que a informação é documentada e disponibilizada. Países desenvolvidos e em desenvolvimento têm concentrado seus esforços na geração de sistemas de informação em RGV, pois é praticamente inviável a geração de um sistema universal, uma vez que as realidades e necessidades de cada país são muito diferentes. Esquinas-Alcázar (1993) ressaltou que um bom sistema de documentação é a chave para uma efetiva utilização dos acessos mantidos nos bancos de germoplasma.

2.5 CONSERVAÇÃO

Conservação é definida como o manejo pelo Homem da biosfera para que possa produzir o maior benefício sustentável às atuais gerações, mantendo seu potencial de satisfazer às necessidades e aspirações das gerações futuras. Nesse sentido, a conservação é positiva e compreende a preservação, manutenção, utilização sustentável, restauração e melhoria do ambiente natural (Instituto de Recursos Mundiais, 1992).

A estratégia de conservação depende da natureza do material, do objetivo e do alcance da conservação (Frankel, 1970). A natureza do material envolve a duração do ciclo total, modo de reprodução, tamanho dos indivíduos e se o material é domesticado ou não. Além disso, deve-se considerar também o tempo (curto, médio e longo prazo) e o local onde será realizada a conservação (Ford-Lloyd & Jackson, 1986).

Basicamente, existem duas estratégias de conservação denominadas *in situ* e *ex situ*. É importante enfatizar que essas estratégias não são excludentes, devendo ser consideradas como complementares. A *in situ* é a conservação da biodiversidade dentro do ecossistema, mantendo a dinâmica evolutiva do habitat original ou do ambiente natural. Por sua vez, a *ex situ* é a conservação da biodiversidade fora do ambiente original ou natural. O IBPGR (1991) definiu conservação *in situ* como a manutenção contínua de uma população na comunidade a qual ela pertence e dentro do ambiente ao qual ela está adaptada, enquanto que, conservação *ex situ*, consiste na manutenção de espécies em habitats diferentes daqueles aos quais elas estão adaptadas.

2.5.1 CONSERVAÇÃO IN SITU

Conservação *in situ* permite, teoricamente, preservar espécies cultivadas e silvestres, sem necessidade de grandes gastos, dependendo apenas de decisões políticas das autoridades (Querol, 1993).

Esta estratégia é mais indicada para espécies silvestres das plantas cultivadas, forrageiras, fruteiras e espécies florestais. Hoyt (1992) ressaltou que somente as espécies silvestres podem ser candidatas à conservação *in situ*, uma vez que somente elas vivem em comunidades naturais. A conservação *on farm* (na fazenda) é uma alternativa que viabiliza a conservação de espécies de plantas e animais dentro do seu habitat natural, ainda que estejam submetidas a práticas de manejo.

Querol (1993) salientou que a conservação *in situ* de espécies cultivadas anuais é dificultada pela necessidade de controle do meio onde se conserva o material e pelo perigo da introdução de novas espécies ou novas variedades. Além disso, considera que propor a conservação de raças locais sem melhorá-las significa obrigar o pequeno agricultor a manter um nível de produção baixo e evitar o aproveitamento das vantagens de alguns avanços da agricultura moderna.

2.5.2 CONSERVAÇÃO EX SITU

Estima-se que dos 300 milhões de dólares anuais necessários para sustentar a conservação *ex situ* dos recursos genéticos agrícolas, 43% são destinados aos programas nacionais de bancos de sementes, 6% para conservação nas fazendas, 6% para os bancos de genes em campo e centros de coletas *in vitro*, 10% para respaldar as atividades através da comunidade internacional, 17% para pesquisa, 4% para treinamento, 8% para a conscientização do público e 6% para construir novas instalações, sendo que os custos para conservação *in situ* não foram incluídos nestas estimativas (Instituto de Recursos Mundiais, 1992).

De maneira geral, a conservação *ex situ* é efetuada nas seguintes estruturas: coleção de base, coleção ativa, coleção de trabalho, coleção a campo, coleção nuclear, coleção *in vitro*, criopreservação e coleção genômica (Guedes *et al.*, 1998).

Quando uma espécie normalmente se propaga por sementes o armazenamento a longo prazo é o método preferido para sua conservação (Goedert, 1988). Sob condições apropriadas de armazenamento, as sementes de muitas espécies permanecem viáveis por centenas de anos (Harrington, 1970).

Para fins de armazenamento, as sementes são classificadas em três grupos distintos (Roberts, 1973; Ellis *et al.*, 1990).

a) Ortodoxas: aquelas onde o teor de umidade pode ser reduzido entre 4% a 6% e suportam o armazenamento por longos períodos em temperaturas subzero, geralmente entre -18°C a -20°C;

b) Intermediárias: aquelas que são colhidas da planta-mãe com umidade ainda alta, mas que podem ser submetidas à secagem até cerca de 10% de umidade sem sofrer perda de viabilidade;

c) Recalcitrantes: aquelas que morrem rapidamente quando submetidas à redução do teor de umidade abaixo de determinados níveis críticos, os quais são variáveis entre as espécies.

A maioria das sementes utilizadas na agricultura apresenta comportamento ortodoxo (Roberts *et al.*, 1984), com isso a conservação a longo prazo é facilitada. Entretanto, mesmo em condições ideais de armazenamento, que envolvem redução do teor de umidade da semente e temperatura subzero, existe deterioração (Roberts & Ellis, 1984). Para as espécies intermediárias pode-se realizar um armazenamento a médio prazo, cerca de poucos anos. No outro extremo, estão as espécies recalcitrantes que não obedecem as regras aplicadas às sementes ortodoxas (Ford-Lloyd & Jackson, 1986), apresentando viabilidade reduzida, apenas poucos dias ou meses, quando submetidas à condição de umidade insuficiente.

Uma descrição sucinta dos diferentes tipos de coleções utilizadas na conservação *ex situ* de germoplasma é apresentada na Tabela 3.

TABELA 3. Descrição resumida dos tipos de coleções utilizados na conservação de germoplasma *ex situ*.

Tipo de Coleção	Características	Responsável
Coleção de Base (Colbase)	Destinada a conservar o germoplasma a longo prazo pela utilização de processos de frigorificação, com temperatura entre -18°C e -20°C. No caso de sementes, seu grau de umidade deve ser reduzido para o intervalo entre 4% a 6%.	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Coleção Ativa (Colativa)	Conserva amostras de germoplasma a médio prazo, com temperatura acima de zero e abaixo de 15°C. A estrutura física que conserva a Colativa é denominada de Banco Ativo de Germoplasma (BAG);	Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)
Coleção Nuclear (*Core Collection*)	São coleções menores que têm por objetivo representar a variabilidade genética de uma espécie e seus parentes silvestres com o mínimo de repetitividade. Para tanto, sugere-se a utilização de 10% a 15% do total dos acessos disponíveis, que através de estratificação criteriosa, representam de 70% a 80% da variação genética da coleção. Nas coleções muito grandes, a coleção nuclear não deve exceder 3000 amostras.	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)
Coleção de Trabalho	Destinada a conservação das amostras com as quais o melhorista ou outro pesquisador está trabalhando.	Melhoristas, Geneticistas e outros Pesquisadores
Coleção *in vivo* (a campo)	Destinada a conservar espécies intermediárias e recalcitrantes. Muito utilizada para as espécies que apresentam reprodução vegetativa. Suas principais limitações são a exposição aos fatores bióticos e abióticos e a área exigida para manter as coleções .	Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)
Coleção *in vitro*	Destinada a conservar espécies intermediárias e recalcitrantes, constituindo-se em uma excelente alternativa para as espécies conservadas *in vivo* (a campo). Oferece maior segurança e economia de espaço, porém, não elimina a necessidade de renovação periódica da coleção.	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)
Coleção Genômica	Destinada a conservar coleção de fragmentos de DNA clonados, que incluem praticamente toda informação genética de uma determinada espécie.	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)
Criopreservação	Conservação in vitro de germoplasma a longo prazo pela utilização de nitrogênio líquido em temperatura ultrabaixa (-196°C).	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs)

De acordo com Vilela-Morales *et al.* (1997) as amostras de germoplasma utilizadas nos procedimentos *ex situ* podem ser classificadas em duas categorias em relação a sua conservação a longo prazo:

a) Amostra Inicial – obtida através de procedimentos de coleta, intercâmbio de germoplasma ou de programas de melhoramento genético. Freqüentemente, as amostras iniciais apresentam tamanho inadequado para permitir sua imediata incorporação ao sistema de armazenamento. Nesses casos, as amostras são submetidas a procedimentos de multiplicação inicial, devendo-se optar por aqueles que evitem ou diminuam perdas em variação genética, que se acentuadas, poderão provocar uma expressiva descaracterização da mesma em relação à população originalmente amostrada. Depois da multiplicação inicial, as amostras obtidas constituem a amostra base da coleção, com índice de regeneração zero (R_0) o que indica tratar-se da amostra inicial para a coleção.

b) Amostra Base – obtida através dos procedimentos de multiplicação inicial da amostra inicial ou diretamente dos procedimentos de coleta ou de intercâmbio de germoplasma. Seu tamanho deve ser adequado, para evitar ou diminuir a ocorrência de perdas de variação genética durante os futuros procedimentos de multiplicação ou regeneração. O sistema de conservação de germoplasma deverá definir o número de amostras necessárias para conservar cada acesso de germoplasma. Toda vez que a quantidade de amostras-base diminuir até um número mínimo, por exemplo duas, ou a viabilidade diminuir até níveis considerados críticos pelo sistema estabelecido, por exemplo 85% do poder germinativo inicial, uma amostra base deve ser submetida a procedimentos de regeneração; tomando-se sempre os cuidados necessários para evitar ou diminuir as perdas e/ou alterações da variação genética que provocam sua descaracterização. Ao final dos procedimentos de regeneração, as amostras obtidas deverão substituir as amostras remanescentes na coleção de germoplasma e o índice de regeneração deverá ser alterado somando-se o valor 1 ao índice apresentado pela amostra que foi regenerada. Como exemplo, uma amostra com uma regeneração terá índice R_1; caso ela seja submetida a outra regeneração, a nova amostra obtida terá índice R_2.

Vilela-Morales (1999) ressaltou que, embora a teoria de amostragem seja clara, a situação mais comum é o recebimento de amostras fora do padrão de representatividade genética.

Faiad *et al.* (1998) relacionaram os procedimentos usualmente empregados para a conservação de germoplasma-semente a longo prazo, com destaque para a metodologia adotada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Detalhes mais específicos sobre a conservação *ex situ* são apresentados em outro capítulo deste livro. Os procedimentos de regeneração e os vários aspectos relacionados à amostragem em ações de coleta e regeneração são discutidos por Vencovsky (1986), Hallauer & Miranda Filho (1988) e Vilela-Morales *et al.* (1997).

3. DISPONIBILIDADE DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

O número total de acessos mantidos em coleções de germoplasma é superior a 2,5 milhões, sendo 1.200.000 de cereais, 369.000 de leguminosas, 215.000 de forrageiras, 137.000 de hortaliças e 74.000 de tubérculos (Plucknett *et al.*, 1987). Um resumo destas estimativas é apresentado na Tabela 4. Existem estimativas recentes que apontam para números da ordem de 6,5 milhões de acessos ao nível mundial.

Todavia, esse valor parece superestimado, uma vez que o número de duplicatas deve estar inflacionando esse dado. Certamente, as culturas de maior importância econômica estão melhor representadas nas coleções de germoplasma (Lyman, 1984). Isto também é reflexo do maior esforço dos programas de pesquisa para essas culturas.

Dois aspectos devem ser considerados com relação a duplicatas de coleções. Primeiro, elas podem ser utilizadas como meio de proteção contra perdas ocasionadas por desastres naturais, erros humanos ou questões políticas. Segundo, a duplicação indiscriminada de acessos ou de coleções inteiras em vários locais pode ser dispendiosa e desnecessária.

TABELA 4. Estimativas do número de acessos nos bancos de germoplasma no mundo.

Cultura	Número de Acessos	Número de Amostras Distintas	Porcentagem de cobertura	
			Raças locais (*Landraces*)	Espécies selvagens
Cereais				
Trigo	410.000	125.000	95	60
Cevada	280.000	55.000	85	20
Arroz	215.000	90.000	75	10
Milho	100.000	50.000	95	15
Sorgo	95.000	30.000	80	10
Aveia	37.000	15.000	90	50
Centeio	18.000	8.000	80	30
Leguminosas				
Feijão	105.000	40.000	50	10
Soja	100.000	18.000	60	30
Amendoim	34.000	11.000	70	50
Grão-de-bico	25.000	13.500	80	10
Guandu	22.000	11.000	85	10
Ervilha	20.500	6.500	70	10
Caupi	20.000	12.000	75	1
Lentilha	13.500	5.500	70	10
Feijão-fava	10.000	5.000	75	15
Tubérculos				
Batata	42.000	30.000	95	40
Mandioca	14.000	6.000	35	5
Inhame	10.000	5.000	40	5
Batata-doce	8.000	5.000	50	1
Hortaliças				
Tomate	32.000	10.000	90	70
Cucurbitáceas	30.000	15.000	50	30
Crucíferas	30.000	15.000	60	25
Capsicum	23.000	10.000	80	40
Allium	10.500	5.000	70	20
Berinjela	3.500	2.000	50	30
Culturas Industriais				
Algodão	30.000	8.000	75	20
Cana-de-açúcar	23.000	8.000	70	5
Cacau	5.000	1.500	--	--
Beterraba	5.000	3.000	50	10
Forrageiras				
Leguminosas	130.000	--	--	--
Gramíneas	85.000	--	--	--

Adaptada de Plucknett *et al.*(1987)

A partir de 1975 houve um incremento significativo no número de bancos de germoplasma ao nível mundial (Plucknett *et al.*, 1987), principalmente nos países em desenvolvimento. Esse esforço obviamente conduziu a um aumento substancial na quantidade de acessos incorporados ao sistema. Embora a quantidade tenha crescido consideravelmente, muitas amostras mantidas nesses bancos foram perdidas devido às condições inadequadas para sua conservação.

A erosão dos recursos genéticos é conseqüência da exploração abusiva dos recursos naturais do planeta pelo Homem, o qual tem quebrado o balanço de muitos sistemas agroecológicos e ocasionado um aumento na degradação da biosfera. Entretanto, salvaguardar os recursos genéticos pela sua proteção *in situ* ou *ex situ* é fundamental para o desenvolvimento sustentável da agricultura, para a segurança alimentar e para a estabilidade ambiental (Esquinas-Alcázar, 1993).

4. RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS E MELHORAMENTO

As pesquisas com RGV envolvem uma série de atividades essenciais, as quais necessitam de um considerável suporte financeiro e, principalmente, exigem continuidade. De maneira geral a estrutura dos bancos de germoplasma compreende as seguintes atividades: introdução e intercâmbio de germoplasma, coleta, caracterização, avaliação, documentação e conservação. A fim de que os objetivos básicos dos bancos de germoplasma sejam alcançados, tais como a manutenção da variabilidade genética e a utilização dos acessos, é de fundamental importância que haja uma sincronia perfeita entre as diferentes atividades (Nass, 1999). Por outro lado, os melhoristas de plantas conduzem seus programas em função da variabilidade genética disponível para atender ao(s) objetivo(s) do melhoramento. Tanto no setor público quanto no privado, os melhoristas estão empenhados no desenvolvimento de materiais que preencham as necessidades atuais e futuras do mercado no menor espaço de tempo e com o menor custo possível.

A maioria dos trabalhos de melhoramento envolve cruzamentos entre materiais elites (Goodman, 1990), uma vez que estas populações apresentam elevado potencial genético para os caracteres de interessse (Duvick, 1984; Paterniani, 1987; Troyer, 1990; Nass *et al.*,1993). Desta forma, os genes potencialmente úteis mantidos nas coleções somente serão utilizados caso sejam incorporados nos materiais considerados elite.

A vulnerabilidade genética deve ser uma preocupação constante no melhoramento de qualquer espécie. A experiência desastrosa verificada na cultura do milho nos Estados Unidos em 1970, devido à epidemia de *Helminthosporium maydis*, é um exemplo concreto de como materiais muito uniformes podem ser dizimados em curto espaço de tempo.

No melhoramento de milho, ao nível mundial, os setores público e privado têm usado uma estratégia válida, porém de alto risco futuro. Trata-se da obtenção de novas populações e/ou linhagens a partir de gerações avançadas de híbridos comerciais. Nos países onde existe proteção de cultivares, as sementes dos híbridos (F_1) disponíveis no mercado constituem-se em fontes de germoplasma (Parks, 1993), sendo tal procedimento perfeitamente viável e legítimo. Essa estratégia também se verifica nos países que não possuem regulamentação jurídica sobre o assunto. O mercado de produção de híbridos é altamente competitivo e está concentrado em poucas linhagens

consideradas elites. Tais materiais apresentam um *background* genético de elevado potencial produtivo, que atende às exigências atuais dos produtores de milho. Como os melhoristas precisam apresentar resultados promissores a curto prazo, faz sentido, obviamente, a exploração dos materiais que apresentam as características desejadas pelo mercado. Entretanto, deve-se atentar para o risco de estreitamento da base genética dos materiais desenvolvidos a partir dessa estratégia de melhoramento. Provavelmente, em um curto período de tempo todos os híbridos serão muito semelhantes e estarão compartilhando do mesmo *background* genético. Como conseqüência, esse procedimento deverá restringir consideravelmente a base genética dos materiais cultivados.

A busca por genótipos superiores em produtividade, resistentes a pragas e doenças, tolerantes aos estresses ambientais e de melhor qualidade nutricional, é bastante árdua, competitiva e de custo elevado. Assim, muitos melhoristas evitam trabalhar com genótipos selvagens, raças locais e materiais exóticos disponíveis nas coleções, alegando falta de tempo, recursos e muitas vezes dificuldade para identificar genes potencialmente úteis para o melhoramento. Marshall (1989) salientou que a dificuldade na identificação destes genes é o principal fator responsável pela baixa utilização destes tipos de acessos.

Pelo exposto até o momento, fica evidente a existência de uma lacuna entre as atividades de RGV e os programas de melhoramento. Enquanto os pesquisadores envolvidos com RGV coletam e conservam a variabilidade, no outro extremo os melhoristas não têm explorado a diversidade disponível, utilizando apenas sua própria coleção de trabalho.

5. UTILIZAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

O reconhecimento da importância dos recursos genéticos é praticamente incontestável. As atividades de rotina dos bancos de germoplasma já citadas anteriormente, demandam pesquisadores qualificados em diversas áreas do conhecimento, apresentam um custo elevado e o retorno é quase sempre a longo prazo. Além da conservação da variabilidade genética para uso futuro, um outro objetivo almejado é a utilização, pela clientela, dos acessos disponíveis.

Salhuana (1987) e Marshall (1989) apresentam ampla discussão sobre as causas da baixa utilização dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma. As principais causas são relacionadas a seguir: a) falta de documentação e descrição adequada das coleções; b) falta de informações desejadas pelos melhoristas; c) adaptação restrita dos acessos; d) número insuficiente de melhoristas, principalmente nos países em desenvolvimento; e) falta de avaliação das coleções; f) pouca disponibilidade de sementes, devido a esquemas de regeneração inadequados; g) troca de materiais entre os melhoristas; h) satisfação dos melhoristas com a variabilidade genética encontrada nos materiais elites; i) dificuldade de identificar genes potencialmente úteis; j) ausência de programas de pré-melhoramento (*pre-breeding*).

A baixa utilização dos bancos de germoplasma é uma realidade mundial, não sendo restrita ao Brasil ou aos outros países em desenvolvimento. No Brasil, Nass *et al.* (1993) realizaram um levantamento entre 34 melhoristas de milho, dos setores público e privado, para avaliar o nível de utilização dos recursos genéticos disponíveis

TABELA 5. Avaliação dos melhoristas de milho sobre a utilização, qualidade e quantidade de informações dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma do Brasil.

Utilização	(%)	Qualidade	(%)	Quantidade	(%)
Regularmente	14	Excelente	7	Mais que suficiente	3
Raramente	68	Boa	24	Suficiente	27
Não utiliza	18	Adequada	35	Insuficiente	67
		Inadequada	34	Muito suficiente	3

Fonte: Nass *et al.*, 1993

nos bancos de germoplasma (Tabela 5). A utilização regular dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma é muito baixa (14% dos melhoristas), sendo que a quantidade de informações sobre esses acessos foi considerada, por 70% dos pesquisadores, como o fator mais limitante para sua utilização.

Deve-se enfatizar também, que a troca de materiais entre melhoristas é prática comum e constitui-se numa excelente alternativa para ampliar a variabilidade genética nos programas de melhoramento. Além disso, os pesquisadores geralmente encontram suficiente variabilidade genética entre os materiais elites (Duvick, 1984; Paterniani, 1987; Peeters & Galwey, 1988; Nass *et al.*, 1993). Troyer (1990) salientou que, no melhoramento de milho, as linhagens elites são consideradas as melhores fontes de germoplasma, simplesmente porque elas contêm as combinações genéticas superiores para produtividade, as quais satisfazem plenamente as necessidades do mercado.

Crossa *et al.* (1990) sugeriram o uso de coleções de germoplasma para desenvolver novas populações heteróticas via seleção recorrente recíproca, através da exploração da capacidade de combinação. Essas populações podem ser empregadas na obtenção de novas linhagens e híbridos, na introgressão de genes em outras populações heteróticas, ou ainda, no desenvolvimento de variedades de polinização livre superiores através do melhoramento intrapopulacional.

Duas alternativas promissoras para elevar o nível de utilização dos acessos mantidos nos bancos de germoplasma têm merecido a atenção tanto de pesquisadores que trabalham diretamente com recursos genéticos quanto de melhoristas: os programas de pré-melhoramento (*pre-breeding*) e as coleções nucleares (*core collections*).

5.1 PRÉ-MELHORAMENTO (PRE-BREEDING)

5.1.1 CONCEITO E IMPORTÂNCIA

A alternativa mais promissora para servir de elo de ligação entre os RGV e os programas de melhoramento é a intensificação das atividades relacionadas com o pré-melhoramento (Figura 1). De acordo com Nass & Nishikawa (2001) as principais contribuições dos programas de pré-melhoramento são: a) síntese de novas populações base; b) identificação de genes potencialmente úteis; c) identificação de novos padrões heteróticos; d) melhor conhecimento dos acessos *per se* e em cruzamentos; e) maior quantidade de informações sobre os acessos; f) auxílio no estabelecimento de coleções nucleares (*core collections*). Assim, é possivel afirmar que tais programas tendem a aumentar a probabilidade de utilização dos RGV. A carência desse tipo de programa foi considerada por Marshall (1989) como um dos principais fatores responsáveis pelo uso limitado das coleções de germoplasma.

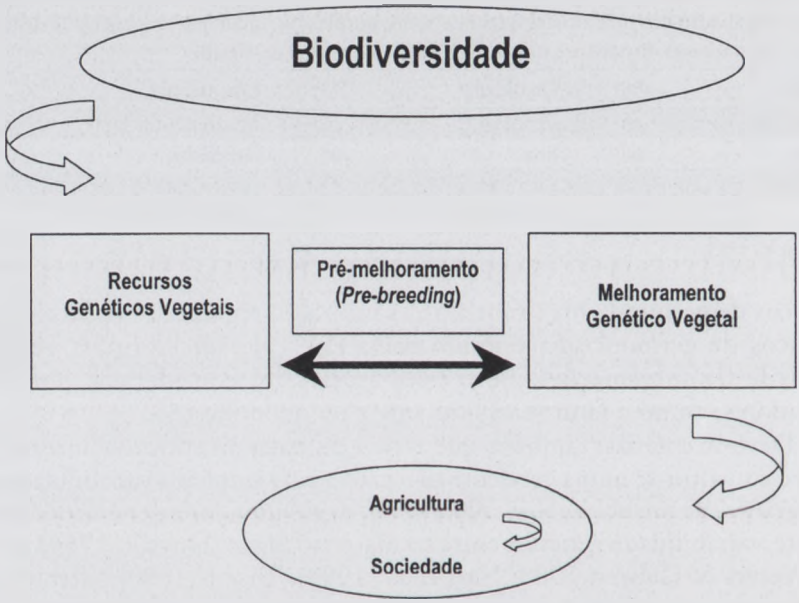


FIGURA 1. Pré-melhoramento como ponte entre os recursos genéticos vegetais e o melhoramento genético.

Nass & Paterniani (2000) conceituaram pré-melhoramento (*pre-breeding*) como o conjunto de atividades que visam à identificação de caracteres e/ou genes de interesse, presentes em materiais não adaptados (exóticos ou semi-exóticos) ou que não foram submetidos a qualquer processo de melhoramento, e sua posterior incorporação nos materiais adaptados de elevado potencial produtivo (elites).

Diferentes interpretações são encontradas na literatura para o termo exótico. Para fins de pré-melhoramento a definição mais adequada é apresentada por Hallauer & Miranda Filho (1988) onde germoplasma exótico inclui todos os materiais que não apresentam utilidade imediata sem uma seleção prévia para adaptação em uma determinada área. Nesse contexto, os materiais exóticos podem ser constituídos por raças, populações, variedades, linhagens, entre outros. Conseqüentemente, materiais semi-exóticos são oriundos do cruzamento de materiais exóticos com adaptados, onde diferentes proporções de introgressão podem ser obtidas e avaliadas. De acordo com Hallauer (1978), o procedimento mais comum em estudos com germoplasma exótico tem sido a avaliação de populações semi-exóticas. Para que resultados promissores sejam alcançados com materiais exóticos é preciso permitir suficiente recombinação genética acompanhada por seleção branda. O uso de germoplasma exótico no melhoramento é discutido em outro capítulo deste livro.

A biotecnologia pode contribuir para acelerar os programas de pré-melhoramento. O uso de mapas genéticos baseados em marcadores moleculares ligados a genes de interesse proporciona uma seleção mais rápida dos caracteres no germoplasma, agilizando sua incorporação nos materiais elites do programa de melhoramento (Callow *et al.*, 1997). Nesse contexto, a seleção assistida por marcadores moleculares terá papel relevante na eficiência dos programas de melhoramento no futuro (Kearsey, 1997).

Segundo Taba (1994), no caso do banco de germoplasma do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), o pré-melhoramento permitirá uma pronta utilização da coleção pelos melhoristas para a obtenção de caracteres específicos de interesse ou simplesmente servirá para ampliar a diversidade do germoplasma melhorado. Esse autor salientou que as coleções do Caribe serão prioritárias nos trabalhos de pré-melhoramento e que no banco de milho do CIMMYT já foi iniciada uma avaliação mais detalhada desse germoplasma, devido ao interesse manifestado pelos melhoristas tanto de clima tropical quanto temperado.

Obviamente, os trabalhos de pré-melhoramento deverão consumir tempo e recursos significativos. Para os melhoristas de empresas privadas, que geralmente são mais isolados e convivem com a necessidade de resultados a curto prazo, a utilização de exóticos será maior, caso já tenham sido submetidos aos programas de pré-melhoramento. No entanto, um fator decisivo para que tais programas sejam bem sucedidos, é a necessidade de estreita cooperação entre melhoristas dos setores público e privado (Smith & Duvick, 1989).

Várias são as alternativas para incorporar novas características nos materiais adaptados, sendo que a escolha da metodologia a ser empregada depende da natureza genética do caráter, do número de genes envolvidos, da herdabilidade do caráter, das interações com o ambiente, da facilidade de realização de cruzamentos e de técnicas ou protocolos disponíveis caso a biotecnologia seja empregada (Nass & Nishikawa, 2001).

O método do retrocruzamento é uma alternativa eficiente para a transferência de caracteres de herança simples e também tem sido utilizado na adaptação de germoplasma exótico. Além disso, com o emprego de marcadores moleculares pode-se abreviar o número de gerações de retrocruzamento para a introgressão de genes exóticos (Tanksley *et al.*, 1981), assim como a utilização de simulação computacional pode auxiliar na identificação de germoplasma com alelos superiores (Gerloff & Smith, 1988).

Outra possibilidade é o uso de dialelos, esquema que envolve todos os cruzamentos possíveis entre um determinado número de linhagens ou variedades. Tal metodologia tem sido amplamente utilizada, pois fornece dados que permitem a predição de médias e um conhecimento adequado das propriedades intrínsecas do material avaliado. Além disso, também possibilita a identificação de padrões heteróticos de interesse para exploração de híbridos.

5.1.2 PROGRAMAS DE PRÉ-MELHORAMENTO

As contribuições dos programas de pré-melhoramento podem ser melhor avaliadas por exemplos práticos, como resumidos a seguir.

O tomate é um exemplo excelente para ressaltar a importância dos parentes silvestres para aumentar a resistência aos estresses ambientais. Segundo Hoyt (1992) o tomate é a planta cultivada que mais se beneficiou dos genes existentes nos parentes silvestres, ressaltando que sem eles o tomate moderno não existiria. Na Tabela 6 são apresentadas algumas dessas fontes utilizadas no melhoramento do tomate. A conservação e o uso dos parentes silvestres para o melhoramento do tomate evidenciam a importância desses RGV e servem de modelo para outras culturas.

Em sorgo, Smith & Duvick (1989) salientaram a importância dessa iniciativa para o melhoramento, especialmente nos Estados Unidos da América e outras regiões de clima temperado. Um programa de pré-melhoramento foi desenvolvido com objetivo de adaptar os acessos de sorgo disponíveis nas coleções de germoplasma para as condições de clima temperado. Esse programa foi conduzido com parceria entre a *Texas A. & M. University*, o *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics* (ICRISAT) e alguns melhoristas do setor privado, proporcionando um avanço significativo no melhoramento de sorgo pela incorporação de germoplasma exótico. Foram identificados acessos com resistência às principais pragas e doenças (China), com melhor qualidade de grão (Índia), tolerantes a seca e com melhor estabilidade (África).

Em milho, um exemplo relevante de programa de pré-melhoramento foi o *Latin American Maize Project* (LAMP), com participação de 12 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Chile, Estados Unidos, Guatemala, México, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela). Esse projeto teve por objetivo avaliar, para uso futuro, as características agronômicas dos acessos de milho mantidos nos bancos de germoplasma desses países. Na primeira etapa foram avaliados cerca de 15.000 acessos, através de um esforço conjunto de melhoristas dos setores público e privado. Os resultados obtidos permitiram determinar com maior precisão a situação atual dos bancos de germoplasma, o número de acessos por banco, a quantidade e qualidade das sementes por acesso e a relação dos acessos que necessitavam ser regenerados.

Pollak (1993) apresentou os resultados da avaliação de 562 acessos da coleção de milho originário do Caribe. Essa avaliação foi conduzida em Porto Rico e fez parte das duas etapas iniciais do LAMP. Após a primeira avaliação foram selecionados

TABELA 6. Parentes silvestres e características de interesse para o melhoramento do tomate.

Fonte	Caracteres de Interesse
Lycopersicon peruvianum	Resistência a várias pragas; rica fonte de vitamina C.
Lycopersicon pennellii	Resistência a seca; aumenta teores de vitaminas A e C e de açúcares.
Lycopersicon pimpinellifolium	Resistência a doenças, menor acidez, cor intensa, maior conteúdo de vitaminas e sólidos solúveis.
Lycopersicon esculentum var. *cerasiforme*	Resistência a altas temperatura e umidade, a fungos que atacam as folhas e raízes.
Lycopersicon chmielewskii	Intensidade da cor do fruto e alto teor de açúcar.
Lycopersicon chilense	Resistência a seca.
Lycopersicon chesmanii	Tolerância a água do mar e pedúnculos sem articulações.
Lycopersicon hirsutum	Resistências a insetos, ácaros, vírus e outras doenças; tolerância ao frio.
Lycopersicon parviflorum	Intensidade na cor dos frutos e altos teores de sólidos solúveis.

Fonte: Hoyt (1992).

20% dos acessos com base na produção de grãos. A produção de grãos destes acessos variou de 3.937 a 7.773 kg ha^{-1}, sendo que 18 acessos foram mais produtivos que a variedade local melhorada "Diente de Caballo", utilizada como testemunha em ambas as avaliações. Foram identificados acessos com boa produção de grãos e boa qualidade de espiga para utilização no Caribe e em outros programas de melhoramento em ambientes tropicais.

No Brasil, cerca de 1.111 acessos preencheram as condições exigidas pelo LAMP (mínimo de 1 Kg de sementes e poder germinativo > 75%), sendo que todos esses acessos são adaptados para altitudes inferiores a 2.000m. Na Tabela 7 são apresentados os acessos selecionados após dois anos de avaliações em diferentes ambientes no Brasil.

Outra iniciativa para o enriquecimento da variabilidade genética em milho, em desenvolvimento, é o *Germplasm Enhancement of Maize* (GEM), que tem por objetivo incorporar germoplasma de origem tropical nas linhagens elites de milho dos Estados Unidos da América. Os 58 acessos de milho mais promissores selecionados pelo LAMP estão sendo utilizados no GEM. Os acessos selecionados foram enviados para as empresas de sementes que efetuaram os cruzamentos desses acessos com as linhagens elites de cada empresa. Os cruzamentos (50% germoplasma exótico) foram avaliados para produção, doenças e características especiais (amido, proteína e óleo). Sementes remanescentes desses cruzamentos foram enviadas para outro colaborador para novos cruzamentos (25% germoplasma exótico) e avaliadas para as mesmas características anteriores. Após essas avaliações, os cruzamentos superiores identificados serão submetidos a autofecundações e posterior formação de sintéticos. Os materiais resultantes dessa iniciativa serão mantidos e distribuídos pelo GEM, cuja coordenação está sob responsabilidade da Dra. Linda Pollak, em Ames (Iowa) nos Estados Unidos da América.

No Brasil, o início da década de 90 foi marcado pelo incremento da ocorrência de doenças foliares na cultura do milho. Como salientado por Pereira (1995) o conhecimento do comportamento dos materiais, associado à região e época de plantio favoráveis aos patógenos, é de fundamental importância no controle das principais doenças do milho.

Diante desse quadro preocupante foi estabelecido, o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Milho (NAP-MILHO) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), composto por instituições públicas e privadas, que realizou uma ampla avaliação do germoplasma de milho disponível no Brasil para as principais doenças foliares. Neste estudo foram avaliados aproximadamente 1.300 acessos e 140 populações com algum grau de melhoramento genético, em 12 locais representativos da cultura no país. As doenças consideradas nesse projeto foram: mancha por *Exserohilum turcicum* (*Exserohilum turcicum*), ferrugem polysora (*Puccinia polysora*), ferrugem branca ou tropical (*Physophela zeae*), mancha por *Phaeosphaeria* (*Phaeosphaeria maydis*) e enfezamentos e viroses do milho (micoplasma/espiroplasma e viroses). Miranda Filho *et al.* (2000) apresentaram os resultados das avaliações dos acessos pelo NAP-MILHO. A partir dos materiais promissores identificados foram sintetizadas novas populações com alta concentração de genes para resistência às respectivas doenças.

As perspectivas dos programas de pré-melhoramento em milho são discutidas em detalhes nos trabalhos de Nass (1999) e Nass & Paterniani (2000).

TABELA 7. Características dos acessos de milho selecionados nos estágios I e II do LAMP no Brasil. #

Código do Acesso	Identificação	Florescimento Masc. (dias)	Florescimento Fem. (dias)	Altura Planta (cm)	Altura Espiga (cm)	Produção (Kg ha^{-1}) 15% umidade	Coloração do Grão
BRA 024767	Brasil 2296	67	73	185	100	3.547	Amarelo
BRA 054241	Asteca	59	65	190	115	3.469	Amarelo
BRA 044369	31136 Comp	64	69	140	60	3.183	Amarelo
BRA 044318	31116 Comp	69	73	150	75	3.150	Amarelo
BRA 053627	Caiano	69	72	185	115	2.938	Amarelo
BRA 028029	CMS 06	70	71	227	97	6.908	Amarelo
BRA 031381	Tuxpeño 1	70	72	199	78	5.988	Branco
BRA 051501	PE 011*	-	71	225	125	3.214	Amarelo
BRA 050598	AL 015	-	69	210	115	3.106	Amarelo
BRA 051675	PE 027	-	67	215	105	3.015	Amarelo
BRA 050024	Comp. Manaus*	-	70	210	125	2.990	Amarelo
BRA 052060	SE 033	-	74	210	125	2.965	Amarelo
BRA 051721	RN 004	-	67	220	120	3.068	Amarelo
BRA 051764	SE 003	-	72	245	140	3.000	Amarelo
BRA 052019	SE 028	-	69	210	130	2.892	Amarelo
BRA 052051	SE 032	-	-	240	150	2.328	Laranja
BRA 051501	PE 011*	60	61	294	148	6.873	Amarelo
BRA 030929	BA 157	62	65	274	151	5.508	Amarelo
BRA 051039	BA 038	62	62	256	125	5.857	Amarelo
BRA 052957	Flint Comp	61	62	263	135	5.362	Amarelo
BRA 050024	Comp. Manaus*	59	61	239	109	6.101	Amarelo
BRA 051403	PE 001	64	63	241	131	4.924	Laranja
BRA 044083	Comp. Jaiba III	61	62	228	115	5.473	Amarelo
BRA 043915	CMS 0508 III	65	67	208	88	3.950	Amarelo

*Acessos selecionados em dois ambientes
#Fonte: Santos, M.X. (Comunicação Pessoal)

5.2 COLEÇÕES NUCLEARES (CORE COLLECTIONS)

A existência de programas bem sucedidos de pré-melhoramento deverá contribuir efetivamente com uma grande quantidade de informações para o estabelecimento de coleções nucleares (*core collections*).

A idéia de organizar coleções nucleares surgiu no início da década de 80, quando Frankel, enfatizou a necessidade de reduzir o tamanho das coleções de germoplasma existentes (Brown, 1989a). A coleção nuclear tem por objetivo principal representar a diversidade genética da espécie e seus parentes silvestres com o mínimo de repetitividade. Com base na teoria estatística dos alelos neutros, Brown (1989a) sugeriu que 10% do total dos acessos disponíveis representa aproximadamente 70% da variabilidade genética da coleção e, no caso de coleções muito grandes, a coleção nuclear não deve exceder 3.000 entradas.

Deve-se ressaltar que o estabelecimento destas coleções não interfere no papel estratégico das coleções de base como repositório maior da variabilidade genética existente (Brown, 1989a,b; Vilela-Morales *et al.*, 1997). Vilela- Morales (1995) enfatizou dois aspectos estratégicos na organização da coleção nuclear: a) as atividades de recursos genéticos e, principalmente, o estabelecimento de coleções nucleares são ações tipicamente interinstitucionais; b) seu enfoque sistêmico, o qual permite considerar os diferentes aspectos do conhecimento relacionado com a diversidade genética.

Na formação da coleção nuclear algumas informações são de fundamental importância, entre elas: dados de origem dos acessos; dados de caracterização incluindo informações taxonômicas e de marcadores moleculares e dados de avaliação de caracteres agronômicos. Aspectos teóricos e práticos sobre coleção nuclear são amplamente discutidos por Frankel & Brown (1984) e Brown (1989a,b), os quais sugerem alternativas para a adequada estratificação dos acessos com base em características morfológicas e agronômicas. Crossa *et al.* (1994) consideraram como essencial na estratificação, o conhecimento do número ótimo de acessos para conservar a maioria dos alelos presentes na coleção e a utilização de critérios adequados para a distribuição dos acessos nos respectivos estratos. As análises multivariadas constituem-se em excelentes ferramentas para auxiliar na estratificação dessas coleções (Brown, 1989a; Crossa, 1994; Taba *et al.*, 1994; Diwan *et al.*, 1995).

Diversas coleções nucleares têm sido desenvolvidas (Tabela 8), entretanto, há necessidade de validar essas coleções, no sentido de verificar se realmente estão representando a variabilidade existente nas respectivas coleções de base.

Talvez a característica mais importante da coleção nuclear seja seu aspecto dinâmico, permitindo que após seu estabelecimento e validação, novos acessos sejam incorporados ou excluídos. Desta forma, caso sejam identificados acessos com características de interesse não presentes na composição inicial da coleção nuclear, basta introduzi-los no conjunto. Destaca-se também a reduzida probabilidade da coleção nuclear manter acessos muito semelhantes, obviamente esse fato está diretamente relacionado aos critérios utilizados na sua estratificação. Vilela-Morales *et al.* (1997) destacaram três vantagens da coleção nuclear em relação a coleção ativa:

TABELA 8. Exemplos de coleções nucleares (*core collections*).

Cultura	Referência
Alfafa	Basigalup *et al.* (1995)
Amendoim	Holbrook *et al.* (1993)
Couve	Boukema *et al.* (1997)
Ervilha	Simon & Hannan (1995)
Grão-de-bico	Hannan *et al.* (1994)
Lentilha	Erskine & Muehlbauer (1991)
Mandioca	Cordeiro *et al.* (1995)
Milho	Taba *et al.* (1994)
Milho	Abadie *et al.* (1998)
Milho	Taba *et al.* (1999)
Trevo	Kouame & Quesenberry (1993)

a) níveis menores de duplicação e redundância genética; b) níveis mais expressivos de acessos com informações sobre identificação ou passaporte, de caracterização e avaliação; c) menor número de acessos e menor custo operacional, apresentando, conseqüentemente, maiores chances do germoplasma ser utilizado.

O CIMMYT tem realizado vários esforços no sentido de desenvolver metodologia para o estabelecimento de coleções nucleares em milho. Na literatura estão disponíveis os resultados obtidos com a raça Tuxpeño (Crossa *et al.*, 1994; Taba *et al.*, 1994), sendo que as estratégias de amostragem e as técnicas multivariadas apresentam-se como ferramentas indispensáveis no processo de formação destas coleções. Crossa *et al.* (1994) enfatizaram que a caracterização do germoplasma da coleção nuclear por marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs) e enzimáticos deve contribuir com informações adicionais que, juntamente com dados morfológicos, geográficos e agronômicos, podem auxiliar na avaliação da diversidade genética e modificar a composição inicial da coleção nuclear.

No Brasil, até o momento, ainda são incipientes as ações visando ao estabelecimento de coleções nucleares. Entretanto, esta linha de pesquisa tem merecido atenção prioritária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que juntamente com outros parceiros e em uma primeira etapa, estabeleceu coleções nucleares de mandioca (Cordeiro *et al.*, 1995) e de milho (Abadie *et al.*, 1997; 1998; Taba *et al.*, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, T.; MAGALHÃES, J.R.; PARENTONI, S.N.; CORDEIRO, C.; ANDRADE, R.V. Uma coleção núcleo de germoplasma de milho do Brasil. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.165, 1997. Suplement.

ABADIE, T.; MAGALHÃES, J.R.; CORDEIRO, C.; PARENTONI, S.N.; ANDRADE, R.V. A classification for Brazilian maize landraces. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.114, p.43-44, 1998.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. London: John Wiley, 1960.

BASIGALUP, D.H.; BARNES, D.K.; STUCKER, R.E. Development of a core collection for perennial *Medicago* plant introductions. **Crop Science**, v.35, p.1163-1168, 1995.

BATISTA, M.F.; FONSECA, J.N.L.; TENENTE, R.C.V.; MENDES, M.A.S.; URBEN, A.F.; OLIVEIRA, M.R.V.; FERREIRA, D.N. Intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.6, p.32-39, 1998.

BOUKEMA, I.W.; VAN HINTUM, T.J.L.; ASTLEY, D. The creation and composition of the *Brassica oleracea* core collection. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.111, p.29-32, 1997.

BROWN, A.D.H. The case for core collections. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. Cambridge: University Press, 1989a. p.136-156.

BROWN, A.H.D. Core collections: a practical approach to genetic resources management. **Genome**, v.31, p.818-824, 1989b.

COOPER, H.D.; SPILLANE, C.; KERMALI, I; ANYSHETY, N.M. Harnessing plant genetic resourses for sustainable agriculture. **Plant Genetic Resourses Newsletter**, n.114, p.1-8, 1998.

CORDEIRO, C.M.T.; VILELA-MORALES, E.A.; FERREIRA, P.; ROCHA, D.M.S.; COSTA, I.R.S.; VALOIS, A.C.C.; SILVA, S. Towards a Brazilian core collection of cassava. In: HODGKIN, T.; BROWN, A.D.H.; Van HITUM, T.J.L.; VILELA-MORALES, E.A. (Ed.) **Core collections of plant genetic resources**. New York: John Wiley, 1995. p.155-167.

COSTA, I.R.S. Documentação e informatização de recursos genéticos. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

CROSSA, J. Statistical genetics in genetic resources conservation. In: TABA S. (Ed.) **The CIMMYT maize germplasm bank:** genetic resources, preservation, regeneration, maintenance, and use. Mexico, 1994. p.50-51. (Maize Program Special Report)

CROSSA, J.; TABA, S.; WELLHAUSEN, E.J. Heterotic patterns among Mexican races of maize. **Crop Science**, v.30, p.1182-1190, 1990.

CROSSA, J.; TABA, S.; EBERHART, S.A.; BRETTING, P.; VENCOVSKY, R. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.89-95, 1994.

DIWAN, N.; McINTOSH, M.S.; BAUCHAN, G.R. Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.755-761, 1995.

DODDS, J.H.; WATANABE, K. Biotechnical tools for plant genetic resourses management. **Diversity**, v.6, p.26-28, 1990.

DUVICK, D.N. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve. **Economic Botany**, v.38, p.161-178, 1984.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p.1167-1174, 1990.

ERSKINE, W.; MUEHLBAUER, F.J. Allozyme and morphological variability, outcrossing rate and core collection formation in lentil germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.119-125, 1991.

ESQUINAS-ALCÁZAR, J.T. Plant genetic resources. In: HAYWARD, M.D.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. (Ed.) **Plant breeding**: principles and prospects. London: Chapman & Hall, 1993. p.33-51.

FALAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; FERREIRA, F.R.; GONDIM, M.T.P.; WETZEL, M.M.V.S.; MENDES, R.A.; GOES, M.; MIRANDA, A.R. **Manual de procedimentos para conservação de germoplasma-semente a longo prazo na Embrapa**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 21p. (Documentos, 30).

FAO. **Global plan of action for the consernation and sustainable utilization of plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 1996.

FRANKEL, O.H. Genetic conservation in perspective. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford: Blackwell, 1970. p.469-489.

FRANKEL, O.H. Principles and strategies of evaluation. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. London: Cambrigde University Press, 1989. p.245-260.

FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford: Blackwell, 1970. 554p.

FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. **Plant genetic resourses for today and tomorrow**. London: Cambridge University Press, 1975.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D. Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **Crop genetic resources**: conservation and evaluation. London: George Allen & Unwin, 1984. p.249-257.

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. **Plant genetic resources**: an introduction to their conservation and use. Moulton: Castlefield Press, 1986. 146p.

GERLOFF, J.E.; SMITH, O.S. Choice of method for identifying germplasm with superior alleles: 2. Computer simulation results. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.217-227, 1988.

GIACOMETTI, D. Introdução e intercâmbio de germoplasma. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1988a. p.43-55.

GIACOMETTI, D. Descritores para caracterização e avaliação. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1988b. p.129-134.

GOEDERT, C.O. Conservação de germoplasma-semente. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1988. p.78-95.

GOODMAN, M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving. **Journal of Heredity**, v.81, p.11-16, 1990.

GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Ed.) **Collecting plant genetic diversity**. Wallingford, 1995. 748p.

GUEDES, A.C.; GOEDERT, C.O.; BUSTAMANTE, P.G.; MOREIRA, J.R.A. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**: artigo 9; conservação *ex situ* no Brasil. Brasília: MMA, 1998. p.1-43.

HALLAUER, A.R. Potential of exotic germplasm for maize improvement. In: WALDEN, D.B. (Ed.) **Maize breeding and genetics**. New York: John Wiley, 1978. p.229-247.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa University Press, 1988. 468p.

HANNAN, R.M.; KAISER, W.J.; MUEHLBAUER, F.J. Development and utilization of the USDA chickpea core collection. **Agronomy Abstracts**. Madison: ASA, 1994. p.217.

HARRINGTON, J.F. Seed and pollen storage for conservation of plant gene resources. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) **Genetic resources in plants**: their explorattion and conservation. Oxford: Blackwell, 1970. p.501-521.

HEISER JR., C.B. **Sementes para a civilização**: a história da alimentação humana. São Paulo: EDUSP, 1977. 253p.

HOLBROOK, C.C.; ANDERSON, W.F.; PITTMAN, R.N. Selection of a core collection from the U.S. germplasm collection of peanut. **Crop Science**, v.33, p.859-861, 1993.

HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. **Crop genetic resources**: conservation and evaluation. London: George Allen & Unwin, 1984. 296p.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 1992. 52p.

HOWES, C. Guidelines for developing descriptor lists. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.45, p.26-32, 1981.

IBPGR. **Report of the third external review of the International Board for Plant Genetic Resources**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 85p.

INSTITUTO DE RECURSOS MUNDIAIS. **A estratégia global da biodiversidade.** Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 1992. 1v.

KOUAME, C.N.; QUESENBERRY, K.H. Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.40, p.39-47, 1993.

LACY, W.B. The global plant genetic resourses system: a competition-cooperation paradox. **Crop Science**, v.35, p.335-345, 1995.

LLERAS, E. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1988. p.23-42.

LYMAN, J.M. Progress and planning for germplasm conservation of major food crops. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.60, p.3-21, 1984.

MARSHALL, D.R. Limitations to the use of germplasm collections. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.105-120.

McNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.V.; MITTERMEIER, R.A.; WERNER, T.B. **Conserving the world's biological diversity**. Gland: IUCN; Washington: IUCN, WRI, CI, WWF-US, World Bank, 1990. 193p.

MIRANDA FILHO, J.B.; NASS, L.L.; SANTOS, M.X.; REGITANO NETO, A. **Avaliação de acessos de milho para resistência a doenças foliares**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 147p. (Circular Técnica, 3)

NASS, L.L. Pré-melhoramento em milho (*Zea mays* L.). In: MARIANTE, A.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Ed.) SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

NASS, L.L.; NISHIKAWA, M.A.N. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: GOES, M. (Org.) **Tópicos em recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. /No Prelo/

NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, p.581-587, 2000.

NASS, L.L.; PELLICANO, I.J.; VALOIS, A.C.C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v.16, p.983-988, 1993.

PARKS, J.S. Genetic minimum distance for corn: an update from the ASTA corn variety identification subcommitte. In: ANNUAL CORN AND SHORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 48., Chicago, 1993. **Proceedings**. Washington: American Trade Association, 1993. p.16-29.

PATERNIANI, E. An evaluation of the genetic diversity in the varieties currently utilized. In: PLANT Breeding Research Forum; report 1985. Caracas, 1987. p.45-58.

PATERNIANI, E. Diversidade genética em plantas cultivadas. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal, FCAV/UNESP, 1988. p.75-77.

PEETERS, J.P.; WILLIAMS, J.T. Towards better use of genebanks with special reference to information. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.60, p.22-32, 1984.

PEETERS, J.P.; GALWEY, N.W. Germplasm collections and breeding needs in Europe. **Economic Botany**, v.42, p.503-521, 1988.

PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual de doenças de milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18., Piracicaba, 1995. **Anais**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. p.61-66.

PLUCKNETT, D.L.; SMITH, N.J.H.; WILLIAMS, J.T.; ANISHETY, N.M.I. **Gene banks and the world's food**. Princeton: University Press, 1987. 247p.

POLLAK, L.M. Evaluation of Caribbean maize accessions in Puerto Rico. **Tropical Agriculture**, v.70, p.8-12, 1993.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**: abordagem sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. 206p.

RAO, V.R.; RILEY, K.W. The use of biothecnology for conservation and utilization of plant genetic resourses. **Plant Genetic Resourses Newsletter**, n.97, p.3-20, 1994.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. The implications of deterioration of orthodox seeds during storage for genetic resources conservation. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **Crop genetic resources**: conservation and evaluation. London: George Allen & Unwin, 1984. p.18-37.

ROBERTS, E.H.; KING, M.W.; ELLIS, R.H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **Crop genetic resources**: conservation and evaluation. London: George Allen & Unwin, 1984. p.38-52.

SALHUANA, W. Strategies for increasing the use of germplasm. In: PLANT Breeding Research Forum; report 1985. Caracas, 1987. p.141-172.

SIMON, C.J.; HANNAN, R.M. Development and use of core subsets of cool-season food legume germplasm collections. **HortScience**, v.30, p.907, 1995.

SMITH, J.C.S.; DUVICK, D.N. Germplasm collections and the private plant breeder. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T(Ed.) **The use of plant genetic resources**. London: Cambrigde University Press, 1989. p.17-31.

TABA, S. (Ed.) **The CIMMYT maize germplasm bank**: genetic resources, preservation, regeneration, maintenance, and use. Mexico, 1994. p.52-59: The future: needs and activities. (Maize Program Special Report)

TABA, S.; PINEDA,F.E.; CROSSA, J. Forming core subsets from the Tuxpeno race complex. In: TABA S. (Ed.) **The CIMMYT maize germplasm bank**: genetic resources, preservation, regeneration, maintenance, and use. Mexico,1994. p.60-81. (Maize Program Special Report)

TABA,S.; DÍAZ, J.; RIVAS, M. Evaluation of dent maize races from Brazil to develop a core subset. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. /CD-ROM/

TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomate – basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.291-296, 1981.

TROYER, A.F. A retrospective view of corn genetic resources. **Journal of Heredity**, v.81, p.17- 24, 1990.

VALLS, J.F.M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal, FCAV/ UNESP, 1988. p.106-128.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1986. 15p. (Boletim de Pesquisa, 1).

VILELA-MORALES, E.A. Documentação e informática de recursos genéticos. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1988. p.135-147.

VILELA-MORALES, E.A. Genepools e core collections como estratégias para conservação e uso dos recursos genéticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., Campinas, 1995. **Resumos**. Campinas: IAC; Brasília: CENARGEM, 1995. p.7-8.

VILELA-MORALES, E.A. Princípios genéticos da informação para recursos genéticos vegetais. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 8p. /CD-ROM/

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa, SPI; Cenargen, 1997. 78p.

WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B. **Fundamentos para a coleta de germplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2001. /No Prelo/

WILLIAMS, J.T. Pratical considerations relevant to effective evaluation. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. London: Cambrigde University Press, 1989. p.235-244.

3

O PROCESSO EVOLUTIVO E O MELHORAMENTO DE PLANTAS

ALEXANDRE SIQUEIRA GUEDES COELHO
FABRIZIO D'AYALA VALVA

Lab. de Genética Vegetal - Depto. de Biologia Geral - ICB/UFG, C.P. 131 - CEP: 74001-970 - Goiânia, GO.

1. INTRODUÇÃO

"É, pois, da mais alta relevância esclarecer quais são os meios de modificação e co-adaptação. No início de minhas observações pareceu-me provável que o exame atento dos animais domésticos e das plantas cultivadas ofereceria o campo mais propício a estudos que elucidassem tão obscuro problema. Não me enganei; reconheci, com efeito, que nossos conhecimentos sobre as variações no estado doméstico, por mais imperfeitos que sejam, fornecem-nos sempre a explicação mais simples e menos passível de erro. Seja-me permitido expressar a minha convicção de que estes estudos têm a máxima importância, embora, muito comumente, eles tenham sido negligenciados pelos naturalistas." (Darwin, A Origem das Espécis)

A importância de se relacionar os processos que ocorrem ao longo de um programa de melhoramento genético, sob condições controladas pelo Homem, com aqueles presentes no processo evolutivo, sob a ação das forças da Natureza, pode ser encontrada na obra do próprio Darwin, que sempre demonstrou um grande interesse na ação da seleção humana sobre as plantas e os animais. Hoje, mesmo reconhecendo a inegável contribuição de estudos realizados com espécies domesticadas para a observação de fenômenos evolutivos que dificilmente poderiam ser verificados sob condições naturais em tempo hábil, podemos dizer que os conhecimentos adquiridos ao longo da construção da moderna Teoria Sintética da Evolução têm muito a contribuir para a prática do melhoramento genético de plantas.

O desenvolvimento da Teoria Sintética da Evolução tem levado a uma completa revisão dos nossos conceitos sobre o processo de domesticação de plantas, hoje concebido como um processo coevolutivo, e tem possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela dinâmica das populações de plantas cultivadas, incluindo aspectos como a evolução da adaptação das pragas aos pesticidas, a plasticidade fenotípica, entre outros.

É conveniente que o melhorista tenha uma visão ampla das principais etapas e tendências que caracterizaram a evolução das plantas e das mudanças que ocorreram naquelas que passaram a ser utilizadas pelo Homem. A utilização de certas plantas pelo Homem deu origem a um processo de coevolução que as tornou de tal maneira dependentes de um ambiente artificial – o agroecossistema – que a maioria delas não consegue mais sobreviver na Natureza longe da ação humana. Este processo de domesticação fez com que estas plantas deixassem de apresentar muitas de suas características originais que garantiram no passado a continuidade da sua adaptação ao ambiente natural, sempre altamente competitivo e imprevisível. Neste contexto, o estudo das plantas na Natureza e sob domesticação nos permite avaliar o poder e os limites da seleção artificial, quando ela apóia ou contraria as tendências evolutivas que moldaram as plantas atuais dentro das imposições das restrições históricas e de desenvolvimento.

Do ponto de vista teórico, o melhoramento genético de plantas é um processo que exige um conhecimento básico, tanto acerca do organismo a ser modificado, quanto dos mecanismos que podem ser utilizados para se realizar estas modificações no sentido desejado, ainda que a necessidade de se compreender as possíveis alterações decorrentes destas modificações, na Natureza e no próprio Homem, não seja algo que possa ser relegado a um segundo plano.

De qualquer modo, se o intuito é a obtenção de um conjunto de indivíduos com características fenotípicas desejáveis, e se a estratégia a ser utilizada para se alcançar este objetivo é a alteração da constituição genética deste conjunto, torna-se necessário o conhecimento de como se dá o controle genético do caráter de interesse nos organismos em questão. A obtenção deste conhecimento básico, muitas vezes extremamente complexo por envolver a compreensão da ação e interação de inúmeros fatores tanto genéticos quanto ambientais, é tema de diversos capítulos deste livro, e certamente representa um dos grandes desafios da Genética moderna.

Do mesmo modo, é preciso que sejam conhecidos os diferentes mecanismos que podem ser utilizados para se realizar as alterações genéticas no sentido pretendido. Estes mecanismos, capazes de alterar a constituição genética de um determinado indivíduo ou de um conjunto de indivíduos, são, sob certos aspectos, precisamente os mesmos mecanismos atuantes na Natureza ao longo dos processos evolutivos. Os fatores responsáveis pelo processo evolutivo são, portanto, também aqueles que o melhorista utiliza para realizar o seu trabalho. O adequado conhecimento da influência de cada um destes fatores, dos seus efeitos nas propriedades genéticas dos indivíduos e das populações, deve, portanto, ser dominado para que o melhorista saiba planejar e executar as alterações genéticas necessárias para o cumprimento de seus objetivos de modo consciente.

2. AS ORIGENS E O DESENVOLVIMENTO DA TEORIA SINTÉTICA DA EVOLUÇÃO

A compreensão dos mecanismos responsáveis por modificações genéticas que podem levar à origem de novas espécies tem sido um dos grandes desafios da Biologia. Mesmo à luz das modernas técnicas de Biologia Molecular, de manipulação de registros fósseis e de simulação de modelos computacionais, muitas questões permanecem ainda sem uma resposta definitiva, particularmente no que diz respeito à magnitude relativa entre o papel do acaso e de processos estocásticos, em contraposição àquele desempenhado pelos processos determinísticos e sistemáticos da seleção natural, sobre o desenvolvimento de características adaptativas nas diferentes formas de vida. Ao mesmo tempo em que o papel da seleção natural no desenvolvimento de características adaptativas nos diversos organismos é bastante reconhecido, é cada vez mais evidente a importância do acaso neste processo, já que, em geral, o caminho a ser percorrido em busca de um estado fenotípico de maior valor adaptativo é fortemente influenciado pela constituição prévia dos indivíduos, por sua vez, em grande parte, decorrente de eventos históricos de natureza aleatória.

São bem conhecidas as dificuldades que Darwin e Wallace encontraram em expor suas idéias sobre a importância da seleção natural no processo evolutivo. A própria idéia de que os seres vivos evoluem, e de que os organismos que existem

atualmente representam variações de diferentes séries evolutivas, parece, ainda hoje, não ter se desvencilhado de obstáculos de cunho religioso e ideológico. Ainda assim, a real compreensão das causas da evolução, para não mencionar, o porque de sua existência, não é uma obra terminada e nossa visão deste processo ainda continua em franco desenvolvimento.

Lamarck foi provavelmente o primeiro a contestar seriamente a idéia da fixidez das espécies, embora a idéia sobre a existência de evolução seja bem anterior a ele. Até então a visão corrente era a de que as espécies seriam unidades biológicas fixas, frutos da criação divina. Todas as formas de variação encontradas na Natureza representariam imperfeições diante de formas ideais, imutáveis, que se constituiriam na "essência" de cada espécie. Esta visão Creacionista só foi seriamente abalada pela obra de Darwin e Wallace que veio a propor um novo paradigma para a origem das espécies, desta vez, de modo diferente do que fez Lamarck, com base em exaustivas observações realizadas sobre diversas espécies em diversas partes do mundo.

Segundo Darwin e Wallace, a partir de uma variação pré-existente entre os indivíduos de uma determinada espécie, sendo a quantidade de indivíduos produzidos a cada geração muito superior àquela suportada pelos recursos necessários à sobrevivência, formas melhor adaptadas apresentariam uma maior probabilidade de sobreviver e de deixar descendentes. Estas formas seriam portanto transmitidas à geração seguinte. Por outro lado, indivíduos portadores de características com baixa adaptabilidade, sucumbiriam à pressão exercida pela competição e seriam eliminados. Darwin e Wallace propuseram que a reprodução diferencial das diferentes formas levaria, ao longo das gerações, a um acúmulo de modificações que resultariam na formação de uma nova espécie. Esta hipótese, então denominada de hipótese da seleção natural, representa um marco no sentido da construção de um modelo adequado para se explicar a evolução e a origem das espécies.

Grande parte das críticas sérias dirigidas à esta teoria diziam respeito ao fato de que ela não conseguia explicar a origem das variações que se constituiriam na matéria prima para o processo evolucionário. De fato, Darwin não conseguiu apresentar uma explicação convincente sobre como se dava a renovação da variabilidade, que devido à ação da seleção natural e à mistura das formas selecionadas, como ele supunha, deveria se reduzir com o passar das gerações.

A explicação para este fato, no entanto, estava nos resultados dos trabalhos de Mendel, ainda que, quando da sua redescoberta por Hugo de Vries, Carl Correns e Von Tschermak, em 1900, foram interpretados como uma evidência contrária à hipótese da seleção natural. O início do século XX foi então marcado por um intenso debate, de natureza muitas vezes pessoal (ver Provine, 1971), entre os chamados biometristas (darwinistas) e os mendelianos, liderados por William Bateson. Foi durante os anos 20, com os trabalhos pioneiros de Fisher, Wright e Haldane, que uma síntese, abrigando a teoria evolutiva de Darwin e a aparente contradição imposta pelos processos descritos por Mendel, passou a ser desenvolvida. Neste período são importantes as contribuições de Chetverikov que reconheceu o papel dos mecanismos de interação gênica ao rejeitar enfaticamente a noção de vários genes agindo de forma independente com um valor adaptativo constante. Em seus trabalhos, Chetverikov apresenta a idéia de que cada característica herdada deve ser determinada não só por

um gene, mas por um agregado de genes, ou seja, um complexo gênico, e que um mesmo gene pode se manifestar diferentemente, dependendo do complexo em que se encontre (Torggler *et al.*, 1995). Nos anos 30 e 40, foram fundamentais as contribuições realizadas por T. Dobzhansky, E. Mayr, J. S. Huxley, G. G. Simpson e G. L. Stebbins. Estes autores passaram a construir a moderna Teoria Sintética da Evolução, que reconheceu de modo coerente a participação de diferentes mecanismos no processo evolutivo (Nicklas, 1997).

De acordo com a Teoria Sintética da Evolução, o processo evolutivo se dá sobre uma variabilidade genética que tem origens nas mutações, envolvendo as próprias unidades básicas da informação genética (mutações de ponto), ou fragmentos de tamanho variável de DNA (deleções, inserções, translocações etc.) e muitas vezes cromossomos e genomas inteiros. Sobre esta variabilidade, que pode ser amplificada por mecanismos de recombinação presentes nos ciclos sexuais, atuam os processos de seleção e aqueles decorrentes da ação do acaso. Estes processos, que tendem a aumentar a divergência genética das populações, têm sua ação atenuada pela ocorrência de fluxo gênico entre estas unidades, sendo que a diferenciação ao nível de espécies dificilmente poderá ocorrer, a não ser que um determinado nível crítico de isolamento reprodutivo possa ser estabelecido.

3. OS MECANISMOS EVOLUTIVOS - AS FERRAMENTAS DO MELHORISTA

Dentre os diferentes mecanismos evolutivos atualmente reconhecidos, a seleção se destaca pelo seu caráter previsível, no sentido de que seus efeitos podem ser preditos teoricamente tanto em magnitude quanto em direção. Trata-se, certamente, do mecanismo evolutivo mais utilizado pelo Homem para realizar as modificações genéticas desejadas nos programas de melhoramento.

Para que se possa compreender as diferentes formas pelas quais a seleção pode modificar a constituição genética das populações é preciso que se tenha em mente que, em uma população, os indivíduos apresentam formas variáveis de um mesmo caráter, que por sua vez podem ser representadas sob a forma de distribuições de freqüência dos diferentes valores fenotípicos. Estas distribuições, que demonstram a freqüência com que os diferentes valores de um determinado caráter ocorrem na população, em geral apresentam, para os caracteres quantitativos, um comportamento semelhante ao da distribuição Normal de Gauss, como representado na Figura 1.

A seleção pode atuar sobre a constituição genética das populações de diferentes formas. Em uma primeira situação, mudanças ambientais favorecendo indivíduos situados em um dos extremos da distribuição farão com que a constituição genotípica da população se desloque no sentido de se aumentar a proporção destes fenótipos na população, deslocando a distribuição do caráter à direita ou à esquerda, para os casos em que os indivíduos com valores fenotípicos mais altos ou mais baixos, respectivamente, apresentem maior valor adaptativo. Este tipo de seleção, denominado de seleção direcional, em geral está presente nos programas de melhoramento, que procuram dirigir a expressão fenotípica do caráter para um dos extremos da distribuição, como no caso da seleção para maior produtividade (Figura 1).

Quando a seleção atua no sentido de privilegiar os indivíduos situados na porção central da distribuição, e portanto os indivíduos que apresentam valores fenotípicos intermediários, ela é dita seleção estabilizadora. Esta forma de seleção é típica de condições onde fenótipos extremos são desvantajosos, retratando uma situação de equilíbrio alcançado, em geral em condições ambientais estáveis. Neste tipo de seleção não se esperam modificações nos valores genotípicos médios da população, sendo a variabilidade genética, no entanto, reduzida na medida em que genótipos extremos são eliminados (Figura 1). Geralmente, nestes casos, o maior valor adaptativo é obtido por genótipos que otimizam as relações de custo e benefício de diversos caracteres simultaneamente.

A título de exemplo, consideremos, ainda que de forma simplificada, a questão do tamanho ideal da inflorescência masculina do milho, o pendão. Devemos considerar neste caso que o tamanho do pendão está em geral associado ao grau de dominância apical presente no indivíduo. Este mecanismo de dominância, atribuído à ação de hormônios vegetais, ao carrear fotossintetizados da planta para suas regiões apicais, promove o desenvolvimento do pendão, ao mesmo tempo em que limita o desenvolvimento de gemas laterais na planta (como é o caso das gemas axilares que dão origem à inflorescência feminina do milho, a espiga). Assim, podemos esperar que, dada a competição por fotossintetizados existente entre o pendão e a espiga, à medida em que o tamanho do pendão for reduzido serão obtidos ganhos em produtividade correspondentes. Não podemos nos esquecer, no entanto, do fato de que uma quantidade mínima de pólen (variável dependendo das condições ambientais) deve ser garantida. Assim, enquanto pendões muito grandes reduzem a produtividade por competirem demasiadamente com as espigas, pendões muito pequenos podem se constituir em um problema pela falta de grãos de pólens produzidos. Deste modo, é de se esperar que exista um tamanho ótimo para o pendão de milho, por exemplo, que certamente é representado por um pendão de tamanho intermediário, dependente das forças de equilíbrio entre estes fatores em um dado ambiente. Certos casos, em que os programas de melhoramento genético atingiram determinados patamares de produtividade, com redução nos ganhos de seleção, podem ser explicados pela ação de forças estabilizadoras da seleção natural, quase sempre presente, ainda que desapercebidamente. A demonstração de que isto pode ocorrer é representada pelos casos em que a seleção no sentido inverso ao desejado redunda em ganhos genéticos negativos consideráveis, explicitando a presença de variabilidade genética para o caráter

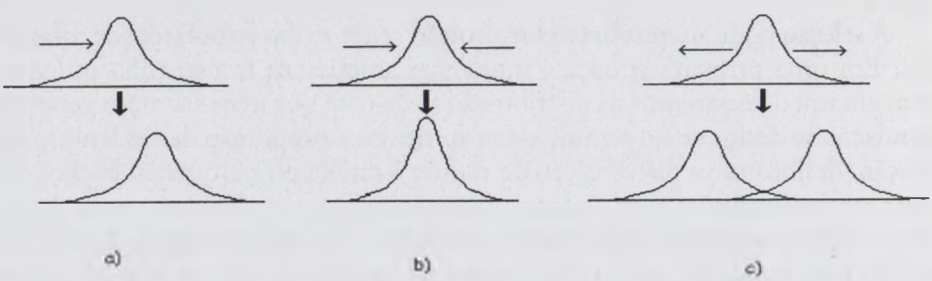


FIGURA 1. Os diferentes tipos de seleção e seus efeitos nas populações: a) Seleção direcional; b) Seleção estabilizadora; c) Seleção disruptiva.

em questão. Nestes casos, embora exista variabilidade genética e pressão de seleção artificial no sentido desejado, estando o valor do caráter próximo de um limite de eficiência, de natureza fisiológica ou não, as forças de seleção contrárias impedem que ocorram os ganhos genéticos esperados. Na Natureza isso pode proporcionar a falsa impressão de que a seleção natural é pouco eficiente no sentido de realizar a alteração de um determinado caráter. Entretanto, deve-se levar em conta que o fenótipo é o resultado de um compromisso entre pressões de seleção muitas vezes conflitantes.

A seleção pode atuar ainda no sentido de favorecer indivíduos situados nos extremos da distribuição, em detrimento daqueles situados em posições intermediárias. Neste caso, a seleção, dita disruptiva, leva inevitavelmente à diferenciação da população em pelo menos duas populações distintas (Figura 1). Este tipo de seleção ocorre, tanto pela modificação drástica das condições ambientais, fazendo com que os indivíduos que em uma condição ambiental precedente eram os de maior valor adaptativo passem a ser os de menor valor, quanto em ambientes muito heterogêneos, onde indivíduos intermediários sejam desfavorecidos em decorrência da maior eficiência de genótipos mais específicos para as diferentes condições.

Além das forças da seleção, as mudanças evolutivas são muito influenciadas pela ação do acaso, atuando principalmente durante os processos de amostragem de gametas que ocorrem a cada geração de uma população. Estes efeitos, conhecidos como oscilação genética ou deriva genética, promovem não só a diferenciação gradual entre populações mantidas isoladamente, ou com um reduzido fluxo gênico entre si, mas são também responsáveis por modificações drásticas e imprevisíveis no destino das populações, ainda que elas venham a ser posteriormente moldadas geneticamente por pressões seletivas semelhantes.

O fato de que grande parte dos genes de um indivíduo possa sofrer modificações sem que estas modificações redundem em menor valor adaptativo faz com que pelo acúmulo de mutações e pelos efeitos de oscilação genética, que podem, inclusive, vir a fixar estes genes, as populações possam se diferenciar geneticamente sem que esta diferença se expresse fenotipicamente. Estas diferenças podem permanecer silenciosas até que, dada uma alteração nas condições ambientais (ou genéticas), elas passem a desempenhar papéis importantes na expressão fenotípica, mudando para sempre o caminho evolutivo destas populações. O papel destas modificações cumulativas e silenciosas, que ocorrem em genes seletivamente neutros, no processo evolutivo foi inicialmente estudado por Motoo Kimura, nos anos 70, levando-o a propor a Teoria Neutralista (Kimura, 1982), que até hoje desperta bastante polêmica, por diminuir, de certo modo, a importância da seleção natural na evolução das espécies.

Obviamente, os mecanismos evolutivos que atuam nas plantas são os mesmos que atuam nos demais organismos, mas a importância evolutiva de cada um deles varia nos diferentes grupos. As plantas apresentam características peculiares que muito influenciaram a sua evolução. De acordo com Stebbins (1950; 1974) e Stebbins *et al.* (1977), as plantas possuem um organismo muito menos complexo do que os animais, como é revelado pelos diferentes números de tipos de células encontrados num organismo adulto: cerca de 250 em um mamífero e de 50 em uma Angiosperma. Nas plantas há uma necessidade bem menor de interação entre os diferentes órgãos, e elas são potencialmente imortais, pois apresentam um sistema de crescimento aberto,

devido à presença de tecidos embrionários – os meristemas – nas raízes e nas partes aéreas. Ao contrário de grande parte das células animais, as células vegetais, em geral, são totipotentes, capazes de dar origem a um organismo, quando colocadas num meio de cultura apropriado.

As espécies para continuarem a existir, acompanhando as mudanças do ambiente, devem manter uma certa quantidade de variabilidade genética, que deve ser preservada da ação da seleção natural. Um excesso de variabilidade genética também seria prejudicial, porque levaria a uma perda da adaptação. O controle da quantidade de variabilidade genética é realizado através de fatores ecológicos e de mecanismos genéticos, principalmente por meio do sistema de recombinação, que é determinado pelo sistema reprodutivo.

Como conseqüência da sua imobilidade, as plantas adotaram um grande número de tipos diferentes de reprodução, indo além do simples sistema de dois sexos, tão eficiente nos animais. O sistema reprodutivo está intimamente relacionado com o sistema de recombinação, que regula a quantidade de variabilidade genética, e que pode ser aberto, restrito e fechado (Grant, 1981), representados, respectivamente, pela fecundação cruzada, pela autogamia e pela agamospermia. As plantas com sistema de recombinação restrito ou fechado são encontradas normalmente em habitats abertos e pioneiros, como desertos e sucessões ecológicas, onde há um prêmio para a ocupação rápida do ambiente, antes da chegada de competidores, realizada através da produção de uma descendência numerosa e uniforme. De outro lado, as plantas com um sistema aberto de recombinação são normalmente encontradas em comunidades fechadas, como florestas, onde a chance de estabelecimento de uma plântula é pequena, devido à competição. Nesse caso há um prêmio para a produção de poucos, mas vigorosos descendentes, estando este vigor em geral associado com uma elevada heterozigose, para poder fazer frente às mudanças ambientais, na longa espera de uma oportunidade de inserção definitiva na comunidade.

O sistema reprodutivo é de grande importância na regulação da estrutura genética das populações vegetais, determinando a magnitude e a organização da variabilidade genética, tanto ao nível de *pool* gênico quanto ao nível de genótipos, exercendo uma influência importante na ação dos diferentes fatores evolutivos (Richards, 1986; Wyatt, 1992).

A estrutura genética de uma população diz respeito à quantidade e a organização da variabilidade genética nela presente. Em outras palavras, ela descreve o mosaicismo das freqüências gênicas e genotípicas, e reflete os processos históricos de uma população, restringindo de alguma maneira a ação desses processos no presente e no futuro. Sob condições naturais, a manutenção e a dinâmica da estrutura genética de uma população são devidas à interação entre um conjunto de fatores evolutivos: variação no conjunto gênico, organização dessa variação nos genótipos, a distribuição espacial desses genótipos, o sistema reprodutivo que controla como os gametas se unem para formar a progênie, a dispersão dessa progênie, os eventos estocásticos e os processos de crescimento, mortalidade e substituição que dão origem às futuras gerações (Crawley, 1986; Doust & Doust, 1988).

A estrutura espacial de uma população descreve a variação da densidade de indivíduos no espaço geográfico, e está relacionada com a estrutura genética. Na

Natureza, as plantas numa população apresentam geralmente uma estrutura agregada ou em grupos de indivíduos, que geralmente são geneticamente aparentados (Hutchings, 1986). Disso resulta que as populações naturais vegetais não são contínuas, mas sim constituídas por uma série de subpopulações ligadas entre si pelo fluxo gênico. Mesmo quando as populações ocupam habitats relativamente homogêneos pode ocorrer um mosaicismo espacial, devido ao padrão de distribuição das sementes pelo vento ou pelos animais, que causa um mosaicismo genético através da formação de grupos de indivíduos geneticamente aparentados, denominados grupos de vizinhança. Quando este mosaico genético é sobreposto ao mosaico da heterogeneidade ambiental, produzida por fatores como fertilidade variável, atividade de micorrizas, condições de luminosidade e umidade, competição, alelopatia etc., o potencial para heterogeneidade é incrementado (Bock & Linhart, 1982).

Denomina-se grupo de vizinhança a área centralizada num indivíduo, dentro da qual há uma elevada probabilidade de se encontrar outros indivíduos que lhe sejam aparentados (Silvertown & Doust, 1993). O tamanho do grupo varia com a densidade, porque a dispersão do pólen está em geral inversamente correlacionada com a densidade. Portanto, quando a densidade é elevada o tamanho do grupo de vizinhança é menor.

Todas as populações naturais de plantas apresentam, em uma ou em outra escala, uma distribuição em mosaico, que reflete uma heterogeneidade espacial presente ou passada do habitat. Um grupo de populações naturais com uma distribuição ampla e ligadas por um fluxo gênico significativo se constitui em uma metapopulação cuja dinâmica é determinada pela taxa de colonização e de extinção das populações que a compõem. O balanço entre extinção e colonização gera um limiar, que determina os limites da área de distribuição de uma espécie (Silvertown & Doust, 1993).

Quando o fluxo gênico é restrito, as populações tenderão a apresentar um menor tamanho efetivo e endogamia mais elevada e, como resultado, uma maior probabilidade de se diferenciar. De outro lado, uma alta taxa de fluxo gênico homogeneíza as diferenças genéticas entre as populações, mesmo em presença de uma pressão de seleção intensa. Cabe salientar, no entanto, que o fluxo gênico também pode se apresentar como uma força geradora de variabilidade genética em situações específicas, quando a presença de heterogeneidade ambiental estiver associada a condições de instabilidade demográfica das populações, caracterizadas pela alta freqüência de eventos de extinção e recolonização (Slatkin, 1987).

Os genes entre as populações são dispersos em dois estágios do ciclo da planta: na dispersão do pólen e na dispersão dos frutos ou sementes. Os dois tipos de dispersão são eventos independentes, mas atuam aditivamente para influenciar o tamanho do grupo de vizinhança. O movimento do pólen está relacionado com o comportamento de forrageamento do polinizador, densidade de plantas e direção do vento. Nas espécies com sementes dispersas pelo vento a maioria das sementes tende a cair e a germinar junto da planta-mãe. Quando as sementes são dispersas pelos animais, estes geralmente comem vários frutos de uma vez, e depositam as sementes junto com as fezes em locais às vezes distantes, acarretando a formação de grupos de indivíduos geneticamente relacionados.

Nos animais o mecanismo de isolamento reprodutivo mais comum é o etológico, resultante da diferença de comportamento pré-nupcial dos machos e fêmeas de espécies diferentes. Nas plantas, especialmente naquelas com fecundação cruzada realizada pelo vento, o isolamento reprodutivo é derrubado com facilidade. Este fato, juntamente com a poliploidia e a reprodução assexuada garantem nas plantas a presença de suficiente flexibilidade fenotípica, compensando a sua imobilidade.

Muita polêmica existe ainda em torno do quanto os mecanismos que atuam na microevolução, isto é, na evolução ao nível de espécie, são também os responsáveis pelos processos macroevolutivos, a evolução acima do nível de espécie, caracterizada pelo aparecimento de grupos com características novas, como seria o surgimento das aves e mamíferos a partir dos répteis ou o surgimento das plantas com sementes. De um lado, os darwinistas defendem que os mecanismos que atuam na microevolução atuam também na macroevolução, e que os novos grupos surgiriam pelo acúmulo de pequenas mutações, não havendo portanto saltos no processo evolutivo. Entretanto, esta interpretação não encontrou apoio junto aos paleontólogos, que defendiam a ocorrência de mudanças bruscas na evolução de uma linhagem, como era evidenciado pela descoberta de fósseis bem diferentes daqueles das camadas mais antigas no mesmo local.

Esta divergência entre as duas posições, uma gradualista e outra saltacionista, deu origem a uma tentativa de conciliação nos anos 70, com a proposta da Teoria do Equilíbrio Pontuado (Gould & Eldredge, 1977; 1993), que defendia a existência de longos períodos de calmaria evolutiva, ou estase, interrompidos por surtos, ou explosões, de grande atividade evolutiva, de curta duração numa escala de tempo geológico. Os primeiros corresponderiam a períodos sem grandes mudanças ambientais, nos quais o surgimento de novos tipos seria impedido pelas restrições de desenvolvimento e pela seleção estabilizadora. Já os segundos estariam na dependência de mudanças ambientais de grandes proporções, que afetariam sobretudo as populações pequenas e isoladas localizadas na periferia da área de distribuição de uma espécie. Nestas populações, o aumento das pressões de seleção, a deriva genética e a interrupção do fluxo gênico provocariam mudanças drásticas nos genótipos, que levariam a uma verdadeira revolução genética. Na maioria das vezes estas mudanças levam à extinção da população, mas em alguns casos esta reorganização do genótipo permite o surgimento de uma nova espécie, ou mesmo de um novo grupo. Este efeito, conhecido como Efeito do Fundador tem papel fundamental na origem das espécies (Futuyma, 1991).

Deve-se considerar ainda que na macroevolução também ocorre a influência do acaso ou contingência histórica, que faz com que o curso normal da evolução seja desviado, tomando direções novas, rumo a diferentes picos adaptativos. Isso torna a evolução um processo imprevisível a longo prazo. Após cada uma das cinco grandes extinções em massa que ocorreram desde o início do Cambriano, as espécies que sobreviveram passaram a dispor de espaços vazios, livres de competidores, que asseguraram um sucesso evolutivo que teria sido impossível no ambiente anterior. Algumas das espécies sobreviveram porque estavam de alguma forma preparadas para fazer frente aos estresses ambientais, mas outras sobreviveram por simples acaso, apenas por estarem no local certo no momento certo. Sem a extinção no Cambriano

que causou o desaparecimento de inúmeros grupos de invertebrados, o ancestral dos Cordados não teria tido provavelmente nenhuma chance evolutiva, e a evolução teria tomado um curso totalmente diferente daquele que levou ao surgimento dos mamíferos e do Homem.

A discussão sobre o papel do acaso nos leva a questionar a existência de progresso na evolução. Darwin rejeitou a idéia do progresso, por não admitir uma finalidade na evolução. Para ele, assim como para os darwinistas mais ortodoxos, na evolução de uma linhagem ocorre apenas um aumento de complexidade, pelo acúmulo de adaptações sucessivas. Dawkins (1997) afirma que a própria evolução pode evoluir, progressivamente, numa escala de tempo geológico, comparando-a ao avanço que ocorre nos dentes de uma catraca quando é usada para levantar um peso. Assim, após o surgimento da célula eucariota, da multicelularidade, da sexualidade, da flor e do fruto nos vegetais, a evolução passou a percorrer novos caminhos. Entretanto, a curto prazo a evolução continuaria a ser o processo lento e gradativo considerado por Darwin.

É importante salientar que a complexidade crescente resultante do processo evolutivo nem sempre se traduz diretamente sobre as estruturas dos organismos. Muitas vezes os processos biológicos em que estas estruturas estão envolvidas é que se tornam mais complexos. Nos vegetais, por exemplo, as estruturas florais das gramíneas, aparentemente mais simples do que as estruturas florais completas de muitas dicotiledôneas, representam o resultado de milhões de anos de evolução, período em que houve uma longa e progressiva modificação do sistema reprodutivo da planta no sentido da autogamia. Neste sentido, a aparente simplicidade das flores das gramíneas representa na realidade uma modificação funcional complexa resultante de forças evolutivas que privilegiaram a produção de descendentes homogêneos, em geral mais aptos a colonizar ambientes abertos, através do mecanismo de autofecundação.

4. O CAMINHO EVOLUTIVO DOS VEGETAIS - O QUE TEM FEITO A NATUREZA

Pode-se dizer que toda a evolução das plantas é caracterizada pelo esforço de se livrar da dependência da água de onde surgiram. Nas primeiras plantas terrestres a geração haplóide, o gametófito, era a geração dominante, sendo a diplóide, o esporófito, apenas um parasita efêmero do gametófito. Estes atributos confinaram durante muito tempo as plantas aos ambientes alagados, pois o gametófito precisava da água para que o anterozóide pudesse nadar até a oosfera. A vida em locais úmidos e sombrios prejudicava a fotossíntese e o desenvolvimento de um sistema eficiente de condução. Portanto, esse longo processo de transformação que vai desde o início da vida vegetal terrestre até as Angiospermas pode ser visto como uma corrida para o sol (Tonzig, 1975).

A independência em relação à água exigiu uma transformação que fez do esporófito diplóide a geração dominante, com uma redução progressiva em tamanho do gametófito, atualmente representado nas Angiospermas pelo grão de pólen maduro e pelo saco embrionário. Essa profunda transformação trouxe consigo um aprimoramento da função fotossintética, do sistema radicular e dos sistemas de sustentação e de condução.

Todas as plantas terrestres, surgidas há cerca de 430 milhões de anos atrás, são Embriófitas, isto é, plantas que carregam um embrião e apresentam uma

alternância de gerações. As Embriófitas não vasculares (Briófitas) e as Embriófitas vasculares (Traqueófitas) exploraram, respectivamente, dois caminhos evolutivos diferentes: a preponderância da geração gametofítica e a preponderância da geração esporofítica. As primeiras plantas terrestres tinham uma estrutura muito simples, e as folhas verdadeiras somente apareceram numa época bem mais tardia, cerca de 320 milhões de anos atrás, criando, em decorrência da perda d'água, pressões seletivas para aumento da absorção da mesma e para o aparecimento das verdadeiras raízes. A semente somente veio a aparecer nas Gimnospermas, que apresentam os óvulos expostos na época da polinização, e não enterrados nos tecidos do esporófito, como nas Angiospermas. A maioria dos caracteres que definem as Angiospermas apareceu separadamente em vários grupos de Gimnospermas, combinando-se posteriormente numa única linhagem. Neste sentido, para alguns autores, as Angiospermas não se constituem em uma única linha evolutiva, como é o caso das Gimnospermas. A flor e o fruto apareceram nas Angiospermas, que já deixaram registros fósseis de 135 milhões de anos atrás. Além da presença da flor e do fruto, outras inovações também contribuíram para o grande sucesso das Angiospermas, como a capacidade de se propagar assexuadamente, a capacidade de crescerem rapidamente, a presença do hábito herbáceo e do hábito decíduo, o fato de possuírem tecidos condutores, xilema e floema, muito eficientes, além da própria coevolução a que estes organismos foram submetidos com insetos e outros animais.

A partir do Cretáceo Médio as Angiospermas substituíram progressivamente as Pteridófitas e as Cicadáceas que dominavam a flora terrestre desde o Carbonífero. Espécies e gêneros modernos de Angiospermas ocorrem pela primeira vez em grande quantidade como fósseis a partir de 50 milhões de anos atrás. A partir do final do Cretáceo e durante grande parte do Terciário floras diversas entraram em contato devido à colisão de massas continentais, enquanto outras se fragmentaram acompanhando o deslocamento dos continentes ou levantamento de grandes cadeias de montanhas. O esfriamento climático, progressivo e global no Terciário deslocou a distribuição de plantas rumo ao equador nos dois hemisférios, e há cerca de 10 milhões de anos atrás as espécies tropicais desapareceram definitivamente na maioria das floras de latitudes médias. No final do Pleistoceno e no decorrer do Holoceno houve várias mudanças climáticas que, juntamente com a ação antrópica, a partir de 9.000 anos atrás, moldaram a composição florística nos diferentes continentes no início da época histórica.

Hoje, as Angiospermas dominam totalmente a flora terrestre, existindo cerca de 235.000 espécies de Angiospermas contra 22.000 de Briófitas, 9.000 de Pteridófitas e apenas 750 de Gimnospermas. Este domínio se deve, sobretudo, à versatilidade do seu sistema reprodutivo que permitiu a adaptação aos mais diferentes ambientes num tempo biológico relativamente curto. Esta plasticidade é decorrente principalmente da presença da flor, altamente seletiva em relação ao tipo de polinizador, tornando-se assim responsável direta pelo surgimento rápido de barreiras de isolamento reprodutivo, que, ao permitirem a manutenção da identidade genética, propiciam ao mesmo tempo o surgimento de novas espécies. A quantidade de variabilidade genética necessária para a adaptação é obtida através de uma série de mecanismos diferentes, tais como auto-incompatibilidade, heterostilia e apomixia facultativa.

5. O PROCESSO DE DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS - O QUE TEM FEITO O HOMEM

Há indícios que no início do Holoceno o Homem deixou de ser um coletor de plantas e um pescador/caçador para se tornar um agricultor e criador. Discute-se muito sobre os fatores responsáveis por essa mudança, mas há a respeito apenas hipóteses. O que é certo é que desde o início da sua história, os hominíneos – *Australopithecus* e *Homo* – utilizaram as plantas na sua alimentação, como é evidenciado pelo estudo de dentes fósseis datados de mais de 4 milhões de anos. Mas, enquanto os *Australopithecus* permaneceram vegetarianos, os humanos se tornaram onívoros, afastando dessa maneira a ameaça de se extinguirem, como ocorreu com os australopitecíneos, que numa mudança climática entraram em competição com os demais herbívoros, muito mais eficientes.

Rindos (1984) defende a idéia que o processo de domesticação iniciou-se a partir do momento em que o Homem passou a se interessar por uma determinada planta, protegendo-a e disseminando-a. Iniciava-se assim um processo de coevolução, que acabaria transformando profundamente as plantas utilizadas pelo Homem, tornando-as dependentes dele para a sua sobrevivência e, ao mesmo tempo, modificando o curso da história da humanidade, que também passou a depender das plantas. O autor mencionado distingue três estágios no processo de domesticação das plantas: acidental, especializada e agrícola. O primeiro estágio se caracteriza por uma relação inconsciente do Homem com a planta que utiliza na sua alimentação, e que passa a proteger e cujas sementes espalha. O relacionamento se estreita no segundo estágio, quando o Homem leva a planta para junto da sua habitação, onde ela encontra o terreno livre de competidores e estercado. No terceiro estágio, da domesticação agrícola, o Homem proporciona às plantas um ambiente onde elas possam maximizar o seu potencial de produção, ao reparo de predadores e de competidores. Surge assim o agroecossistema, e as plantas passam por uma profunda alteração genética que as torna adaptadas a um ambiente artificial, caracterizado pelo preparo do solo, semeadura, cultivo e colheita. É importante aqui lembrar que, segundo Rindos (1984), este processo de domesticação não é exclusivo do Homem, mas ocorre também em muitas espécies animais, onde pode ser detectada a existência de uma ou mais das três etapas de domesticação acima mencionadas. Assim, por exemplo, ele descreve a coevolução que ocorreu entre uma espécie arbórea (*Acacia)* e uma espécie de formiga. A planta fornece às formigas carboidratos através dos seu nectários, e proteínas e lipídios atráves dos *corpos de beltran*, estruturas existentes nas folhas. Por sua vez as formigas protegem a planta do ataque de herbívoros e do fogo, limpando o terreno em volta dela e impedindo que seja destruída por incêndios. Com isso a espécie de *Acacia* conseguiu aumentar a sua área de distribuição, ocupando inclusive novos habitats, não disponíveis para outras espécies do mesmo gênero. Isso é muito parecido com o que ocorreu no início da coevolução do Homem com as plantas hoje domesticadas, quando deixou de derrubá-las e passou a protegê-las. Existem muitos exemplos, inclusive para outras etapas do processo de domesticação, como é caso do plantio de esporos de fungos feito por formigas num substrato cuidadosamente preparado com folhas e secreções.

Segundo Harlan (1975), o processo de modificação genética de uma espécie vegetal não começa quando o Homem passa a utilizar os seus frutos, mas sim quando passa a guardar parte das sementes e a plantá-las, porque é a partir deste momento que ele passa a exercer uma pressão de seleção a favor de genes que determinam uma característica que de alguma forma é importante para que a planta permaneça adaptada ao novo sistema. Isso deve ter ocorrido, por exemplo, quando o Homem entrava num campo de trigo no momento em que este apresentava o maior número de espigas maduras. Dessa maneira ele estava inconscientemente selecionando para um ciclo mais homogêneo e para eliminação da deiscência das sementes, uma vez que ele esperava para entrar no campo e realizar a sua colheita quando havia promessa de um maior retorno para o seu esforço, e somente colhia as sementes que não tinham caído no chão ou que não caíam ao contato com o seu cutelo de pedra. Assim, Harlan (1975) distingue no processo de domesticação duas etapas, uma inconsciente ou automática, e a outra consciente. Na segunda etapa o Homem passa a selecionar tendo em vista determinados objetivos, como gosto agradável, cor, formato etc., mas é na primeira etapa que ocorrem as maiores alterações no genótipo da planta, influenciando toda a sua evolução posterior sob domesticação. Como exemplo, podemos citar a *síndrome do girassol*, representada pela série de mudanças causadas pelo simples ato do Homem de colher as espigas maiores num campo de milho, ou de inflorescências maiores num campo de girassol. Agindo assim ele estaria inconscientemente selecionando para plantas com maior dominância apical e, portanto, com menor número de espigas (de menor tamanho). No caso do arroz, a seleção para cachos maiores, levaria a uma diminuição do número de perfilhos e a uma maturação mais uniforme das diversas inflorescências da mesma planta. Da mesma forma, o aumento de tamanho verificado nos grãos produzidos pelas plantas cultivadas é resultado da vantagem seletiva das sementes maiores que produzem plântulas mais vigorosas e competitivas.

Vários autores apontam outras mudanças provocadas pela seleção humana ao longo do processo de domesticação. Entre elas, pode-se citar a eliminação de estruturas de defesa, como os espinhos, ou de substância tóxicas, como o acído cianídrico na mandioca, e, ainda, a perda da deiscência e da dormência das sementes e o gigantismo dos órgãos utilizados pelo Homem. Todas estas características são importantes na Natureza, mas pouco desejáveis num agroecossistema. Este, por exemplo, é o caso da dormência das sementes, que na Natureza representa um seguro contra a ocorrência de períodos desfavoráveis para a germinação ou o estabelecimento da plântula, e, ainda, o caso da presença de órgãos ou substâncias de defesa, totalmente inúteis na ausência de herbívoros.

É bom lembrar que nem sempre uma planta cultivada é também uma planta domesticada, pois existem plantas que são cultivadas em pequena ou em grande escala sem que tenham perdido as suas características de planta selvagem como é caso de muitas plantas medicinais cultivadas em quintais. Rindos (1984) lembra ainda que domesticação e agricultura não podem ser considerados sinônimos, pois a primeira é o resultado de um processo de coevolução Homem/planta, enquanto a segunda é uma atividade humana visando proporcionar um ambiente propício para que as plantas utilizadas pelo Homem possam expressar todo o seu potencial produtivo. A domesticação começa com o início da presença hominídia, cerca de 4 milhões de

anos atrás, enquanto a agricultura somente surge após o término da última grande glaciação, cerca de 9.000 anos atrás.

Muitas das plantas domesticadas anuais têm sua origem num grupo de plantas selvagens denominadas de "invasoras" (*weeds*). As invasoras são espécies de plantas adaptadas para a colonização rápida de espaços abertos ou alterados, e se caracterizam por ser normalmente de autofecundação ou de reprodução assexuada, por produzirem um grande número de sementes pequenas, que dão origem a plântulas pouco vigorosas, que morrem com muita facilidade antes do recrutamento. Este tipo de estratégia, denominada "*r*", visa a produção de uma descendência pouco variável, mas igualmente bem adaptada para a ocupação do terreno antes da entrada de competidores. Em um ambiente fechado, como uma mata, onde a competição é intensa, as plantas apresentam uma estratégia do tipo "*k*", caracterizada pela produção de uma prole pouco numerosa mas vigorosa, e pela presença de alogamia predominante, que assegura a presença de uma grande variabilidade genética na descendência, necessária para fazer frente a um futuro imprevísivel durante a longa espera até encontrar o espaço e a luz necessários para a sua inserção no ambiente. Plantas invasoras típicas são as ervas daninhas que infestam as lavouras. Muitas delas mimetizam as espécies cultivadas para que não sejam erradicadas pelo agricultor, e muitas vezes são tão semelhantes a elas que não são reconhecidas nem por uma pessoa experiente. Muito citado na literatura é o caso de um programa de melhoramento na Ásia que, para poder separar o arroz cultivado do arroz vermelho invasor das lavouras, introduziu no primeiro um gene que determinava uma cor roxa na bainha das folhas, permitindo assim a identificação sem dificuldade do arroz cultivado. Entretanto após apenas 5 anos, o arroz vermelho também adquiriu a mesma cor roxa! Neste caso, o fluxo gênico e a intensa pressão de seleção praticada inconscientemente foram suficientes para apressar o processo de mimetização.

Entretanto, não se deve acreditar que as plantas invasoras surgiram após o aparecimento do Homem, colonizando as proximidades das suas habitações. Na verdade, elas estavam presentes desde o início da evolução das plantas terrestres, sendo que, de acordo com alguns autores, uma das causas do sucesso evolutivo das Angiospermas foi o fato dos seus representantes do Cretáceo terem apresentado esta característica de invasor, que permitiu que ocupassem os espaços deixados livres na vegetação de Cicadáceas e Pteridófitas pelo pastoreio dos dinossauros. Desde o início da evolução das plantas houve sempre um prêmio para aquelas que possuíssem a capacidade de colonizar rapidamente ambientes abertos.

O advento da agricultura coincide com a terceira etapa do processo de domesticação, denominada *agrícola*. O resto é conhecido: ocorre uma redução progressiva no número de espécies vegetais utilizadas pelo Homem, de cerca de 5.000 no neolítico a cerca de 400 atualmente, das quais apenas 15 espécies são especialmente importantes na alimentação. Dessas, apenas quatro - trigo, arroz, milho e batata - representam cerca de 80% do volume total produzido. Ao mesmo tempo verifica-se uma redução progressiva da variabilidade genética, sacrificada na busca de uma maior uniformidade dos produtos finais, e na utilização de um número cada vez menor de cultivares melhoradas em áreas contínuas cada vez maiores. As espécies cultivadas se tornam cada vez mais vulneráveis ao ataque de pragas e doenças, exigindo novos pesticidas e a introdução de novos genes de resistência.

A partir do século XX, estamos numa nova etapa do processo de domesticação, denominada de *científica*. Os avanços da genética e de outras ciências permitiram conhecer e, em parte, manipular os mecanismos responsáveis pela evolução das plantas na Natureza e sob domesticação. Mas as lições que o conhecimento do passado proporciona quanto às causas do insucesso evolutivo e da extinção de grupos inteiros de plantas e de animais são esquecidas. As novas tecnologias visando a obtenção de plantas transgênicas ou apomíticas oferecem soluções interessantes e tentadoras a curto prazo, mas a longo prazo vão contribuir para que o equilíbrio presente em todo o processo coevolutivo na Natureza seja rompido, ameaçando a própria sobrevivência a longo prazo da humanidade.

Entretanto, os avanços da Ciência que vêm contribuindo para o surgimento de novas metodologias no melhoramento de plantas têm também contribuído para uma melhor avaliação do impacto do Homem sobre a Natureza, apontando soluções para os problemas surgidos. Um exemplo disso é a campanha ao nível mundial para a conservação dos recursos genéticos. Já na segunda década deste século, Vavilov, na Rússia, procurou identificar os centros de origem das plantas cultivadas, reconhecendo inicialmente oito centros nos cinco continentes. Os centros de origem eram reconhecidos pelo grande número de formas diferentes de uma espécie. Hoje, o conceito de centros de origem de Vavilov foi alterado, reconhecendo-se que nem sempre os centros de maior diversidade correspondem aos centros de origem. Entretanto a idéia de Vavilov ainda encontra seguidores, existindo hoje a consciência da necessidade de se conservar a biodiversidade e os ancestrais de nossas plantas cultivadas através de organizações internacionais que supervisionam a proteção dos centros de diversidade e a conservação do germoplasma em bancos apropriados.

6. CONTRIBUIÇÕES DO PENSAMENTO EVOLUTIVO AO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Inicialmente é interessante lembrar a dificuldade de se encontrar um conceito de espécie que seja operacional em plantas, devido sobretudo à freqüente quebra do isolamento reprodutivo e à presença de reprodução uniparental – autogamia e apomixia. Para contornar essas dificuldades, têm sido empregados os conceitos de ecoespécie, em que se testa o isolamento reprodutivo em laborátório, de microéspecie para as plantas autógamas e apomíticas, e os conceitos de *pools* gênicos para as plantas cultivadas e seus parentes selvagens, que são classificados em três grupos com dificuldade crescente de hibridação (Harlan, 1975).

Neste contexto, cabe salientar o papel revolucionário que tem sido desempenhado pelas modernas tecnologias de manipulação genética que, ao permitir a clonagem de um gene de qualquer espécie e sua introdução em quaisquer outras espécies de interesse, transgrediram toda e qualquer barreira estabelecida até então pela Natureza. Com o desenvolvimento destas tecnologias, uma série de estratégias, antes impraticáveis, passam a ser consideradas. Do ponto de vista do melhorista, podemos esperar que nas próximas décadas o isolamento reprodutivo, estabelecido naturalmente por barreiras biológicas, deverá assumir uma importância cada vez menor nos programas de melhoramento de plantas.

Uma importante contribuição neste sentido, tem tido origem nos estudos de sintenia entre genomas de diversas espécies cultivadas, em particular entre as gramíneas. Estudos desta natureza (Moore *et al.*, 1995; Paterson *et al.*, 1995) têm demonstrado uma extraordinária semelhança entre genomas de espécies aparentemente bastante distintas, como arroz e milho, por exemplo. Na realidade, enquanto se estabelece um padrão de similaridade entre os genomas de diversas espécies de gramíneas, incluindo arroz, trigo, milho, milheto, sorgo e cana-de-açúcar, um programa de seqüenciamento completo do genoma de arroz vez sendo desenvolvido, que, dada a sintenia existente, permitirá a inferência sobre a posição e função de genes de interesse nas outras espécies do grupo. Assim, o trabalho de seqüenciamento realizado em um genoma relativamente simples como o do arroz (400 Gb) poderá fornecer informações sobre a estrutura genômica do trigo por exemplo, que apresenta um genoma 40 vezes mais extenso. O porquê da existência deste elevado grau de sintenia entre estes genomas também deve ser alvo de novas e interessantes hipóteses sobre os processos evolutivos e de domesticação destas plantas. A identificação de regiões associadas à resistência a doenças diferentes, em espécies diferentes, mas em regiões cromossômicas semelhantes, alimenta as mais diversas hipóteses sobre os aspectos evolutivos dos genomas vegetais.

O avanço obtido nos últimos anos sobre o modo como a evolução se dá ao nível genômico foi extraordinário e certamente redundará em novas bases teóricas para os futuros programas de melhoramento. A descoberta, por exemplo, de que as taxas de recombinação intra-gênica são em até 100 vezes superiores àquelas encontradas entre genes diferentes em um mesmo cromossomo, ao mesmo tempo em que fornece uma explicação plausível para a manutenção de variabilidade genética mesmo em programas de bases tão estreitas como o programa de obtenção de linhagens elite de milho nos EUA, por exemplo, certamente indica que mesmo os atuais conceitos básicos de alelos merecem ser reavaliados (Thuriaux, 1977; Civardi *et al.*, 1994; Lee, 1995). Estes estudos têm permitido ainda a visualização do genoma das espécies vegetais como entidades altamente heterogêneas. Assim, enquanto nas regiões centroméricas dos cromossomos, bem como nas regiões teloméricas, ricas em seqüências altamente repetitivas os mecanismos de recombinação são em geral reprimidos, um estímulo à recombinação ocorre nos segmentos intermediários dos braços cromossômicos.

Estas novas descobertas têm profundas implicações sobre determinados procedimentos atualmente utilizados nos programas de melhoramento. A posição relativa de um gene de interesse em um determinado segmento cromossômico, por exemplo, pode significar a diferença entre o sucesso e o fracasso de um programa de retrocruzamento. Genes situados em regiões com altas taxas de recombinação certamente podem ser transferidos sem que uma porção significativa de outros genes indesejáveis seja carreada simultaneamente, o que pode não ocorrer se o gene em questão estiver situado em uma região cromossômica de baixas taxas de recombinação.

O estudo comparativo da estrutura genômica de diversas espécies cultivadas, particularmente das gramíneas e das solanáceas (tomate e batata), também têm fornecido observações novas importantes no que se refere ao arranjo dos genes ao nível cromossômico ao longo do processo evolutivo. A existência de blocos gênicos, em que fragmentos inteiros são conservados nas gramíneas por exemplo, mesmo após transcorridos milhões de anos de modificações evolutivas, torna tentadora a

hipótese de que no processo evolutivo não só a natureza dos genes mas o arranjo dos mesmos nos cromossomos esteve sob ação da seleção. Na realidade, podemos esperar que o arranjo dos genes nos cromossomos deve exercer uma influência importante no sucesso adaptativo de uma determinada espécie, na medida em que certas combinações alélicas de genes diferentes podem ser importantes e uma vez que este arranjo afeta as taxas de recombinação entre eles.

Há no entanto um enorme desafio a ser cumprido pela genética moderna, que representa ainda um obstáculo para a manipulação genética de caracteres quantitativos. Trata-se da compreensão do funcionamento, considerado extremamente intrincado e complexo, do genoma de uma espécie vegetal, e o reconhecimento do papel de cada um dos seus milhares de genes, no desenvolvimento do indivíduo como um todo, e em suas relações com os fatores ambientais previsíveis e imprevisíveis. Diversos autores (Wright,1968; Mayr, 1970), discutem o assunto sob a ótica evolutiva, que tem como interesse primário justamente o processo que relaciona o conjunto genético de um indivíduo ao seu conjunto de caracteres fenotípicos submetidos às pressões seletivas existentes na Natureza.

Talvez o ponto mais importante a ser lembrado seja o de que, em todos os organismos superiores, o gene está afastado dos componentes do fenótipo que ele afeta por um longo caminho de desenvolvimento. A cada passo desse caminho, a proteína produzida pelo gene interage com proteínas produzidas por outros genes, e é esta interação de proteínas que determina o crescimento e a diferenciação das células envolvidas. O efeito particular que o gene virá a exercer depende em uma ampla extensão deste conjunto genético, ou seja, da especificidade dos outros genes com os quais ele está associado no genótipo (Mayr, 1970).

A unicidade do genoma, portanto, deve ser encarada como um fenômeno que precisa ser compreendido e reconhecido pelos futuros métodos de melhoramento. O tratamento simplista e reducionista que se tem empregado, em geral, admite a aditividade de efeitos de múltiplos genes de efeitos menores. Esta abordagem, ainda que suficiente para que ganhos genéticos consideráveis tenham sido alcançados nas últimas décadas, tem cedido lugar a modelos cada vez mais complexos, que admitem a epistasia entre pares de genes, de efeitos não necessariamente iguais. Espera-se, no entanto, que estes modelos venham a ser profundamente modificados a partir dos estudos de análise genética que vêm sendo realizados em uma escala, ao nível genômico, acessível somente pelo uso das modernas técnicas de mapeamento genético e funcional, técnicas conhecidas como parte de uma nova Ciência denominada *Genomics* (Liu, 1998). Estas modificações devem se dar no sentido de abrigar a enorme complexidade dos efeitos intergênicos existentes e que, provavelmente, exercem grande influência sobre os caracteres quantitativos, de grande interesse nos programas de melhoramento atuais.

A visão corrente do mecanismo de expressão gênica presente em estudos evolutivos transgride e supera em muito o conceito subjacente aos atuais métodos de melhoramento de plantas, que utiliza uma abordagem também conhecida como da "Genética do saco de feijão", em que os genes são tratados como entidades isoladas e independentes entre si. Embora devemos reconhecer que, para diversos caracteres de interesse, a modificação em um único gene possa representar a alteração necessária

para que um certo objetivo seja alcançado, para a maioria dos caracteres (incluindo os caracteres quantitativos) somente a avaliação (impossível de ser realizada do ponto de vista prático) de todas as combinações possíveis poderia nos permitir detectar o "genótipo" superior em um dado ambiente. A maioria dos caracteres deve portanto ser vista como resultado da ação simultânea de todo o genótipo do indivíduo, frente ao ambiente que lhe foi proporcionado. Tratar o melhoramento como um processo onde a modificação genotípica possa ser reduzida a pequenas modificações, de efeito cumulativo, em genes específicos é portanto, à luz da moderna teoria da evolução, uma visão simplista.

Wright talvez tenha sido um dos primeiros a destacar a importância da unicidade do genoma, e entre as alternativas para se lidar com este problema ele propôs um conceito, mais do que uma alternativa de uso prático propriamente dito, que diz respeito à teoria das paisagens adaptativas. Segundo este modelo, em um dado ambiente o valor adaptativo de um conjunto de genótipos não pode ser identificado pela análise de genes isolados. O valor adaptativo de um conjunto de genótipos, dada a complexa rede de interações entre os genes, só pode ser reconhecido pela análise conjunta de diversos genes simultaneamente. Isto porque, dada uma condição em um gene "A" por exemplo, digamos "aa", o genótipo que confere maior adaptabilidade em um gene "B" pode ser "bb", enquanto que dada a condição "AA" para o gene "A", o genótipo "BB" pode vir a ser o que confere o maior valor adaptativo ao indivíduo. Obviamente, esta relação se dá em geral entre um número bem maior de genes, sendo o valor adaptativo da população representado pela média dos valores adaptativos dos diversos indivíduos. Em casos como esses, torna-se claro que a seleção sobre o gene "B" não pode ser realizada sem que o estado do gene "A" seja conhecido, pois de outro modo, não estaríamos aptos a identificar dentre os estados "bb" e "BB" aquele que proporcionaria maiores valores adaptativos. A teoria das paisagens adaptativas de Wright propõe, neste sentido, a existência de uma "paisagem" com vales, picos e platôs, cujas cotas correspondem ao valor adaptativo conferido por um conjunto de genes e suas interações. Obviamente, embora possamos representar graficamente esta "paisagem" para dois genes, o conceito se torna cada vez mais abstrato à medida em que incluímos um número maior de genes em nosso estudo. Do ponto de vista conceitual, no entanto, podemos prever com base na teoria de paisagens de Wright que dada a condição "inicial" de um dado genótipo (ou conjunto de genótipos), representada por um ponto na superfície que descreve a "paisagem", o pico mais próximo (de maior valor adaptativo) pode não ser o máximo da paisagem como um todo. Assim, para o nosso exemplo, dada a condição inicial para o gene "A" "aa", teríamos um pico adaptativo dado por "bb", enquanto para a condição inicial "AA" este pico estaria situado em "BB" (Figura 2).

Sob este aspecto, Wright conseguiu explicar o motivo que leva as diferentes espécies a traçarem caminhos evolutivos diferentes. No entanto, é difícil transpor integralmente a visão de Wright do processo evolutivo para o melhoramento de plantas, embora a idéia seja interessante para o melhorista, que pode aplicá-la ao processo de melhoramento genético, onde a pressão de seleção humana é exercida para alcançar um pico, isto é, o máximo potencial produtivo de uma espécie. Se admitirmos que cada população base de um programa de melhoramento nos coloca

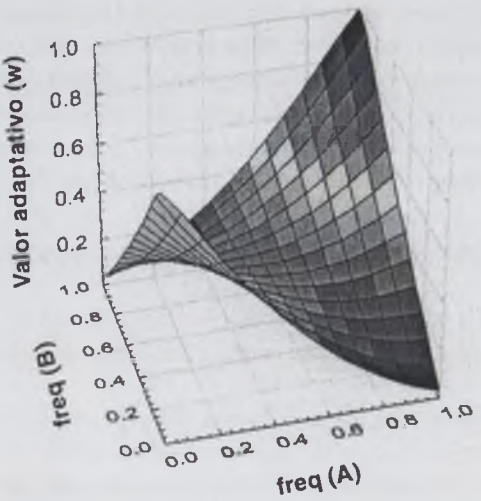


FIGURA 2. Esquema representativo da paisagem adaptativa de Wright para dois genes, A e B, onde se percebe a existência de dois picos adaptativos com freq(A)=freq(B)=0,0 e freq(A)=freq(B)=1,0 (populações em Equilíbrio de Hardy-Weinberg).

em um ponto da paisagem de Wright, não podemos esperar alcançar o pico máximo da paisagem como um todo (não pela ação exclusiva da seleção) se não forem tomadas as medidas necessárias para que isso possa ocorrer. É importante enfatizar que o processo de modificação ao longo do programa de melhoramento, representa, neste contexto, uma busca por pontos de cotas mais elevadas na paisagem. As cotas que poderão ser atingidas pelo programa de melhoramento estão condicionadas tanto pela constituição genética da população utilizada como base para o programa, quanto pelos métodos de melhoramento utilizados. Não se pode perder de vista o fato de que mesmo na presença de uma elevada pressão de seleção artificial no sentido desejado, a resposta à seleção está condicionada tanto à existência de variabilidade genética para o caráter em questão quanto à capacidade do organismo em absorver a modificação que se deseja. Cumpre salientar que, em geral, este segundo aspecto não representa um problema, embora existam diversos exemplos na literatura em que os fenótipos obtidos representem praticamente os limites fisiológicos de expressão do caráter, como no caso da seleção para elevado teor de óleo em milho (utilizando métodos tradicionais de melhoramento), cujo limite fisiológico é estabelecido pela queda acentuada do potencial germinativo de sementes com teores muito altos de óleo.

Uma aplicação, certamente mais arriscada, do conceito de paisagem adaptativa de Wright ao melhoramento de plantas se refere ao fato de que, as estratégias utilizadas em programas de melhoramento com o objetivo de desenvolvimento de cultivares híbridos podem ser interpretadas como formas de se atravessar "vales" que limitam o acesso a pontos de cotas mais altas. Esta interpretação encontra subsídios no fato de que, se a prática do melhoramento se der exclusivamente por programas de seleção recorrente intrapopulacional, situação em que o paralelo com a seleção natural se torna mais evidente, os limites que podem ser alcançados serão sempre inferiores àqueles de cultivares híbridos. Isto se explica pelo fato de que o próprio sistema reprodutivo, neste caso, promovendo a recombinação e a variabilidade genética entre os indivíduos ao longo de cada uma das gerações, impedirá o estabelecimento exclusivo do genótipo superior. Esta restrição, no entanto, pode ser quebrada, na medida em que se lança mão dos procedimentos que levam à obtenção de linhagens endogâmicas, e aqui a metáfora da descida dos vales se torna atraente, e permitem que combinações ótimas sejam reconhecidas e multiplicadas repetidamente. Cumpre salientar neste caso, o papel decisivo do mecanismo de obtenção de cultivares híbridos, realizado

sob controle do Homem, em que um único genótipo superior, ou um conjunto limitado deles, é reproduzido com fidelidade.

É oportuno ainda, salientar o papel do acaso, proporcionado pelo fenômeno da amostragem genética entre as gerações, traduzindo-se na deriva genética. Os processos da deriva e das mutações, na Natureza, representam as únicas formas de se transpor um vale e permitir que um dado conjunto de genótipos possa experimentar novos caminhos evolutivos. No contexto dos atuais programas de melhoramento podemos dizer que, sem que se perceba, este fenômeno tem atuado embora precise ser melhor estudado.

O conceito de paisagens adaptativas de Wright pode servir de epílogo a esta tentativa de se utilizar os processos evolutivos como pano de fundo para o melhoramento genético de plantas, onde encontramos atuando os mesmos mecanismos que levaram as espécies a ocupar os picos e substitui-los por outros mais elevados. A única grande diferença é que a busca do genótipo ótimo é substituída por aquela da máxima produtividade.

Por fim cabe dizer que não podemos nos esquecer que mesmo que possamos reconhecer um dado genótipo como sendo o "superior", esta superioridade só se dá naquele ambiente definido, nos levando a admitir que de fato, não há um único genótipo superior, dado que, em diferentes ambientes, diferentes genótipos serão tidos como superiores. Este problema conhecido e tratado como resultante da interação entre genótipos e ambientes é assunto de outro capítulo deste livro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOCK, J.H.; LINHART, Y.B. (Ed.) **The evolutionary ecology of plants**. Boulder: Westview Press, 1982. 600p.

CIVARDI, L.; XIA, Y.; EDWARDS, K.J.; SCHNABLE, P.S.; NIKOLAU, B.J. The relationship between genetic and physical distances in the cloned *a1-sh2* interval of the *Zea mays* L. genome. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, p.8268-8272, 1994.

CRAWLEY, M.J. (Ed.) **Plant ecology**. London: Blackwell, 1986.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. São Paulo: Hemus Editora, reimpresso em 1981. 471p.

DAWKINS, R. **O relojoeiro cego**. Lisboa: Edições 70, 1997. 377p.

DOUST, J.L.; DOUST, L.L. **Plant reproductive ecology**: patterns and strategies. New York: Oxford University Press, 1988.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; CNPq, 1991. 629p.

GOULD, S.J.; ELDREDGE, N. Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution considered. **Paleobiology**, v.3, p.115-151, 1977.

GOULD, S.J.; ELDREDGE, N. Punctuated equilibrium comes of age. **Nature**, v.366, p.223-227, 1993.

GRANT, V. **Plant speciation**. New York: Columbia University Press, 1981. 563p.

HARLAN, J.R. **Crops & man**. Madison: American Society of Agronomy, 1975. 294p.

HUTCHINGS, M. J. The structure of plant population. In: CRAWLEY, M.J. (Ed.) **Plant ecology**. London: Blackwell, 1986.

KIMURA, M. (Ed.) **Molecular evolution, protein polymorphism and the neutral theory**. Tokyo: Japan Scientific Societies, 1982.

LEE, M. DNA Markers and Plant Breeding Programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p.265-344, 1995.

LIU, B. H. **Statistical genomics**: linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.

MAYR, E. **Populations, genes and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1970.

MOORE, G.; DEVOS, K. M.; WANG, Z.; GALE, M. D. Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**, v.5, p.737-739, 1995.

NICKLAS, K.J. **The evolutionary biology of plants**. Chicago: The University Press, 1997. 449p.

PATERSON, A.H.; LIN, Y.-R.; LI, Z.; SCHERTZ, K.F.; DOEBLEY, J.F.; PINSON, S.R.M.; LIU, S.C.; STANSEL, J.W.; IRVINE, J.E. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. **Science**, v.269, p.1714-1717, 1995.

PROVINE, W. B. **The origins of theoretical population genetics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1971.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. London: Unwin Hyman, 1986. 529p.

RINDOS, D. **The origins of agriculture.** Orlando: Academic Press, 1984. 325p.

SILVERTOWN, J.W.; DOUST, J.L. **Introduction to plant population biology.** London: Blackwell, 1993. 313p.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structrure of natural populations. **Science**, v.236, p.787-792, 1987.

STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in plants.** New York: Columbia University Press, 1950. 643p.

STEBBINS, G.L. **Flowering plants evolution above the species level.** Cambridge: Harvard University Press, 1974. 399p.

STEBBINS, G.L.; DOBSZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; VALENTINA, J.W. **Evolution.** San Francisco: Freeman, 1977. 572p.

THURIAUX, P. Is recombination confined to structural genes on the eukariotic genome? **Nature**, v.268, p.460-462, 1977.

TONZIG, S.S. **Letture di biologia vegetale.** Milano: Mondadori, 1975. 222p.

TORGGLER, M.G.F.; CONTELI, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas:** variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175p.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations.** Chicago: University of Chicago Press, 1968. 4v.

WYATT, R. **Ecology and evolution of plant reproduction.** New York: Chapman & Hall, 1992. 397p.

LITERATURA RECOMENDADA

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** New York: New York Botanical Garden, 1988. 555p.

GOTTLIEB, L.D.; JAIN, S.K. (Ed.) **Plant evolutionary biology.** London: Chapman & Hall, 1988. 414p.

RIDLEY, M. **Evolution.** Cambridge: Blackwell Science, 1996. 719p.

TALLIS, J.H. **Plant community history.** London: Chapman & Hall, 1991.

4

ESPÉCIES SELVAGENS E SUA UTILIZAÇÃO NO MELHORAMENTO

JOÃO RODRIGUES DE PAIVA[1]
AFONSO CELSO CANDEIRA VALOIS[2]

[1]Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita, 2.270, Bairro Pici - CEP: 60511-110 - Fortaleza, CE.
[2]Embrapa Sede, C.P. 040315 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

Os primórdios do melhoramento genético vegetal perdem-se na pré-história e confundem-se com as próprias origens das plantas cultivadas pelo homem. O simples ato de colher e plantar já é seletivo. O homem embarcou num programa de melhoramento vegetal no momento em que começou a cultivar as plantas para seu uso próprio. A maioria das plantas que alimenta ou fornece as fibras de nosso vestuário foi domesticada ainda na idade da pedra e não poderia hoje sobreviver, em estado selvagem, sem os tratos culturais proporcionados pelo homem.

Um dos maiores desafios do homem para os próximos anos é produzir alimentos para atender uma população crescente com menor distúrbio possível do meio ambiente. Entre as áreas do conhecimento humano que poderão contribuir para que esse objetivo seja atendido está a Genética fornecendo informações para tornar o melhoramento genético das plantas o mais eficiente possível. A ênfase dada ao aumento da produtividade agrícola pelo melhoramento genético é conseqüência da grande necessidade de uma fonte adequada de alimentação, capaz de satisfazer o constante crescimento da população num mundo de área limitada. Excetuando-se breves períodos de fartura, as populações humanas, bem como as populações de outros animais, têm passado fome. Cada período de abundância tem contribuído para um aumento da população, seguindo-se, depois, períodos de escassez de alimentos.

A biodiversidade engloba todas as espécies de plantas, de animais e de microrganismo, assim como os ecossistemas e os processos ecológicos dos quais estas espécies fazem parte. Estima-se que a diversidade global das espécies de plantas superiores gira ao redor de 300.000 a 500.000, das quais cerca de 250.000 foram identificadas ou descritas (FAO, 1996). Cerca de 30.000 destas são de espécies comestíveis e cerca de 7.000 delas são cultivadas ou coletadas pelo homem para a sua alimentação (Wilson, 1995; Heywood, 1995). Deduzindo-se então que do total de espécies, apenas algumas centenas contribuem para a segurança alimentar da humanidade. Muitas afirmações existem também, de que somente 30 destas espécies "alimentam o mundo" (Wilson, 1992) e que são estas espécies as que fornecem 95% das calorias e proteínas para a dieta dos seres humanos. Afirma-se também, que somente três espécies fornecem mais da metade da energia total derivada das plantas – trigo (23%), arroz (26%) e milho (7%). Sete outras espécies contribuem com 75% do total dos alimentos energéticos – sorgo, milheto, batata, batata-doce, soja, cana-de-açúcar e beterraba (Mooney, 1983; McNeely & Wachtel, 1988).

Existe uma preocupação constante em tornar a produção de alimentos mais eficiente, bem como, em estudar novos métodos de produção. Assim, por exemplo, têm sido conduzidos trabalhos procurando ampliar as fontes de alimentos, como através da domesticação de novas espécies de plantas e animais, produção de proteína a partir de microrganismos, cultivos de algas, cultivo de plantas em soluções nutritivas, "fazendas" marinhas, produção de alimentos sintéticos etc. Tais meios poderão contribuir muito no futuro. Entretanto, a curto e médio prazo, a humanidade deverá se valer dos meios

mais convencionais para o seu sustento. O aumento da produção de alimentos pode ser conseguido pelos seguintes meios convencionais: aumento da área cultivada, emprego de melhores técnicas agronômicas e melhoramento genético (Paterniani, 1979).

Contudo, é na região dos trópicos úmidos onde encontra-se maior disponibilidade de terra para ampliar a área cultivada e espécies vegetais a serem domesticadas. A constatação do pouco conhecimento existente sobre nível de variabilidade genética em populações naturais nessa região, revela uma grande preocupação com os ecossistemas tropicais considerando o seu potencial agrícola e florestal.

A abordagem sobre espécies selvagens e sua utilização no melhoramento genético deve ser canalizada para as regiões tropicais, pois entende-se que os programas de melhoramento genético das espécies serão fortalecidos à medida que o entendimento do significado da ampla distribuição da variabilidade nos ecossistemas tropicais, pode sugerir mudanças nos atuais sistemas de cultivos utilizados para as diferentes espécies.

2. ESPÉCIES SELVAGENS OU NÃO DOMESTICADAS

O conceito de espécie selvagem aplica-se melhor àquelas espécies que ainda não foram manipuladas pelo homem, independente de ter havido utilização dos seus produtos. A simples utilização de frutos e/ou outro produto que uma espécie fornece em seu ambiente natural, não implica no início do processo de domesticação. Quando é feita colheita de frutos e as sementes são conservadas para novamente serem plantadas, inicia-se um processo de adaptação da espécie a um novo ambiente (seleção inconsciente). Posteriormente, pode haver mudança na freqüência gênica, caracterizando o início da domesticação.

Certamente que a presença humana, especialmente com ocupação prolongada de certas áreas, favoreceu a expansão de certas espécies vegetais, principalmente, daquelas que são utilizadas em sua alimentação. Embora existam alguns dados de cultivo muito antigo de algumas fruteiras, o cultivo sistemático de espécies frutíferas é mais recente do que o cultivo de cereais, raízes e tubérculos e, provavelmente, corresponde a uma agricultura já mais estruturada.

As florestas tropicais oferecem um grande número de plantas com valor socioeconômico atual e potencial para o processo de domesticação, o que sugere a existência de muitas oportunidades de trabalho neste campo, indo desde a botânica e etnobotânica, abrangendo a antropologia, arqueologia, geografia e ciências agrícolas.

A dimensão evolucionária e ecológica da domesticação das plantas selvagens tem sido bastante enfatizada. Nos trópicos, por exemplo, métodos de transplantio e proteção de plantas primeiramente ocorreram há cerca de 40 mil anos atrás, de acordo com os antecedentes da agricultura neolítica do novo mundo, embora existam desacordos sobre a taxonomia dessa domesticação, cuja ação muitas das vezes ocorreu de maneira acidental.

A domesticação de plantas é um processo contínuo, passando por vários estágios, tendo como principal objetivo a composição da cadeia produtiva do agronegócio com base tecnológica. Como resultado é vasta a lista de plantas já trabalhadas, embora existam muitas outras que precisam ser domesticadas, como o

patauá (*Jessenia bataua*), macaúba (*Acrocomia sclerocarpa*), castanha sapucaia (*Lecythis* spp.), e camu-camu (*Myrciaria dubia*). Um dos grandes exemplos da domesticação de plantas vem ocorrendo com o dendê (*Elaeis guineensis*), que após cerca de 100 anos de manejo e uso do germoplasma, de uma produção inicial de 300 Kg de óleo por hectare/ano vem alcançando rendimentos ao redor de 10 mil Kg/ha/ano (Vilela-Morales & Valois, 2000).

A domesticação de plantas é um processo em plena ascensão e inúmeros trabalhos adicionais de etnobotânica e outros precisam ser desenvolvidos.

No Brasil, existem muitas espécies selvagens restritas aos ecossistemas ainda pouco conhecido, como o da região tropical úmida, que pela sua amplitude não permitiu a exploração do seu potencial. Para muitas espécies em diferentes ecossistemas existem diferentes níveis de domesticação, estreitamente relacionado ao nível de conhecimento de cada espécie.

Segundo Kerr *et al.* (1986), os portugueses e espanhóis introduziram uma grande quantidade de espécies de plantas na região Amazônica para o seu consumo pessoal. Entre as espécies que se adaptaram muito bem, inclusive permitindo a seleção de variedades locais têm-se o coentro, o maxixe, o pepino, o feijão-de-metro, o quiabo, o gergelim, a vinagreira, o jambeiro, a jaqueira, a fruta-pão, muitos citros, a mangueira, o abacateiro, a bananeira, o limãozinho, a carambola etc. Algumas dessas espécies até hoje vêm sendo trabalhada nos institutos de pesquisa da região. Por outro lado, os índios estão na Amazônia há mais de 10.000 anos e nesse período domesticaram todas as plantas hoje conhecidas. No entanto, é muito difícil precisar quando as várias espécies, hoje consumidas na região, foram domesticadas.

3. FATORES RELACIONADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO

As árvores da floresta tropical úmida são de vida longa, apresentam características demográficas únicas e diversificados modos de reprodução. Ocorrem em baixa densidade e são polinizadas por pequenas vespas e até por grandes morcegos (Bawa *et al.*, 1985), além de terem suas sementes dispersas por uma ampla diversidade de animais.

Além disso, outros estudos têm revelado que a floresta tropical se caracteriza por apresentar grande diversidade de espécies, com sistema predominante de polinização via animal; distribuição geográfica das plantas do tipo agrupada; e ecossistema apresentando grande heterogeneidade ambiental (Gomez-Pompa *et al.*, 1972; Bawa, 1974; Bawa & Opler, 1975; Hamrick, 1983; Kageyama, 1990). Essas características são fundamentais para que o nível de variabilidade, contido dentro das populações, tenha importante significado biológico no equilíbrio do ecossistema.

A auto-incompatibilidade ocorre com bastante freqüência nas espécies tropicais (Figura 1). É um mecanismo que evita a autofecundação das plantas, favorecendo o cruzamento e a troca de genes entre plantas da mesma espécie. Por outro lado, as espécies que possuem sistemas reprodutivos que favorecem o cruzamento entre plantas podem apresentar um certo grau de endogamia, se o cruzamento for entre plantas com um ancestral comum. Assim, torna-se evidente que a variação de fatores relacionados ao comportamento do polinizador e sua seleção podem ser importantes na evolução dos sistemas reprodutivos (Bawa & Opler, 1975; Frankie *et al.*, 1976).

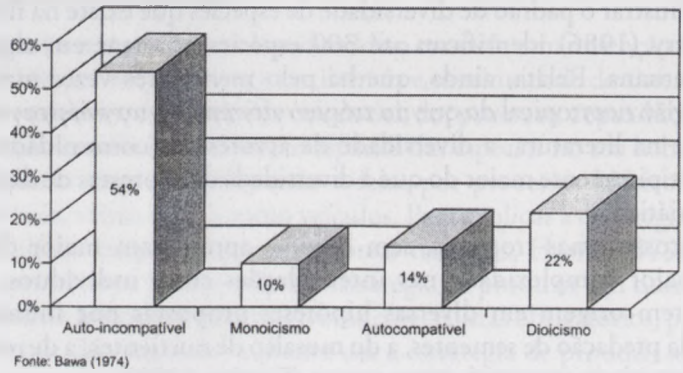


FIGURA 1. Proporção relativa de espécies arbóreas (%) com diferentes sistemas reprodutivos.

A percentagem de autofecundação ou cruzamento que acontece em plantas na floresta tropical pode variar em função do clima, da disponibilidade do polinizador e da dispersão das plantas, considerando uma espécie em particular dentro da faixa de vôo do polinizador. Por isso, torna-se difícil medir a taxa de cruzamento para muitas espécies tropicais.

Naturalmente, uma população de plantas para sobreviver e persistir no tempo deve encontrar-se adaptada ao solo e ao meio ambiente em que vive, como também ter condições de adaptação às mudanças que podem ocorrer em seu ambiente, característica que é favorecida por alguns mecanismos promotores de variabilidade genética, tais como mutação e recombinação (Kageyama & Patiño-Valera, 1985).

A complexidade dos ecossistemas naturais de espécies arbóreas nas florestas tropicais é indicativa de que os estudos sobre estimativas da variação genética em populações naturais devem se orientar para a quantificação desta variação, entre e dentro de populações.

Hamrick (1983) demonstra que o sistema de cruzamento e o mecanismo de dispersão de sementes das espécies afetam diretamente a distribuição da variação genética, tanto dentro como entre populações. As espécies com maior potencial de movimentação de genes, as polinizadas pelo vento e aquelas que tenham mecanismos de dispersão das sementes pelo vento, mostraram relativamente pouca diferenciação genética entre suas populações.

3.1 EQUILÍBRIO BIOLÓGICO NAS POPULAÇÕES NATURAIS

3.1.1 DIVERSIDADE DE ESPÉCIES

Conforme diminui a latitude e aumenta o gradiente térmico-úmido, o número de espécies nas diversas comunidades vai aumentando, até atingir um máximo nas florestas tropicais úmidas (Tabela 1). A região tropical se caracteriza por apresentar grande número de espécies por unidade de área, representadas por poucos indivíduos de cada espécie, comumente em torno de 300 espécies arbóreas por hectare. Algumas vezes, acima de 500 espécies por hectare podem ser encontradas na floresta amazônica (Kubitzki, 1985).

Para ilustrar o padrão de diversidade de espécies que existe na floresta tropical úmida, Gentry (1986) identificou até 300 espécies arbóreas em alguns locais da Amazônia peruana. Relata, ainda, que há pelo menos três vezes mais espécies de plantas na região neotropical do que no trópico africano ou no asiático; e, ao contrário do que existe na literatura, a diversidade de árvores das comunidades amazônicas individuais é tipicamente maior do que a diversidade das florestas de dipterocarpáceas do sudeste asiático.

Os ecossistemas tropicais, sem dúvida, apresentam maior diversidade de espécies e maior complexidade nas inter-relações entre indivíduos. Esta grande diversidade tem origem em diversas hipóteses propostas por inúmeros autores, incluindo a da predação de sementes, a do mosaico de nutrientes, a de redes circulares, a de heterogeneidade temporal, entre outras (Pianka, 1983).

A diversidade é resultante da somatória de vários fatores interagindo no ecossistema. Como conseqüência, indivíduos de uma mesma espécie ficam isolados entre outros de outras espécies, havendo implicações na dinâmica da floresta em termos de interação planta x animal, os quais são interdependentes e bem co-adaptados, dando uma integração e estabilidade ao ecossistema.

Para que ocorra adaptação das espécies em sobreviver às condições reinantes nos ambientes tropicais é necessário haver, também, diversificação entre indivíduos. Odum (1975) ressaltou as vantagens da diversidade de espécies, com implicação no valor de sobrevivência para a comunidade, o qual consiste de uma maior estabilidade.

O ambiente tropical permite alta taxa de evolução, diversificação e especiação, devido à reprodução rápida, contínua e intensiva seleção natural. Conseqüentemente, deve haver uma substancial contribuição à diversidade. Segundo Brown Jr. (1987), parece que as regiões de maior heterogeneidade no ambiente permitem uma acomodação da maior parte da diversidade potencial.

A diversidade de ambientes que existe na floresta tropical, de certa forma, determina a existência de diversidade nas populações de plantas. Além do que, as perturbações que ocorrem no meio também provocam alterações nessas populações, no sentido de atingir um novo equilíbrio. A manutenção do equilíbrio depende também da existência de complexas interações entre as plantas e o meio ambiente.

TABELA 1. Número de espécies arbóreas existentes em diferentes ecossistemas florestais.

ECOSSISTEMA	LOCALIDADE	Nº DE ESPÉCIES	REFERÊNCIA
Floresta de Coníferas	Michigan-USA	10	Spurr & Barnes (1982)
Floresta de pinus patula	Novo León (México)	27	Vela (1980)
Cerrado	Brasília - BR	82	Aoki & Dos Santos (1982)
Floresta Subtropical	São Paulo - BR	189	Baitello & Aguiar (1982)
Floresta Tropical	Panamá	133	Knight (1975)
Floresta Tropical	Amazonas - BR	265	Rosot et al. (1982)
Floresta Tropical	Amazonas - BR	310	Shubart (1983)

Fonte: Kageyama & Patiño-Valera (1985)

3.1.2 DENSIDADE DE PLANTAS

A dispersão tem um grande significado no controle e manutenção da diversidade biótica por ser um pré-requisito para a existência e continuidade do sistema tropical. A dispersão de sementes é uma parte essencial do processo reprodutivo, que está intimamente relacionado à distribuição espacial das espécies no seu habitat natural.

Na floresta tropical a dispersão é feita por processos bióticos e abióticos, incluindo animais, vento e água como veículos. Para explicar a estratégia da dispersão das sementes utilizadas pelas espécies arbóreas tropicais, Howe (1979) sugeriu três modelos. No primeiro, a planta utiliza a estratégia de produzir um número pequeno de frutos altamente nutritivos para frugívoros especialistas obrigatórios, por um grande período de tempo. No segundo, a planta usa a estratégia de produzir abruptamente um grande número de frutos, porém, de baixa qualidade nutritiva, que são consumidos por animais frugívoros generalistas. Finalmente, no terceiro modelo, a estratégia utilizada pela planta inclui a produção de grande quantidade de frutos, em um curto período, que são dispersados por animais frugívoros, os quais sofrem grande risco de serem predados por outros animais, nos arredores da planta produtora.

Quando se estuda a densidade de plantas de uma espécie em seu local de ocorrência natural é comum inferir-se que, quanto mais baixa for esta relação maior é o nível de problemas biológicos relacionados com a espécie. Por exemplo, para a seringueira (*Hevea brasiliensis*) a relação é de 4-6 plantas por hectare e o seu cultivo na região de origem em muito maior densidade sofre sérios problemas relativos ao ataque de enfermidades e pragas.

Para ocorrer o fluxo gênico, entre e dentro de populações naturais, é necessário que a espécie mantenha interação com o meio ambiente. A manutenção desta interação é condição necessária para haver equilíbrio da espécie com o meio ambiente. O equilíbrio é manifestado pelas plantas que conseguem sobreviver, mesmo num ambiente favorável ao aparecimento de enfermidades. Isto ocorre porque a floresta tropical caracteriza-se por apresentar baixa densidade de plantas de uma mesma espécie por hectare.

Kageyama (1990) refere-se à riqueza do ecossistema tropical como sendo devido à freqüência de espécies raras, que ocorrem em baixa densidade, com menos de um indivíduo por hectare. Levanta ainda as hipóteses de que este grupo de plantas tem um polinizador específico, sofre uma seleção dependente da freqüência e tem um sistema de reprodução alternativo.

O cultivo de espécies autóctones da região tropical, via de regra, desrespeita as características básicas que as mantêm em suas populações naturais. Estas características - alta e baixa densidade - são responsáveis, em parte, pela manutenção do equilíbrio biológico existente nas populações.

O monocultivo, por exemplo, normalmente não atende a esses requisitos e conduz à uniformidade, na expectativa do aumento de produtividade. Em qualquer ambiente, a uniformidade do material genético expõe o plantio a riscos de perdas, devido ao surgimento de novas pragas e/ou enfermidades. Nas regiões tropicais, a uniformidade inviabiliza a manutenção da atividade agrícola, em decorrência de um processo biológico mais dinâmico. Por isso, a assertiva de Paterniani (1988) de que "o progresso conduz à uniformidade e a uniformidade conduz ao fracasso ", aplica-se com maior propriedade a essa região.

3.1.3 VARIAÇÃO GENÉTICA

As diferenças existentes entre plantas, basicamente têm origem em três causas distintas: as diferenças de ambientes nos quais as plantas estão crescendo; as diferenças devido às interações entre plantas e ambientes; e as diferenças genéticas entre plantas.

Do ponto de vista evolutivo, Stebbins (1974) destaca que a variabilidade genética das populações possui três componentes principais: a) ambiental, devido à plasticidade fenotípica; b) genético e recombinacional; c) genético e mutacional. Por outro lado, Allard (1971) reuniu em três categorias as principais formas, segundo as quais as plantas evoluíram: a) através da variação mendeliana; b) da hibridação interespecífica; c) da poliploidia. Não obstante, todos os autores concordam que as mutações são a única fonte de nova variabilidade genética, sem a qual a evolução não poderia progredir por muito tempo.

A variação fenotípica determinada pelo meio ambiente, normalmente tem caráter adaptativo, o que auxilia as plantas a ajustarem-se melhor ao ambiente específico em que vivem. Algumas espécies de plantas podem variar marcadamente, alterando seus padrões de crescimento em respostas às mudanças em seus ambientes, apesar que essas modificações adaptativas não são incorporadas à hereditariedade genética.

A variação ambiental é entendida pelos pesquisadores e o seu manejo é a base de muitas atividades agrícolas. Alguns fatores ambientais, que influenciam o crescimento das plantas, podem ser controlados e manipulados, enquanto que outros não podem. Podem ser controlados, por exemplo, a competição entre plantas, deficiência de nutrientes e disponibilidade de água no solo. Enquanto que, ocorrência de chuva, vento, temperatura e intensidade de radiação solar não podem ser influenciados pelo homem.

A hibridação entre populações que possuem diferentes combinações adaptativas de genes pode aumentar consideravelmente a dimensão do conjunto gênico quanto a genes dotados de valores adaptativos diferentes, desde que os híbridos possam dar origem a progênies segregantes em gerações posteriores. Provavelmente, a maioria dos segregados obtidos de tais híbridos terá um valor adaptativo menor do que qualquer das populações ascendentes, porém, uma pequena porção deles pode resultar ser melhor adaptada a certos ambientes.

A hibridação só será um fator importante na evolução se forem satisfeitas as seguintes condições: a) existência de um ou mais nichos ecológicos disponíveis, para os quais certos derivados híbridos estejam melhor adaptados do que qualquer das populações ascendentes; b) quando na progênie de híbridos parcialmente estéreis, a fertilidade consegue ser restaurada enquanto ainda presentes as novas e valiosas combinações gênicas resultantes da hibridação; c) que as novas combinações devam tornar-se suficientemente constantes do ponto de vista genético para que se possam manter sob condições naturais (Stebbins, 1974).

Na floresta tropical, a hibridação que ocorre entre plantas de polinização cruzada obrigatória (auto-estéreis), em que as plantas são distanciadas entre si, dependem da polinização por animais. Por essa razão, elas desenvolvem mecanismos para atrair certo conjunto de polinizadores, evitar ou afastar visitantes de flores que não têm função polinizadora e aumentar a variabilidade genética das sementes produzidas.

A hibridação como causa de variação genética, além de proporcionar a combinação de dois conjuntos gênicos de indivíduos distintos, possibilita também a ocorrência da recombinação, que se constitui na fonte imediata de variação ao nível de genótipo.

A mutação, definida como qualquer mudança na estrutura molecular do DNA e/ou cromossomo, quando hereditária se constitui em uma das fontes originais da variação genética. Evolutivamente, a mutação direciona a mudança na freqüência gênica, alterando um estado alélico em outro, a uma determinada taxa e, como conseqüência, surgem alterações no modelo e quantidade de variabilidade genética do caráter.

A seleção natural orienta a evolução não pela rejeição ou aceitação de mutações, quando elas ocorrem, mas escolhendo novas combinações adaptativas em um conjunto gênico de variabilidade, que foi estabelecido pela ação combinada da mutação, recombinação gênica e seleção, durante várias gerações.

Como as evidências indicam, a maioria das mutações que tem contribuído para a evolução é aquela que isoladamente tem pequenos efeitos no fenótipo. Não é difícil de imaginar o papel que as mutações tiveram na evolução e formação da variabilidade genética das espécies tropicais, devido à grande quantidade de pequenas variações ambientais que forma os ecossistemas tropicais.

A modificação ambiental e a recombinação genética contribuem para a maior parte da variação encontrada em qualquer população natural (Stebbins, 1974). É possível que, resguardadas as proporções, o significado das mutações tenha sido maior para a formação das espécies tropicais em relação às espécies de clima temperado.

A fecundação cruzada representa um fator altamente positivo, baseado na maior variabilidade genética produzida pelos constantes intercâmbios e recombinações entre os indivíduos heterozigotos (Faegri & Pijl, 1976). Esses resultados são corroborados pelos estudos de Bawa (1974), que demonstrou haver predominância de alogamia nas florestas tropicais.

Hamrick (1983) relaciona a efetividade da distância de vôo do polinizador com a distribuição da variação genética entre e dentro de populações de espécies arbóreas polinizadas por animais, sugerindo padrões de variação próximos aos das espécies autógamas para aquelas cujos polinizadores são de vôos curtos; e, até, padrões similares aos das espécies alógamas com dispersão de pólen pelo vento, para aquelas que têm polinizadores de vôos longos.

Do mesmo modo, Kageyama & Patiño-Valera (1985) formularam a hipótese de que a distribuição espacial dos indivíduos de uma espécie está interligada intimamente ao tipo de polinização e de dispersão de sementes dessa espécie. Assim, existiria um *continuum* de gradação, desde espécies arbóreas, com distribuição agrupada, associadas a polinizadores e dispersores de vôos curtos, até àquelas, com distribuição muito dispersa, associadas a polinizadores e dispersores de vôos longos. Nesse contexto, os padrões de fluxo gênico, através da dispersão de pólen e sementes, parecem fortemente relacionados com os padrões de variação genética nas populações.

A complexidade dos ecossistemas naturais das espécies arbóreas nas florestas tropicais é indicativo de que os estudos sobre estimativas de variação genética em populações naturais, devem orientar-se para a quantificação da variação entre e dentro de populações (Tabela 2).

TABELA 2. Diversidade genética total (H_T), dentro da população (H_S), entre populações (G_{ST}) e proporção da diversidade entre em relação a total (D_{ST}), para quatro locos identificados por eletroforese em duas populações naturais de seringueiras.

LOCOS	Nº DE PLANTAS*	H_T	H_S	G_{ST}	D_{ST}
LAP-1	1020	0,3109	0,3096	0,0042	0,0013
LAP-2	962	0,2211	0,2206	0,0023	0,0005
SKDH	853	0,6253	0,6239	0,0022	0,0014
MDH-1	976	0,0726	0,0712	0,0193	0,0014
MÉDIA	3811	0,3356	0,3351	0,0003	0,0001

*número total de plantas analisadas nas duas populações.
Fonte: Paiva (1992)

Esses conhecimentos são adquiridos a partir de informações básicas sobre a biologia reprodutiva, forma e padrão de distribuição das espécies e das estimativas de variâncias fenotípicas e genotípicas.

3.2 COLETA, CONSERVAÇÃO E USO DA VARIAÇÃO GENÉTICA

Para iniciar um programa de melhoramento genético de qualquer espécie vegetal é necessário reunir a variabilidade genética disponível, através da introdução de material genético tanto na forma de semente como de qualquer outra parte vegetativa da planta. Quando a espécie é selvagem é necessário realizar operação de coleta de material genético na região de ocorrência natural da espécie.

As atividades de coleta de germoplasma distinguem-se em dois objetivos básicos, quanto ao tipo de material coletado. Quando a coleta é parte de planta para multiplicação assexuada (semente assexuada), ela tem como finalidade a clonagem seguida de teste destes novos clones. Neste caso, todo o material coletado é conservado. Quando a coleta é de sementes sexuadas e sua conservação é feita em coleções mantidas em campo, torna-se necessário que uma seleção branda seja efetuada, antes da instalação definitiva, para que a quantidade de material a conservar seja adequada à disponibilidade da área.

O esforço na coleta de espécies arbóreas deve ser determinado pela magnitude relativa da variação genética entre e dentro de populações, de modo a coletar e conservar o máximo de variabilidade genética. Paiva (1992) destaca que a coleta de seringueira, com base nos parâmetros de Nei (1973), pode ser direcionada para uma ou poucas populações, em uma determinada região de coleta, e um maior número de indivíduos por população. Com este procedimento, coleta-se maior representatividade genética da espécie a um custo menor.

Na região Amazônica, habitat natural de inúmeras espécies vegetais de valor econômico atual e potencial, extensas áreas ainda estão sendo desmatadas, principalmente nos Estados do Acre, Rondônia, sul do Pará e norte de Mato Grosso. A substituição gradativa da vegetação natural condena ao desaparecimento inúmeras populações locais de espécies de valor genético imensurável.

A conservação da variabilidade genética existente em plantas na floresta tropical pode ser feita de duas maneiras: conservação *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ* as espécies são deixadas em seus habitats naturais, objetivando garantir proteção ao

conjunto de genes das espécies e, quando necessário, preservar seu ecossistema inteiro. Nesse caso, para que a conservação seja eficiente, tornar-se necessário o conhecimento científico de biologia reprodutiva, ecologia, padrão de distribuição das espécies envolvidas, além do conhecimento prévio da existência de suficiente variabilidade genética nas populações das espécies envolvidas e de sua forma de distribuição comparada a outras populações naturais.

A conservação *ex situ* refere-se à manutenção de genes ou complexos de genes em condições artificiais, fora do seu habitat natural. Este tipo de conservação pode ser feito através de coleções permanentes de pólen, sementes, culturas de tecidos ou coleções de plantas mantidas em campo, entre outros.

Em alguns programas de melhoramento de espécies regionais vêm-se processando, gradativamente, a perda de variabilidade genética, devido principalmente ao pouco interesse em conservar material que não apresente características desejáveis, no atual estágio de desenvolvimento das técnicas de melhoramento inerente a cada espécie. Material atualmente considerado de pouca importância para os melhoristas poderá ser de grande utilidade no futuro. Por exemplo, a constante busca de fontes de resistência a doença, visando a seleção de plantas resistentes, determina a eliminação de genes responsáveis pela produção, quando não existe correlação positiva entre os dois grupos de genes.

Assim é que novas fontes de resistência às enfermidades são procuradas na natureza, visando introduzir maior variabilidade genética nos programas de melhoramento. A complexidade dos ecossistemas naturais das espécies arbóreas nas florestas tropicais dificulta o processo de coleta e conservação, por falta de suficiente conhecimento científico.

As espécies arbóreas possuem três características essenciais que devem ser consideradas no processo de conservação das coleções: a) geralmente as coleções são grandes e ocupam áreas muito extensas, dificultando a representatividade de cada tipo para um certo número de indivíduos; b) são de longo ciclo de vida, assegurando permanência e estabilidade no tempo; c) são espécies selvagens, predominantemente alógamas, que se estabilizam ocupando grandes áreas nos habitats naturais e possuem um alto grau de heterozigose, além de numerosos ecótipos que apresentam grandes diferenças (Bouvarel, 1970).

O ambiente nos trópicos é extremamente favorável ao desenvolvimento de pragas e enfermidades que causam sérios problemas as espécies quando estão sendo cultivadas em monocultivo, principalmente, na região de ocorrência natural da espécie.

Os programas de melhoramento genético dessas espécies, objetivam, principalmente, resistência a enfermidades e aumento de produção. Para as culturas perenes, o tempo de obtenção de uma nova cultivar é bastante longo, em contraste com as espécies de ciclo curto. Muitas vezes, uma nova cultivar obtida é inviabilizada em um curto período de tempo, devido ao surgimento de uma nova raça do patógeno.

O aumento do nível de conhecimento dos ecossistemas naturais nos trópicos, obviamente, terá implicações diretas tanto nos processos de cultivos atualmente utilizados para as diferentes espécies, como nos programas de melhoramento genético, no que se refere à maior exploração da variabilidade existente nas espécies, mas para tanto, é necessário que essa variabilidade esteja disponível.

TABELA 3. Recursos genéticos de espécies autóctones mantidos em coleções locais.

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA	Nº DE ACESSOS	INSTITUIÇÃO
Taperebá	*Spondias lutea* L.	Anacardiaceae	1	CPATU
Sapota	*Quararibea cordata* (Humb. & Bompl.) Vischer	Bombacaceae	40	CPATU, INPA
Castanha do Brasil	*Bertholletia excelsa* H.B.K.	Lecitidaceae	45	CPATU
Murici	*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth	Malpiguiaceae	2	FCAP, INPA
Goiaba	*Psidium guayava* L.	Myrtaceae	13	FCAP
Pupunha	*Bactris gasipaes* H.B.K.	Palmae	288	INPA, FCAP, CPATU
Cupuaçu	*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex [illegible] Schum	Sterculiacea	9	CPATU, FCAP, INPA
Biribá	*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill	Anonaceae	15	INPA, CPATU
Bacuri	*Platomia* [illegible] Mart.	Gutiferae	2	FCAP, CPATU
Araçá-boi	*Eugenia stipitata* McVaugh	Myrtaceae	10	INPA, CPATU
Camu-camu	*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh	Myrtaceae	4	INPA

Fonte: Adaptado de Clement *et al.* (1982)

A conservação da variabilidade genética de espécies autóctones, feita através de coleções mantidas em campo, nos denominados bancos de germoplasma, vem sendo efetuada por várias instituições de pesquisa da região amazônica, por exemplo (Tabela 3). Pelos dados existentes na literatura e informações de pesquisadores envolvidos com tal atividade os resultados alcançados na manutenção dessas coleções precisam ser melhor analisados.

Afora os problemas de natureza não técnica que, muitas vezes, provocam solução de continuidade no sistema de conservação, os problemas de ordem técnica são limitantes para certas culturas e de solução onerosa para muitas, devido ao desequilíbrio biológico provocado pelo monocultivo. Por exemplo, o constante ataque de pragas e enfermidades em plantas de algumas espécies de Hevea, portadoras de genoma para produção de borracha, mantidas no BAG-Seringueira, no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus (AM), praticamente inviabilizou a conservação desse germoplasma na região.

3.3 TAXA DE CRUZAMENTO E ENDOGAMIA

Os métodos tradicionais de avaliação de sistema de reprodução de uma espécie baseiam-se na observação de cruzamentos, no comportamento dos agentes polinizadores, no exame da morfologia floral das plantas, ou nos resultados de experimentos com polinizações controladas. Estes métodos, apesar de fornecerem indicações sobre o sistema de reprodução da espécie, não possibilitam uma medida direta do sucesso reprodutivo nas populações e se tornam inadequados para a análise ao nível populacional.

A determinação da taxa de cruzamento em populações naturais sempre teve as seguintes limitações: distância irregular entre plantas (principalmente em espécies arbóreas), barreiras naturais entre plantas, identificação de um bom marcador genético e a expressão de dominância exibida, na maioria das vezes, por esses marcadores.

Ritland & Jain (1981) destacam a força e a versatilidade dos processos de estimação quando são utilizados dados de eletroforese, considerando que muitos locos segregantes com alelos co-dominantes podem, freqüentemente, ser encontrados nas populações.

As pesquisas com a maioria das espécies tropicais no Brasil, principalmente na região amazônica, sempre foram impulsionadas pela necessidade premente de viabilizar o cultivo comercial nesse ecossistema, ou mesmo, o aumento de produção. A geração de tecnologias que causassem impacto imediato sobre a produtividade de plantios comerciais tinham sempre prioridade em relação aos estudos básicos na cultura. O predomínio desse raciocínio imediatista, não resta dúvida, causou sérios danos à pesquisa científica com espécies perenes.

Os estudos básicos, nessas espécies, envolvendo questões importantes para o melhoramento genético, tais como biologia reprodutiva, identificação de agente polinizador, estrutura genética de populações naturais, taxa de fertilização cruzada, taxa de autofecundação natural, entre outros, sempre foram relegados a um plano secundário.

O nível de conhecimento dos ecossistemas tropicais tem aumentado nas últimas décadas, tirando muitas dúvidas e, em alguns casos, provocando mudanças de conceitos existentes anteriormente. Corner (1954) sugeriu a autogamia como sistema de reprodução predominante na floresta tropical, devido à assincronia na abertura das flores e à mobilidade limitada dos polinizadores. Posteriormente, Baker (1959) propôs que a estrutura complexa da floresta impediria o movimento de polinizadores entre as árvores e, como conseqüência, a maioria das árvores seria autopolinizada.

Nesta mesma linha, Fedorov (1966) também defendia a autogamia e a existência de endogamia nas plantas tropicais, baseado no fato da assincronia do florescimento, isolamento espacial entre indivíduos de uma mesma espécie e a baixa densidade populacional. Asthon (1969) contraria os demais autores relatando que as árvores tropicais poderiam ser predominantemente de cruzamento. Mais tarde, Janzen (1971) demonstrou que certos polinizadores podiam forragear a longas distâncias, com possibilidade de trazer pólen de plantas distantes.

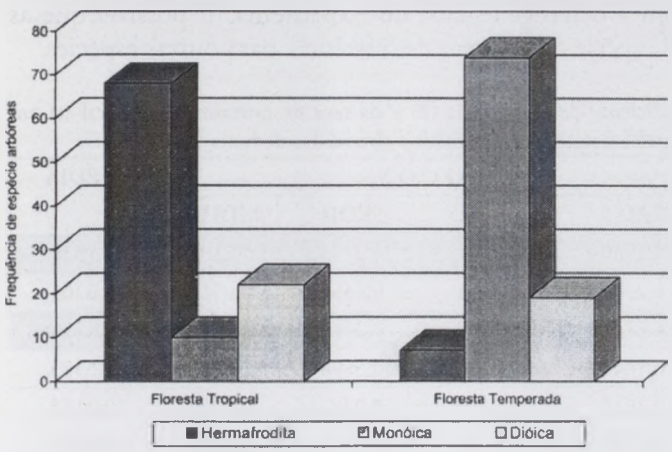


FIGURA 2. Expressão sexual de espécies arbóreas nas florestas de clima tropical e temperado.

Com base em estudo mais profundo, Bawa (1974) demonstrou que a alogamia predominava nas espécies tropicais da floresta semidecídua da Costa Rica. Relatou, ainda, que a floresta tropical apresenta 68% de espécies hermafroditas, 10% de monóicas e 22% de dióicas, o que difere drasticamente das florestas de clima temperado (Figura 2).

Vários autores têm procurado obter mais evidências que assegurem a generalidade da predominância da alogamia para as espécies arbóreas. Os dados de Tomlinson, citado por Bawa (1976), sobre morfologia floral de um grande número de espécies arbóreas do sul da Flórida, indicam também a predominância de fertilização cruzada.

Bullock (1985), estudando o sistema reprodutivo de 33 espécies arbóreas e arbustivas do México, concluiu que 76% das espécies se apresentavam auto-incompatíveis. O'Malley *et al.* (1988), utilizando a metodologia de multilocos, estimaram uma taxa de cruzamento de 0,85 ± 0,03 para a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), destacando que a alogamia é predominante nesta espécie, porém não descartaram a possibilidade de ocorrer baixos níveis de endogamia.

Por outro lado, Paiva (1992) encontrou baixas taxas de fertilização cruzada e de coeficiente de endogamia em seringueira (*Hevea* spp.), calculadas a partir das análises das freqüências de alelos em populações naturais localizadas no Estado do Acre, situando-se em torno de 64% e 21%, respectivamente (Tabela 4). Argumenta, também, que a taxa de cruzamento natural, apesar de baixa para os padrões de uma espécie tida como alógama, e o grau de endogamia da espécie, sejam estratégias biológicas desenvolvidas pela espécie, para poder manter o equilíbrio no ecossistema tropical. É sabido que a seringueira, cultivada em ambiente tropical, é dizimada pelo patógeno (*Microcyclus ulei*) e, no entanto, convive harmonicamente em equilíbrio com esse fungo em populações naturais, o que reforça a hipótese levantada.

Os ecossistemas tropicais, sem dúvida, apresentam maior diversidade de espécies e maior complexidade nas inter-relações entre organismos. A diversidade é resultante da somatória de vários fatores interagindo no ecossistema. Como conseqüência, os indivíduos de uma espécie, de certa forma, ficam isolados entre outros indivíduos de outras espécies. Isso tem implicações na dinâmica da floresta em termos de interação planta x animal, os quais são interdependentes e bem co-adaptados, dando uma integração e estabilidade ao ecossistema (Pianka, 1983).

Com base nesses argumentos, pode-se inferir que cada espécie da floresta tropical desenvolveu estratégias próprias de adaptação, objetivando conviver harmonicamente e em equilíbrio dinâmico com a heterogeneidade do ecossistema. É possível que as estratégias utilizadas por uma espécie não sirvam de referência para outras espécies.

TABELA 4. Valores médios do coeficiente de endogamia (F) e da taxa de cruzamento natural (t) em seringueira estimados pelas freqüências esperadas e observadas de heterozigotos.

População	Parâmetro	LOCOS				MÉDIA
		LAP-1	LAP-2	SKDH	MDH-1	
1	F	0,1400	0,2951	0,2148	0,2108	0,1930
	t	0,7544	0,5443	0,6464	0,6518	0,6764
2	F	0,1734	0,1567	0,2742	-0,0103	0,2134
	t	0,7044	0,7296	0,5696	1,0208	0,6483
MÉDIA	F	0,1644	0,2179	0,2481	0,1956	0,2184
	t	0,7176	0,6422	0,6024	0,6728	0,6415

Fonte: Paiva *et al.* (1993; 1994a)

4. EXPLORAÇÃO DA VARIABILIDADE NATURAL

4.1 ESPÉCIES DE PROPAGAÇÃO SEXUADA

Normalmente, o primeiro passo no aproveitamento dos recursos genéticos de espécies silvestre é essencialmente pela exploração extrativa. A escassez de alimentos aliado às características de mudanças freqüente dos povos indígenas, foram determinantes para que eles carregassem sementes das espécies mais utilizadas na sua alimentação. Esse processo ocorreu na região Amazônica. Logo a seguir, vieram os primeiros cultivos que foram com as espécies utilizadas na alimentação humana, cujo material de plantio foi de sementes coletadas em populações naturais, geralmente das plantas mais produtivas. Esses pequenos plantios familiares foram iniciados pelos silvícolas na região. Isso representa o marco do melhoramento genético das espécies autóctones da Amazônia, iniciado pela seleção massal de plantas mais produtivas.

Conforme relatam Kerr & Clemente (1980), os índios foram os primeiros a iniciarem os trabalhos de domesticação de muitas espécies vegetais (mandioca, milho e fruteiras), através da coleta, plantio e difusão do material. O hábito dos indígenas de compartilharem com os amigos as sementes de plantas das espécies mais aproveitadas na sua alimentação e que mais produziam, isto é, com frutos grandes e saborosos, proporcionou a recombinação e seleção continuada por muitas gerações. O intercâmbio de sementes ou partes vegetativas das plantas, foi decerto uma das formas mais importante de difusão cultural. Por isso, esses autores destacam a importância da coleta de germoplasma nessas comunidades, para continuação dos processos de domesticação e melhoramento genético das espécies de valor econômico atual e potencial.

A passagem da cultura extrativista, reinante por muito tempo na Amazônia, para o idealizado desenvolvimento sustentável, obrigatoriamente, seguiu o caminho da simples seleção massal até os métodos mais aprimorados de melhoramento, que utilizam a seleção de clones e progênies até cruzamentos controlados. A domesticação – nos tempos pré-históricos um processo gradual e em parte acidental de seleção e hibridação – pouco a pouco aumentou as fontes de alimentos e matérias-primas das comunidades indígenas. A pesquisa científica e tecnológica deve canalizar esforços para explorar com mais propriedade esse patrimônio, sobretudo no que concerne ao desenvolvimento da agricultura regional. A pesquisa com vistas a atender a atual agricultura existente na região, em termos de elevar a produtividade da terra e da mão-de-obra, pouco resultado tem apresentado.

No melhoramento genético de plantas tem sido utilizado técnicas e métodos que, se por um lado são perfeitamente ajustados aos ecossistemas diferentes daqueles da Amazônia tropical úmida, nesta região não tem apresentado resultados compatíveis com o esforço desenvolvido. Tem-se o problema do "mal-das-folhas" da seringueira, da "vassoura-de-bruxa" do cacaueiro, do Fusarium da pimenteira, da Antracnose do guaranazeiro, do "amarelecimento fatal" do dendezeiro, entre outros, que após décadas de pesquisa não foram devidamente solucionados e ainda estão a merecer uma contínua atenção da pesquisa.

A somatória de experiências em relação ao problema da ocorrência de enfermidades e pragas nas culturas perenes, tem levado ao raciocínio de que a busca e incorporação de novas fontes de resistência nas cultivares é normalmente demorada e facilmente destruída, pelo surgimento de novas raças de patógenos. As condições ambientais nos trópicos úmidos são altamente favoráveis ao desenvolvimento desses patógenos.

Entende-se que as pesquisas com melhoramento genético das espécies regionais deveriam, paralelamente à utilização das metodologias tradicionais, canalizar esforços também para à descoberta de estratégias que procurassem a convivência equilibrada entre patógenos e hospedeiros em cultivos comerciais. Este procedimento tentaria imitar o que acontece nas populações naturais, com relação ao equilíbrio existente entre as plantas e o meio ambiente. Neste caso, é fundamental o conhecimento de epidemiologia e genética dos patógenos, para que se estude a possibilidade de modificar ou mesmo interromper esse processo, associado às pesquisas de desenvolvimento do próprio hospedeiro.

Normalmente, nas regiões tropicais são utilizadas metodologias de pesquisa apropriadas aos locais de climas mais amenos. Essas metodologias sofrem adaptação e, algumas vezes, geram tecnologias que com o passar do tempo não mostram sustentação ecológica.

Na seleção de cultivares adaptadas ao ambiente tropical é despendido um grande esforço físico e financeiro na sua obtenção, pelo fato dos programas de melhoramentos trabalharem com um volume considerável de variabilidade genética. Dispor de grande quantidade de variabilidade é garantia de aumentar a probabilidade da ocorrência de tipos superiores nas populações selecionadas. Como conseqüência, torna-se mais difícil o manuseio dessa variabilidade, considerando o tamanho das populações a serem testadas e o aumento do tempo de obtenção de cultivares superiores.

No melhoramento genético das espécies de propagação sexuada os problemas atualmente observados são de naturezas contrárias em relação àqueles ocorrentes no melhoramento de espécies de propagação assexuada, isto é, excesso de variabilidade genética. O reflexo desse excesso é sentido na população final, cujo o progresso genético da seleção é baixo comparativamente ao seu potencial. Por outro lado, a redução drástica da variabilidade nas populações iniciais não é aconselhável, haja vista a redução da probabilidade de encontrar tipos superiores para outras características, principalmente aquelas ligadas à resistência a enfermidades e pragas.

4.2 ESPÉCIES DE PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

As diferenças ecológicas peculiares a cada região do Brasil onde são desenvolvidas pesquisas com melhoramento genético, associadas ao nível de tecnologia utilizado nos plantios comerciais, são fatores que determinam uma abordagem diferencial dos problemas de pesquisa.

Face às limitações da baixa produção dos clones das espécies cultivadas na região, devido à pressão de diferentes patógenos, o objetivo maior dos programas de melhoramento genético tem sido de associar em uma planta as características de resistência a enfermidades e produção. Basicamente, a estratégia utilizada consiste

no cruzamento entre materiais que apresentem as características favoráveis de produção e resistência as enfermidades, seguida da avaliação de progênies e clonagem das plantas superiores.

A perspectiva de progresso na seleção de clones produtivos é maior quando a incidência de doença é baixa. Assim é que em outras regiões do país, com condições ecológicas menos favoráveis ao desenvolvimento de enfermidades é possível o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de espécies nativas da Amazônia, em que a ênfase principal seja a maior produção. Cita-se como exemplo, o programa de melhoramento genético de seringueira desenvolvido no Planalto Paulista pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), que é conduzido à semelhança daquele desenvolvido no sudeste asiático e com perspectivas de obtenção de progressos genéticos tão grandes quanto àqueles obtidos na Malásia.

A propagação vegetativa normalmente conduz à uniformidade genética dos plantios ao contrário do que ocorre nas populações naturais, onde o nível de variabilidade genética, contida dentro das populações, tem um significado biológico importante para o equilíbrio do ecossistema. Allard (1971) destaca que, de acordo com a classificação de Vavilov, o centro de origem de uma espécie coincide com as áreas onde existe maior quantidade de variabilidade. Esses centros reúnem também grande diversidade de insetos e microrganismos, que fazem parte do ecossistema. Assim, pode-se explicar a presença de grande variabilidade genética nas populações naturais.

Para o melhorista a propagação assexuada constitui-se em uma "ferramenta" de trabalho muito atraente na obtenção de rápido progresso genético no material selecionado. Tanto é que os métodos de melhoramento utilizados nas espécies que têm facilidade de multiplicação assexuada, o maior esforço da pesquisa é centralizado para a identificação de plantas com características favoráveis, para em seguida fixá-las geneticamente. Para as espécies onde ainda não estão estabelecidas as técnicas de propagação vegetativa em larga escala, os esforços de pesquisa são direcionados para a descoberta destes métodos. Tão logo estejam disponíveis, são incorporados aos programas de melhoramento como uma estratégia auxiliar à obtenção de materiais resistentes e produtivos.

Para que a seleção tenha sucesso, em qualquer método de melhoramento, é necessário haver disponibilidade de variabilidade genética na população. A redução drástica dessa variabilidade, através da clonagem, normalmente conduz a grandes saltos de produtividade. Essa estratégia é utilizada com sucesso no plantio comercial com clones, em ambientes fora do seu habitat natural.

Quando o melhorista utiliza dessa prática, trabalhando na seleção de plantas para o plantio comercial em ambiente tropical, a tendência é sempre procurar plantas que apresentem todas as características favoráveis. Isto conduz a um erro clássico, haja vista não se dispor de evidências científicas que suportem a prática de sucesso no plantio com clones nesse ambiente. Pelo contrário, há indicativos que o monocultivo com clones de algumas espécies tropicais são bastante atacados por pragas e enfermidades.

A associação do melhoramento genético com métodos de cultivos mais apropriados às condições ecológicas dos trópicos úmidos, pode ser uma alternativa

no direcionamento das pesquisa para a região amazônica, com espécies que dispõem de facilidades para a multiplicação assexuada. É importante destacar que a uniformidade genética pode conduzir a maior produtividade nos cultivos, porém predispõe a ataques de pragas e enfermidades.

5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Apesar do pouco conhecimento científico existente sobre as espécies nativas da Amazônia por exemplo, a seringueira é considerada a espécie mais bem estudada, tendo em vista o caráter estratégico que a borracha – produto obtido pela coagulação do látex explorado das plantas – exerceu na industrialização do mundo de pós-guerra. Mesmo assim, os estudos básicos na espécie, envolvendo questões importantes para o melhoramento da cultura, quase sempre foram relegados a um plano secundário.

A grande quantidade de espécies nativas de importância econômica, tanto na alimentação humana como na transformação de riquezas, constitui em inúmeras oportunidades para o aprofundamento das pesquisas. Por isso, os referenciais utilizados para análise de estratégias de melhoramento genético são a seringueira e o dendê para o caso da Amazônia, considerando os conhecimentos científicos mais recentes.

A grande quantidade de variabilidade genética encontrada dentro das populações naturais, como em seringueira (Paiva, 1992; Paiva *et al.*, 1994b), associada à forma de distribuição dos indivíduos nas populações naturais, é um forte indicativo de que no cultivo racional de espécies autóctones em ambiente tropical úmido, a uniformidade genética do material deve ser evitada. A experiência atual dos plantios nessas regiões tem conduzido, com raras exceções, ao insucesso no cultivo.

O enfoque do melhoramento genético de espécies perenes que se propagam assexuadamente, implica em profundas modificações nos métodos de melhoramento em uso nas instituições de pesquisa da região. Para exemplificar, a população base utilizada pelo melhorista constituída atualmente de um reduzido conjunto de clones, mudaria para um amplo conjunto de plantas sexuadas, contendo uma porção bem maior de variabilidade genética. Isto possibilita, também, a maior exploração da variabilidade genética existente nas populações naturais.

Nessa linha de raciocínio, o melhoramento genético deixa de explorar só o vigor de híbrido dos cruzamentos. A obtenção de clones produtivos e resistentes não seria o objetivo principal do programa, mas sim os descendentes de plantas com características favoráveis, passando-se a explorar o melhoramento de populações. Essa estratégia de melhoramento tem por objetivo a obtenção de sementes melhoradas, a médio e longo prazo, visando ao pequeno produtor, em detrimento de uma maior produtividade das espécies, mas com a garantia de produção e sem a necessidade de controle fitossanitário.

Outra forma de representar o nível de variabilidade genética, contida dentro das populações, é incrementar as pesquisas com policultivos. A mistura de culturas perenes de expressão econômica, tende a se tornar uma realidade nas regiões tropicais, como forma de representar a diversidade das florestas tropicais. Neste caso, o plantio de clones elites de espécies nativas da região em associação com outras culturas, pode também se constituir em uma alternativa agrícola viável, desde que sejam respeitadas as características básicas das populações naturais.

A descoberta de alternativas agrícolas economicamente viáveis para a região Amazônica, principalmente com culturas perenes, reveste-se de um cunho social bastante elevado, se o modelo for adequado às características do homem regional. A alternativa deve atender às necessidades básicas do amazônida, além de representar uma solução para a ocupação do relativo vazio demográfico.

Outro aspecto a ser discutido como estratégia de melhoramento de espécies nativas da região, cuja forma de propagação comercial das plantas é via assexuada, refere-se a presença de endogamia nas populações naturais. Paiva (1992) encontrou elevado grau de endogamia em populações de seringueiras nativas do Estado do Acre, estimando-se índices que variaram de 16,4% a 24,8% (Tabela 4).

O fenômeno da depressão endogâmica em seringueira já foi estudado há bastante tempo (Sharp, 1940; 1951; Ross & Brookson, 1960). Tan & Subramanian (1976) mostraram que progênies autofecundadas são inferiores às progênies de cruzamento, em relação ao vigor e produção de borracha. Todavia, pouco ou quase nada se conhece da ocorrência de endogamia em populações naturais e o que isto representa para o equilíbrio biológico das espécies no ecossistema amazônico.

Há indicativos que clones primários de seringueira – clones originados da seleção de plantas matrizes com características favoráveis – conservam um certo grau de endogamia. Assim, é possível explicar o vigor heterótico manifestado pelas progênies, originadas de cruzamentos entre esses clones.

A autofecundação parece promover o desenvolvimento e a manutenção da adaptação dentro de populações e, ao mesmo tempo, facilitar o desenvolvimento da diferenciação espacial, por impedimento do fluxo gênico entre populações (Allard, 1988).

O grau de endogamia estimado para a seringueira em populações naturais, seja devido a autofecundação ou ao cruzamento entre plantas aparentadas, deve apresentar vantagens adaptativas. Uma possibilidade é de provocar homozigose de genes deletérios, que associada a seleção natural causaria a eliminação de plantas não adaptadas ao ambiente natural. Portanto, o cruzamento entre clones primários de origem diferentes, que são originados de plantas que passaram pelo crivo da seleção natural e artificial, podem expressar diferentes graus de vigor heterótico.

A confirmação dessa hipótese abre um outro campo para ser explorado pelo melhoramento genético, desde que fossem provocados cruzamentos entre clones aparentados, visando atingir níveis moderados de endogamia, seguido de seleção e cruzamentos entre plantas geneticamente distintas.

Mettler & Gregg (1973) relatam que a autofecundação é a forma mais intensa de endogamia. Todavia, a endogamia também ocorre em espécies bissexuais, quando os indivíduos que se acasalam têm uma relação de parentesco entre si. Neste caso, há também uma redução de heterozigotos, porém menos intensa do que a autofecundação. O coeficiente de endogamia não expressa apenas a endogamia média de todos os membros de uma população, numa dada geração, mas expressa também a probabilidade de um indivíduo ter alelos idênticos por descendência num dado loco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 382p.

ALLARD, R.W. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. **Journal of Heredity**, v.79, p.225-238, 1988.

ASTHON, P.S. Speciation among in the light of recent evidence. **Biological Journal Linnean Society**, v.1, p.155-196, 1969.

BAKER, H.G. Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. **Cold Spring Harbor Quantitative Biology**, v.24, p.177-191, 1959.

BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, p.85-92, 1974.

BAWA, K.S. Breeding of tropical hardwoods: an evolution of underlying bases, current status and future prospect. In: BURLEY, J.; STYLES, B.T. **Tropical trees**: variation, breeding and conservation. London: Academic Press, 1976. p.43-60.

BAWA, K.S.; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.R.; COVILLE, R.E.; GRAYUM, M.M. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees: 2. Pollination systems. **American Journal of Botany**, v.72, p.346-356, 1985.

BAWA, K.S.; OPLER, P.A. Dioecism in tropical trees. **Evolution**, v.29, p.167-179, 1975.

BOUVAREL, P. The conservation of gene resources of forest trees. In: FRANKEL, O.H. BENNETT, E. **Genetics in plants**: their exploration and conservation. New York: Blackwell Scientific Publications, 1970. p.523-529.

BROWN JR., K.S. O papel dos consumidores na conservação e no manejo de recursos genéticos florestais in situ. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, v.35, p.61-69, 1987.

BULLOCK, S.H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduos forest in México. **Biotropica**, v.17, p.287-301, 1985.

CLEMENT, C.R.; MULLER, C.H.; FLORES, W.B.C. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, v.12, p.677-695, 1982.

CORNER, E.J.H. The evolution of tropical forests. In: HUXLEY, J.; HARDY, A.C.; FORD. E.C. **Evolution as a process**. London: Allen & Unwin,1954. p.34-46.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **The principles of pollination ecology**. Oxford: Pergamon, 1976. p.291.

FAO. **Comission de recursos geneticos para la alimentacion y la agricultura**. Rome, 1996. (Documento Informativo de Estudios,5).

FEDOROV, A.A. The structure of the tropical rain forest and speciation in the humid tropics. **Journal Ecology**, v.54, p.1-11, 1966.

FRANKIE, G.W.; OPLER, P.A.; BAWA, K.S. Foraging behavior of solitary bees: implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. **Journal of Ecology**, v.64, p.1049-1057, 1976.

GENTRY, A.H. An overview of neotropical phytogeographic patterns with an emphasis on Amazonia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., Belém, 1984. **Anais**. Belém: EMBRAPA, CPATU, 1986. v.2, p.19-35. (Documentos, 36).

GOMEZ-POMPA, A.; VASQUEZ-YANES, C.; GUEVARA, S. The tropical rain forest: a nonrenewable resource. **Science**, v.177, p.762-765, 1972.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; THOMAS, W.L. **Genetic and conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cumnings, 1983. p.335-348.

HEYWOOD, V.H. (Ed.) **Global biodiversity assessment**. Cambridge: University Press, 1995. p.118.

HOWE, H.F. Fear and frugivory. **American Naturalist**, v.114, p.925-931, 1979.

JANZEN, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinations of tropical plants. **Science**, v.171, p.203-205, 1971.

KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: BAWA, K.S.; HADLEY, M. **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Paris: UNESCO, 1990. cap. 26, p.375-387.

KAGEYAMA, P.Y.; PATIÑO-VALERA, M. **Conservation y manejo de recursos geneticos forestales**: factores que influyen en la estructura y diversidade de los ecossitemas forestales. s.l.: s.ed., 1985. 24p. /Apresentado ao 9. Congresso Mundial, México, 1985/

KERR, W.E.; CLEMENT, C.R. Práticas de conseqüência genéticas que possibilitavam aos índios da Amazônia uma melhor adaptação, as condições da região. **Acta Amazônica**, v.10, p.252-261, 1980.

KERR, W.E.; CAMPOS, F.J.; BARROS, M.J.B. Notas sobre os recursos naturais da horticultura na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., Belém, 1984, **Temas multidisciplinares**. Belém: EMBRAPA, CPATU, 1986. p.451-56. (Documentos, 36).

KUBITZKI, K. The dispersal of forest plants. In: PRANCE, G.T.; LOVEJOY, T.E. **Amazonia**. Oxford: Pergamon, 1985. cap.10, p.192-206.

McNEEL, J.A; WACHTEL, P.S. **Soul of tiger**. New York: Doubleday, 1988.

METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Polígono; EDUSP, 1973. 262p.

MOONEY, P.R. The law of seed. **Development Dialogue**, v.1-2, p.1-172, 1983.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v.70, p.3321-3323, 1973.

ODUM, P.E. **Ecologia**. Brasília: Pioneira, 1975. 201p.

O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (Bertholletia excelsa Humb. and Bompl: Lecythidaceae): 2. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.929-932, 1988.

PAIVA, J.R. Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira Hevea brasiliensis (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. 145p. Tese, Doutorado.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.K.; VENCOVSKY, R. Outcrossing rates and inbreeding coefficients in rubber trees (Hevea brasiliensis (Willd ex Adr. de Juss.) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.1003-1011, 1993.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.K.; VENCOVSKY, R. Genetics of rubber trees (Hevea brasiliensis (Willd ex Adr. de Juss.) Müll. Arg. 2. Mating System. **Silvae Genetica**, v.43, p.372-375, 1994a.

PAIVA, J.R.; KAGEYAMA, P.K.; VENCOVSKY, R.; CONTEL, P.B. Genetics of rubber trees (Hevea brasiliensis (Willd ex Adr. de Juss.) Müll. Arg: 1. Genetic variation in natural populations. **Silvae Genetica**, v.43, p.306-311, 1994b.

PATERNIANI, E. **Contribuição do melhoramento genético no desenvolvimento da agricultura**. Recife: SUDENE, 1979. 11p.

PATERNIANI, E. Diversidade genética em plantas cultivadas. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: UNESP/FCAVJ, 1988. p.75-77.

PIANKA, E.R. **Evolutionary ecology**. New York: Harper & Row, 1983. 416p.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using "n" independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

ROSS, J.M.; BROOKSON, G.W. Progress of breeding investigations with Hevea brasiliensis: III. Further data on the crosses made in the years 1937-1941. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.9, p.158-72,1960.

SHARP, C.C.T. Progress of breeding investigations with Hevea brasiliensis: The Philmoor crosses 1928-1931series. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.10, p.34-66, 1940.

SHARP, C.C.T. Progress of breeding investigations with Hevea brasiliensis: 2. The crosses made in the years 1937-1941. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.13, p.73-99, 1951.

STEBBINS, G.L. **Processos de evolução orgânica**. Rio de Janeiro: Universidade de São Paulo, 1974. 225p.

TAN, H.; SUBRAMANIAN, S. A five-parent diallel cross analysis for certain characters of young Hevea seedlings. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, Kuala Lumpur, 1975. **Proceedings**. Kuala Lumpur: RRIM, 1976. v.2, p.13-26.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.17, p.11-42, 2000.

WILSON, E.O. **Biodiversity**. Washington: National Academy Press, 1995: The current state of biological diversity.

WILSON, E.O. **The diversity of life**. London: Penguin Books, 1992. 275p.



FUNDAÇÃO MT

Há 7 anos fazendo a diferença na qualidade e na produção agrícola em Mato Grosso e no Brasil.

A Fundação MT pesquisa e desenvolve tecnologias para a sustentabilidade do agronegócio.

O próximo desafio é tornar o Estado de Mato Grosso líder mundial em produção e produtividade de grãos e fibras.

Os trabalhos da FMT resultaram num rápido desenvolvimento regional através da difusão de tecnologias e informações que culminaram em novos pólos agrícolas e urbanos do Estado.

Estas transformações na paisagem do Cerrado são acompanhadas de muito respeito ao meio ambiente, aliando desenvolvimento econômico e social.

A Fundação MT quer continuar melhorando a vida das pessoas através do desenvolvimento contínuo de novas tecnologias aplicadas à agricultura.



FUNDAÇÃO MT

Melhorando a vida.

Fundação MT
R. Pernambuco, 1267 - Rondonópolis-MT
78705-040 - Cx. Postal: 79
E-mail: fundacaomt@fundacaomt.com.br
Home Page: www.fundacaomt.com.br

5

USO DE GERMOPLASMA EXÓTICO NO MELHORAMENTO

LUCIANO LOURENÇO NASS[1]
JOSÉ B. MIRANDA FILHO[2]
MANOEL XAVIER DOS SANTOS[3]

[1]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.
[2]Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.
[3]Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 65 - CEP: 35701-970 - Sete Lagoas, MG.

1. INTRODUÇÃO

A origem das plantas cultivadas tem sido objeto de investigação de inúmeros pesquisadores. Embora seja difícil até o presente momento definir a exata origem das espécies, existe um certo consenso sobre a provável localização geográfica inicial da maior parte das plantas de interesse econômico. As viagens exploratórias, na tentativa de descobrir novas fronteiras, tiveram papel relevante na dispersão das plantas cultivadas pelo planeta.

O Brasil figura entre os países com maior biodiversidade do mundo e, mesmo assim, é extremamente dependente de germoplasma de outros países. Desta forma, pode-se afirmar que nenhum país é auto-suficiente em termos de recursos genéticos vegetais, ou seja, todos os povos são dependentes em maior ou menor grau de germoplasma.

Na literatura é possível encontrar diferentes conotações para germoplasma exótico. A palavra exótico é de origem grega e apresenta diferentes significados, entre eles: procedente de país estranho, animal ou planta que não é natural do país onde vive, estrangeiro, esquisito, extravagante, não nativo, entre outros.

Para exemplificar o conceito de germoplasma exótico adotado nesse capítulo será utilizado o milho, que é, provavelmente, a espécie mais cosmopolita entre os vegetais, sendo cultivado desde 58°N até 40°S de latitude, desenvolvendo-se desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.800 m. Devido à importância econômica deste cereal e a facilidade que ele apresenta para estudos de genética, o milho é uma das espécies mais estudadas e que serve de modelo para as espécies de plantas alógamas.

Na opinião de Lonnquist (1974), milho exótico foi considerado como oriundo de outra área, estando representado por adaptações diferentes a altitudes, latitudes, tipos de solo, fatores ambientais etc. Por sua vez, Hallauer (1978) definiu germoplasma exótico como todas as fontes de germoplasma que não são imediatamente úteis ou adaptadas. Em uma extensão desse conceito, Hallauer & Miranda Filho (1988) consideraram que germoplasma exótico, para programas aplicados de melhoramento genético, envolve todo germoplasma que não tem utilidade imediata sem a seleção para uma determinada área. Assim, genótipos oriundos da região Amazônica ou do Rio Grande do Sul podem perfeitamente ser considerados exóticos para as condições ambientais do Estado de São Paulo (Santos, 1985; Nass, 1992; Santos & Miranda Filho, 1992; Nass & Miranda Filho, 1995). No caso de forrageiras em países com grande extensão territorial, observam-se situações curiosas, em que o germoplasma obtido a poucos quilômetros de linhas de fronteiras próximas às áreas experimentais é considerado exótico, enquanto amostras trazidas de centenas ou milhares de quilômetros de distância no mesmo país recebem o tratamento reservado às espécies nativas (Valls, 1990).

2. IMPORTÂNCIA DO INTERCÂMBIO

A movimentação espacial do homem e o intercâmbio de sementes e propágulos são práticas que remontam à era da domesticação de plantas. Migrantes, viajantes e exploradores sempre levaram e/ou trouxeram germoplasma que, de algum modo, contribuiu para ampliar a base da diversidade das espécies vegetais. No Brasil, raças antigas de milho foram preservadas durante séculos pelas tribos indígenas da Bacia Amazônica e, seguramente, as migrações e intercâmbios contribuíram para a miscigenação do germoplasma, ampliação da base genética e criação de oportunidades para o aparecimento de novas raças (Brieger *et al.*, 1958).

O exemplo clássico da contribuição de germoplasma exótico é o das variedades anãs e semi-anãs de trigo e arroz liberadas na década de 60, as quais tiveram grande impacto tanto nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos. As variedades anãs de trigo e arroz devem suas altas produtividades aos genes que as tornaram mais responsivas aos insumos como os fertilizantes químicos. Esses genes estão espalhados ao redor do mundo, sendo que foram inicialmente encontrados no Japão e China, respectivamente (Jain, 1993). A variedade Norin 10 (PI 156641), introduzida nos Estados Unidos da América em 1946 oriunda do Japão, foi fundamental para o melhoramento do trigo semi-anão no Noroeste do Pacífico e no México (Reitz, 1970). As variedades de trigo de porte reduzido são um exemplo marcante da produção de um complexo de germoplasma que inclui insensibilidade ao fotoperíodo, estatura reduzida pela introgressão de genes de Norin 10, ampla resistência a doenças e a capacidade de atingir altas produtividades com fertilização e irrigação adequadas (Creech & Reitz, 1971). Para o arroz, o primeiro grande sucesso foi obtido com a liberação da variedade IR 8, desenvolvida pelo Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI). Posteriormente, foram desenvolvidas outras variedades da série IR, na tentativa de corrigir algumas deficiências apresentada pela IR 8, sendo que em 1982, a IR 36 foi cultivada em 11 milhões de hectares, constituindo-se na variedade de arroz mais cultivada da história (Holden *et al.*, 1993).

O intercâmbio de germoplasma tem sido realizado, na maioria das vezes, livremente ao longo do tempo, garantindo no mínimo uma certa ampliação da base genética das culturas entre os países participantes desse processo. Caso os novos acessos permaneçam apenas conservados nos bancos de germoplasma, evidentemente não estarão cumprindo a finalidade básica do intercâmbio, que seria a de disponibilizar novos genótipos e/ou genes para outros ambientes específicos. Todavia, a maior barreira para utilização dos materiais introduzidos é função das diferenças entre as condições ambientais existentes no local de origem do acesso e o novo local onde o material será introduzido. Valls (1990) salientou que qualquer amostra quando é retirada de sua área específica de ocorrência na natureza e trazida para condições de cultivo em uma estação experimental, assume o caráter de introdução, não no sentido político-geográfico, mas no sentido utilitário. Desta forma, passa a ser apenas mais um acesso a testar, devendo receber a mesma avaliação dinâmica de outros acessos para exame do seu potencial de adaptação e produção nas condições locais.

Em uma divisão simplista do ambiente pode-se considerar dois tipos bem contrastantes: clima temperado e clima tropical. Paterniani (1990, 1993) identificou as principais diferenças entre esses tipos de ambientes, indicando que a transferência quase exata de técnicas e materiais empregados nos climas temperados têm sido responsável pelo insucesso de inúmeras tentativas de introdução de germoplasma em condições tropicais, especialmente no caso do milho. O autor ressaltou a importância da precipitação pluviométrica, a qual é bem definida em regiões de clima temperado se comparada aos ambientes de clima tropical. Isso determina uma estratégia distinta na avaliação de genótipos para os dois ambientes, sendo que em condições temperadas tem-se procurado utilizar maior número de locais, enquanto que para as condições tropicais, maior ênfase deve ser dada para época de semeadura. Tal estratégia tem por finalidade melhor representar a situação do agricultor, que nos ambientes tropicais, dispõe de uma ampla faixa de tempo para decidir o momento oportuno para efetuar a semeadura.

Na utilização de germoplasma exótico no melhoramento podem ser empregados cruzamentos tanto intra como interespecíficos, inclusive envolvendo gêneros distintos. Inúmeras tentativas têm sido realizadas em diferentes espécies ao longo do tempo, sendo que muitas foram frustradas devido a barreiras existentes quando utilizados métodos convencionais de hibridação. Com o advento das técnicas baseadas no DNA recombinante tais impedimentos estão sendo superados rapidamente, o que tem viabilizado as mais distintas alternativas até então não disponíveis. Se por um lado as modernas técnicas de biotecnologia têm favorecido a quebra de barreiras para os cruzamentos, por outro lado a tendência da lei de proteção de cultivares é dificultar a troca de germoplasma com elevado potencial de aproveitamento para os países em desenvolvimento, podendo trazer, como conseqüência, prejuízos significativos para a sociedade.

Harlan & de Wet (1971) sugeriram uma metodologia para classificar as plantas cultivadas para uso no melhoramento genético. Na oportunidade, os autores apresentaram o conceito de conjunto gênico (*gene pool*), sendo identificadas três categorias (Figura 1):

a) conjunto gênico primário (GP-1): este nível corresponde ao conceito tradicional de espécie biológica. Nesse conjunto gênico o cruzamento é fácil, produzindo híbridos férteis com adequado pareamento cromossômico, ou seja, a transferência de genes é geralmente simples. A espécie biológica inclui raças cultivadas e raças espontâneas, respectivamente, designadas de subespécies A e B.

b) conjunto gênico secundário (GP-2): inclui outras espécies biológicas que podem ser cruzadas com a espécie de interesse, produzindo níveis variáveis de fertilidade e esterilidade. A transferência de genes é possível porém com certa dificuldade, exigindo grande esforço por parte dos pesquisadores.

c) conjunto gênico terciário (GP-3): o cruzamento das espécies desse nível com a espécie de interesse (GP-1) resulta em progênies anômalas, com índice significativo de letalidade e/ou completa esterilidade. A transferência de genes não é possível com hibridações usuais, sendo necessárias outras técnicas na tentativa de se obter algum sucesso.

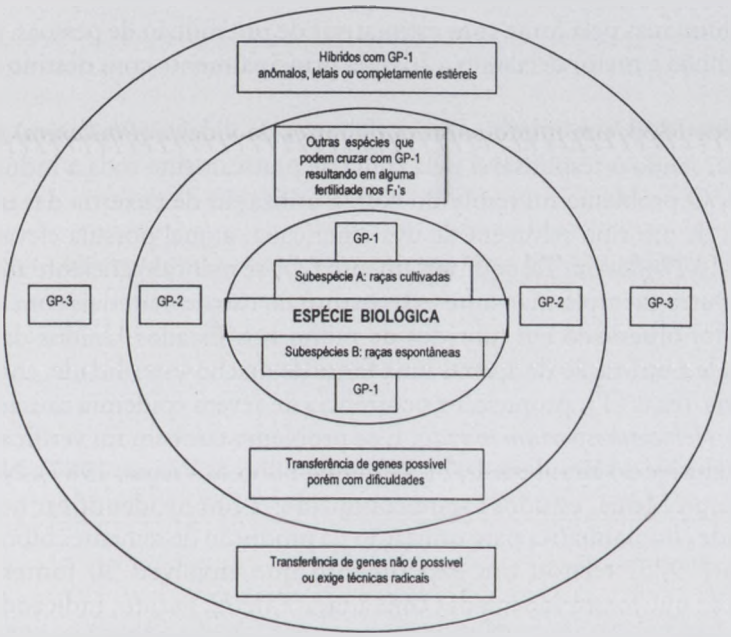


FIGURA 1. Esquema dos conjuntos gênicos primário (GP-1), secundário (GP-2) e terciário (GP-3) de acordo com Harlan & de Wet (1971).

3. VULNERABILIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA

O início da agricultura, há cerca de 10.000 anos atrás, com a domesticação das plantas pelo homem, é sem dúvida um dos acontecimentos de maior importância na história da vida na Terra. Aproximadamente 300.000 espécies de plantas foram descritas e o homem usou para sua alimentação cerca de 3.000. Hoje são usadas em torno de 300 espécies e destas apenas 15 representam 90% de toda a alimentação humana (Paterniani, 1988). As 15 espécies mais utilizadas são arroz, trigo, milho, sorgo, cevada, cana-de-açúcar, beterraba, batata, batata-doce, mandioca, feijão, soja, amendoim, coco e banana (Goodman, 1990). Com base nessas estimativas é de se esperar que a vulnerabilidade genética seja uma preocupação constante por parte dos pesquisadores. O esforço no estabelecimento de bancos de germoplasma não tem feito com que a agricultura mundial fique menos vulnerável à doenças e pragas. Apesar da conservação de uma vasta quantidade de variabilidade nos bancos de germoplasma, as culturas de importância econômica continuam se tornando cada vez mais uniformes (Jain, 1993). A existência dessa vulnerabilidade deve-se especialmente à utilização de genótipos uniformes em extensas áreas de cultivo, sendo vários os exemplos na literatura de problemas advindos dessa uniformidade genética.

Em meados do século XIX, na Irlanda, houve uma catástrofe envolvendo a utilização de clones de batata, os quais eram, quase na sua totalidade, suscetíveis ao fungo *Phytophthora infestans*. Este fungo foi acidentalmente introduzido na Europa a partir do México, possivelmente via Estados Unidos da América (Robinson, 1996). Além dos prejuízos causados aos agricultores da época, o maior agravante foi a perda

de vidas humanas pela fome com estimativas de um milhão de pessoas. Outras (cerca de um milhão e meio) deixaram a Irlanda principalmente com destino à América do Norte.

Em 1860, um inseto parasita de raízes da videira (*Phylloxera*) foi observado na França, sendo o responsável pela ruína de praticamente toda a indústria européia de vinho. O problema foi resolvido com a utilização de enxertia das uvas européias em raízes de um tipo selvagem de uva americana, a qual possuía elevada resistência horizontal à *Phylloxera*. Tal comportamento tem-se mantido eficiente até o momento.

Outro exemplo marcante e desastroso do uso de materiais com uniformidade genética foi observado em híbridos de milho nos Estados Unidos da América em 1970, onde a utilização de apenas uma fonte de macho-esterilidade, conhecida como citoplasma Texas (T), propiciou a ocorrência de severa epidemia causada pela raça T do fungo *Helminthosporium maydis*. Esse problema também foi verificado em outros países, inclusive no Brasil em 1971 (Miranda Filho & Viégas, 1987). Na tentativa de resolver o problema, estudos foram conduzidos a fim de identificar novas fontes de esterilidade citoplasmática para utilização na produção de sementes híbridas de milho. Cochran (1975) relatou um experimento que envolveu 30 fontes distintas de esterilidade que foram inoculadas com a raça T de *H. maydis*, indicando duas fontes (C e S) como resistentes. O tipo C, originário da raça brasileira Charrua, teve a preferência para utilização no programa de melhoramento de Illinois (EUA), pois conferiu estabilidade completa as linhagens, sendo menos variável em relação às alterações do ambiente. Miranda Filho & Viégas (1987) relacionaram outras fontes de citoplasma macho-estéril disponíveis para o milho.

Um caso interessante sobre a vulnerabilidade aconteceu com a seringueira (*Hevea* spp.) que ocorre naturalmente por toda a Bacia Amazônica, seu próprio centro de origem. Interessada na exploração comercial da borracha, a Fundação Ford estabeleceu grandes plantações de clones de seringueira em municípios do Estado do Pará. O plantio de *Hevea brasiliensis* em Fordlândia ocorreu em 1928. Posteriormente, em 1932 outro plantio foi efetuado em Belterra, com introdução de outras espécies como *H. benthamiana*, *H. guianensis*, *H. spruceana*, *H. pauciflora* e outras além de *H. brasiliensis* (Valois, A.C.C. – Comunicação Pessoal). O plantio de Fordlândia sofreu uma das grandes epidemias que se tem notícia no Reino Vegetal, pois os genótipos foram totalmente dizimados pelo fungo *Microcyclus ulei*, causador da doença conhecida como "mal-das-folhas". O fungo ocorre naturalmente na Amazônia em nível endêmico e não causa prejuízos sérios às plantas quando ocorrem dispersas na mata natural. Porém em plantações adensadas a concentração de esporos, aliada às condições ambientais propícias à doença, tornam a situação favorável à ocorrência de epidemia. Por outro lado, plantios adensados de seringueira foram viáveis em condições de escape, caracterizada por umidade baixa na época da troca de folhas, tendo sido este o motivo do sucesso da cultura no planalto paulista. A vulnerabilidade da seringueira em plantios conduzidos artificialmente na Amazônia, abre oportunidade de sucesso da cultura em ambientes estranhos em relação ao seu ambiente de melhor adaptação na condição natural. É possível que fatos como este tenham ocorrido em outras espécies, onde nem sempre o melhor ambiente de adaptação, para culturas conduzidas artificialmente, é o próprio local de origem.

Em 1970 foi formado um comitê sobre vulnerabilidade genética, designado pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América, com o objetivo de quantificar a situação daquele país. Os dados apontaram para a dependência de um número reduzido de cultivares, sendo que 6 cultivares de algodão ocupavam 68% da área plantada, 6 cultivares de soja 56%, 6 cultivares de trigo 41% e 6 linhagens de milho eram usadas nos híbridos que ocupavam 71% da área cultivada com milho nos Estados Unidos (National Academy of Sciences, 1972). A conclusão do comitê foi que a produção agrícola americana era de fato vulnerável geneticamente. Posteriormente, Duvick (1984) conduziu um levantamento sobre a situação das culturas de algodão, soja, milho, trigo e sorgo, nos Estados Unidos da América e concluiu que a base genética aumentou em relação ao levantamento de 1970, porém a produção americana ainda concentrava-se em poucas cultivares. As raças locais (*landraces*) foram consideradas, pela maioria, como a principal fonte para ampliar a base genética das cultivares. O autor ressaltou ainda que, para todas as culturas estudadas, os materiais elites adaptados foram as fontes mais utilizadas para resistência a pragas e doenças, assim como para outros estresses ambientais. O levantamento também identificou as principais críticas dos melhoristas em relação aos serviços oferecidos pelo sistema nacional americano de germoplasma: (a) as coleções não eram suficientemente grandes e as atividades de coleta não contavam com o suporte necessário; (b) os acessos mantidos pelo sistema estavam sendo perdidos devido ao suporte financeiro insuficiente para a adequada regeneração e conservação; (c) as coleções necessitavam ser melhor avaliadas com relação aos caracteres agronômicos de interesse para os melhoristas.

Uma avaliação da diversidade genética nas variedades utilizadas na América Latina foi realizada por Paterniani (1987), envolvendo 40 especialistas do Brasil e 14 de outros países. O autor utilizou uma escala subjetiva de diversidade genética (0 a 100), sendo o limite inferior representado por uma linhagem de espécie autógama e o superior representado por muitas variedades de polinização livre de espécie alógama. A porcentagem de retorno para o Brasil foi de 75%, enquanto para os demais países foi de 50%. Um resumo dos resultados desse levantamento pode ser verificado na Tabela 1. Segundo esse levantamento, para quase a totalidade das espécies existe variabilidade suficiente, provavelmente maior que a capacidade que os melhorista têm de explorá-la. Quanto à conservação da variabilidade em bancos de germoplasma, foi observado uma situação ótima para as espécies autógamas, enquanto que para as alógamas e de reprodução vegetativa prevalece uma situação de intermediária a deficiente. O autor enfatizou que provavelmente isso seja devido a grande dificuldade de manutenção adequada dessas culturas nos bancos de germoplasma. De maneira geral, os resultados obtidos no levantamento indicaram que na América Latina a situação com relação à variabilidade genética não é tão crítica.

Nass *et al.* (1993) realizaram um levantamento entre os melhoristas de milho e soja de instituições públicas e privadas do Brasil, a fim de quantificar o nível de utilização dos bancos de germoplasma e as principais fontes empregadas nos programas de melhoramento dessas culturas. Os resultados indicaram que o banco de germoplasma é mais utilizado pelos melhoristas de soja, provavelmente pelo maior nível de caracterização e avaliação dos acessos disponíveis. A qualidade das informações

foi considerada satisfatória para ambas as culturas, entretanto a quantidade de informações foi considerada insuficiente por 70% dos melhoristas de milho. Para o melhoramento da produtividade, as cultivares elites adaptadas são a principal fonte de germoplasma em ambas as culturas. Esses resultados evidenciam que os melhoristas encontram suficiente variabilidade genética nos materiais agronomicamente adaptados. As mesmas tendências foram observadas nos Estados Unidos da América (Duvick, 1984), na Europa (Peeters & Galwey, 1988) e no Brasil e outros países da América Latina (Paterniani, 1987).

Para o melhoramento visando à resistência a pragas, doenças e outros estresses, os melhoristas de milho utilizam principalmente sua própria coleção de trabalho, enquanto os de soja buscam essa variabilidade no intercâmbio de materiais (Tabela 2). Para ambas as culturas, os materiais elites adaptados são a fonte mais utilizada em programas de melhoramento para resistência, embora as linhagens experimentais tenham sido consideradas muito importantes pelos melhoristas de soja. Os autores também observaram uma utilização considerável das raças locais na busca de materiais resistentes. Duvick (1984) enfatizou a contribuição das raças locais no sentido de ampliar a base genética de cinco importantes culturas (algodão, milho, soja , sorgo e trigo) nos Estados Unidos da América.

TABELA 1. Variabilidade genética de espécies autógamas, alógamas e de reprodução vegetativa (assexual) na América Latina.

Cultura	Nível de variação genética existente	Conservação em bancos de germoplasma	Base genética das variedades cultivadas	Nível de diversidade
Autógamas				
Sorgo	Alta	Intermediária	Restrita	15
Trigo	Alta	Ótima	Restrita	15
Soja	Alta	Ótima	Restrita	15
Feijão	Alta	Ótima	Normal	25
Amendoim	Média	Intermediária	Restrita	15
Tomate	Alta	Ótima	Restrita	15
Alógamas				
Milho	Alta	Intermediária	Ampla	90
Milheto	Alta	Intermediária	Ampla	60
Forrageiras	Alta	Deficiente	Restrita	60
Girassol	Alta	Deficiente	Restrita	40
Brássicas	Média	Deficiente	Ampla	60
Cucurbitáceas	Alta	Intermediária	Normal	40
Reprodução Vegetativa				
Mandioca	Alta	Pouca	Restrita	15
Cana-de-açúcar	Alta	Boa	Normal	50
Batata	Alta	Boa	Restrita	15
Batata doce	Alta	Boa	Restrita	15
Citros	Alta	Intermediária	Restrita	15
Banana	Reduzida	Deficiente	Restrita	5

Fonte: Adaptada de Paterniani (1987)

TABELA 2. Principais fontes de germoplasma utilizadas no melhoramento para resistência a pragas (P), doenças (D) e outros estresses (E) em milho e soja no Brasil.

	MILHO (%)[δ]			SOJA (%)[δ]		
	P	D	E	P	D	E
Fontes para resistência						
Bancos de germoplasma	22	14	21	35	22	21
Coleção de trabalho	44	50	49	19	28	24
Troca de materiais entre melhoristas	32	36	30	46	47	52
Outras	2	0	0	0	3	3
Material no melhoramento para resistência						
Selvagem	5	2	2	14	8	29
Raças locais (landraces)	21	17	28	18	25	24
Linhagens experimentais	15	14	15	36	22	24
Cultivares avançadas / elites	59	67	55	32	45	43

[δ]Porcentagem de respondentes. Fonte: Nass *et al.* (1993)

4. PROPORÇÃO DE INTROGRESSÃO

Várias tentativas para determinar a porcentagem de germoplasma exótico a ser incorporado em populações adaptadas têm sido realizadas, porém, não há informações conclusivas sobre essa questão. Obviamente, tal informação depende tanto da espécie que se está trabalhando, quanto das condições ambientais onde se pretende introduzir genes exóticos.

Na realidade, a proporção (p) ideal de germoplasma exótico pode estar no intervalo $0 < p \leq 1$, dependendo da origem do germoplasma e do grau de adaptabilidade. Em síntese, estes parâmetros devem ser estabelecidos experimentalmente em cada caso, respeitando-se os limites toleráveis de decréscimo no valor genético como conseqüência da introgressão. A introgressão será efetivada como resultado de cruzamentos e retrocruzamentos de acordo com a proporção p desejada. Após o último retrocruzamento o material deverá ser intercruzado para fins de recombinação de genes e quebra dos blocos de ligação, o que deverá proporcionar oportunidade de expressão da variabilidade potencial. Esse processo é teoricamente assintótico e pode requerer diversas gerações de intercruzamento para atingir o grau de homogeneização desejável (Miranda Filho, 1996).

Para a incorporação de uma população exótica (V_E) em uma população local adaptada (V_0), considere-se inicialmente o cruzamento $V_E \times V_0$; após a recombinação do híbrido interpopulacional a população resultante será equivalente a um composto de tamanho k = 2, com 50% de genes de cada genitor. A média esperada deste composto é $C_2 = \overline{V} + \frac{1}{2} h$, sendo $\overline{V}$ a média dos pais e h a heterose em relação à média dos pais. Considere-se uma situação em que uma população exótica tem média igual a 50% da população adaptada e que não há heterose no cruzamento (h=0); mesmo em uma situação desfavorável como esta o composto resultante (C_2) terá média equivalente a 75% de V_0, proporção esta que poderá aumentar substancialmente com alguns ciclos de seleção recorrente. Em situação similar, mas com heterose (h) de 20%, resulta C_2 igual a 82,5% de V_0.

Assumindo,

p: a proporção de germoplasma exótico no composto C_2;
λ: média da população exótica em relação à adaptada ($\lambda = \bar{V}_E / \bar{V}_0$);
ω: quociente entre heterose e a média dos pais ($\omega = h/\bar{V}$);
φ: proproção da média do composto em relação à média da população adaptada;

a média do composto será expressa por:

$$\bar{C}_2 = [1 - p(1-\lambda) + p(1-p)\omega(1+\lambda)]\ \bar{V}_0 \text{, ou seja, } \bar{C}_2 = \varphi\ \bar{V}_0$$

Portanto, a porção entre colchetes representa a proporção (φ) da média do composto em relação à média da população adaptada. Exemplos de valores de φ para valores variáveis de p, ω e λ são apresentados na Tabela 3.

Uma população exótica pode apresentar baixa expressão de diversos caracteres quantitativos, inclusive produtividade, não exatamente por uma questão de adaptabilidade, mas possivelmente por problemas de depressão por endogamia. Assim sendo, uma forte heterose deve se expressar no cruzamento entre as populações exótica e adaptada. Contudo, esta heterose corresponde, em parte, a uma recuperação da depressão por endogamia. Miranda Filho (1999) mostrou que a heterose (h_0), no cruzamento de duas populações não endógamas, aumenta na mesma proporção da depressão causada por endogamia nos pais. Assim, chamando de h_F a heterose entre pais endógamos, com as respectivas depressões representadas por I_1 e I_2, tem-se $h_F = h_0 + \frac{1}{2}(I_1 + I_2) = h_0 + \bar{I}$, sendo $\bar{I}$ a depressão endogâmica média. Portanto, nem sempre a baixa expressão de caracteres na população deve ser interpretada de imediato como falta de adaptação. Este problema tende a desaparecer no primeiro cruzamento e em gerações avançadas quando ele advém de efeitos de endogamia; neste caso, a heterose tende a ser elevada, conforme mostrado acima. Quando o problema advém realmente de falta de adaptação, ele deve permanecer por diversas gerações, mas tende a dissipar-se em função da seleção tanto artificial como natural. Hallauer & Sears (1972) mostraram que a falta de adaptação na população ETO, introduzida no *Corn Belt* americano, foi dissipada gradativamente ao longo de seis ciclos de seleção fenotípica. Paterniani & Lonnquist (1963) constataram que a heterose em relação à média dos pais variou de –11% a 101% (média de 33%) em cruzamentos entre 12 raças tropicais de milho. Agrupando os genitores segundo o critério de alta (H) *vs.* baixa (L) produtividade, constataram heteroses de 19%, 31% e 46% nos

TABELA 3. Valores de $\varphi = [1 - p(1-\lambda) + p(1-p)\omega(1+\lambda)]$* para valores variáveis de p, ω e λ.

	0,5			0,7			0,9			← λ
p	10%	20%	30%	10%	20%	30%	10%	20%	30%	← ω
0,5	0,788	0,825	0,863	0,893	0,935	0,978	0,998	1,045	1,093	
0,6	0,736	0,772	0,808	0,861	0,902	0,942	0,986	1,031	1,077	
0,7	0,682	0,713	0,745	0,826	0,861	0,897	0,970	1,010	1,050	
0,8	0,624	0,648	0,672	0,787	0,814	0,842	0,950	0,981	1,011	
0,9	0,564	0,577	0,591	0,745	0,761	0,776	0,927	0,944	0,961	
1,0	0,500	0,500	0,500	0,700	0,700	0,700	0,900	0,900	0,900	

*Ver texto

cruzamentos H x H, H x L e L x L, respectivamente, dando suporte à hipótese de existência de alta homozigose na classe L, a qual também revelou baixa adaptação nas condições do estudo. Paterniani (1980) relatou sobre heterose em cruzamentos entre seis populações locais de milho. A heterose média foi de 18,8%, variando de 5,6% a 36,8%. O cruzamento mais heterótico foi Piracar x Cristal, sendo o primeiro um sintético de base genética estreita e o segundo um tipo de endosperma duro e de baixa produtividade proveniente do Paraguai. As evidências sugeriam que pelo menos um dos pais deveria exibir uma grande taxa de homozigose.

A seguir serão apresentados alguns estudos conduzidos para determinar a proporção de germoplasma exótico a ser incorporado nos materiais adaptados nas culturas de milho e soja.

Em milho, Griffing & Lindstrom (1954) relataram que os híbridos F_1 mais produtivos foram aqueles em que houve a participação de linhagens com 25% a 50% de exóticos em cruzamentos com linhagens adaptadas. Wellhausen (1965) recomendou incorporar proporções menores ou iguais a 25% de germoplasma exótico dentro de materiais adaptados do *Corn Belt* dos Estados Unidos da América. Hallauer (1978) conduziu quatro programas de seleção recorrente mostrando as taxas de progresso esperado e o comportamento da variabilidade genética em populações com diferentes proporções de germoplasma exótico. Os resultados de dois anos de ensaios de avaliação com progênies S_2, indicaram que a variância genética e o progresso esperado, foram maiores para as populações semi-exóticas que para a população adaptada, entretanto o aumento da variabilidade não foi muito encorajador. Crossa & Gardner (1987) não observaram diferenças significativas para produção de grãos entre as populações com 75% e 100% de germoplasma adaptado, sendo que ambas foram superiores as populações com 50% de germoplasma adaptado. Na avaliação de materiais com diferentes níveis de introgressão (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), Michelini & Hallauer (1993) constataram que os cruzamentos mais produtivos foram obtidos com 50% de germoplasma exótico. Os autores destacaram ainda o elevado potencial a ser explorado pelos programas de milho híbrido dos Estados Unidos do grupo heterótico exótico formado por Suwan-1 e Tuxpeño. A proporção adequada de germoplasma exótico a ser incorporada é dependente dos objetivos do melhoramento (curto ou longo prazo), como também do desempenho do germoplasma exótico e adaptado (Bridges & Gardner, 1987).

O uso de germoplasma exótico em híbridos americanos de milho triplicou nos últimos 12 anos, passando de 1% em 1984 a 3% em 1996. A maior parte deste aumento é devido ao uso de germoplasma exótico temperado, sendo que o uso de germoplasma exótico tropical é muito reduzido, com estimativas da ordem de 0,1% em 1984 e 0,3% em 1996. Este cenário pode mudar rapidamente nos próximos cinco anos, haja vista a iniciativa que vem sendo conduzida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (ARS/USDA), uma vez que o programa GEM (*Germplasm Enhancement of Maize*) tem identificado excelentes fontes de origem tropical em cruzamentos com linhagens de empresas privadas de sementes, tanto para aumento da produtividade quanto para características qualitativas (Pollak, L.M. – Comunicação Pessoal). Dentre os híbridos americanos mais vendidos que apresentam germoplasma exótico, a maioria contém uma porcentagem pequena de

germoplasma temperado (2% a 6%), representado principalmente pela introgressão de genes de resistência a insetos a partir de uma cultivar argentina denominada Maíz Amargo, introduzida via B68. Outros híbridos têm uma porcentagem maior de exóticos, entre 12% a 25%, geralmente relacionados com as linhagens F2 e F7 de origem francesa. Os híbridos americanos que contêm germoplasma tropical mostram o mesmo padrão, porém com nível menor de germoplasma exótico; os híbridos mais vendidos com germoplasma tropical geralmente contêm de 1% a 5% de introgressão, entretanto existem outros híbridos, menos populares, que apresentam entre 25% a 50% de germoplasma tropical (Goodman, 1999).

No Brasil, a introdução de germoplasma exótico tem sido bastante utilizada para ampliar a variabilidade genética na cultura do milho (Moro *et al.*, 1981; Lima *et al.*, 1982; Miranda Filho & Vencovsky, 1984; Magnavaca *et al.*, 1989; Miranda Filho, 1992; Nishikawa *et al.*, 1997; Regitano Neto *et al.*, 1997; Nass *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2000). O potencial genético de raças brasileiras de milho, para fins de melhoramento, também tem merecido a atenção de diversos pesquisadores. Dentre as raças brasileiras estudadas por Brieger *et al.* (1958) e Paterniani & Goodman (1977) mereceram destaque a Cravo e a Entrelaçado, por apresentarem, respectivamente, grande número de fileiras por espiga e acentuado comprimento de espiga. A raça Cravo é originária do Rio Grande do Sul, enquanto a raça Entrelaçado é cultivada por índios da região Amazônica. Santos (1985) iniciou um estudo dessas raças em cruzamento com a variedade de polinização livre ESALQ-PB1, adaptada às condições ambientais do Estado de São Paulo, o qual evidenciou ampla variabilidade genética nas populações semi-exóticas (50%) para vários caracteres de interesse. O potencial dessas populações semi-exóticas para fins de melhoramento foi demonstrado por Santos *et al.* (1990) para arquitetura da planta, Santos & Miranda Filho (1992) e Nass (1992) para produção de grãos e Nass & Miranda Filho (1995) na avaliação da depressão por endogamia.

Trabalhando com duas variedades adaptadas e seis populações exóticas de clima tropical e de diferentes origens, Santos *et al.* (2000) procuraram estudar a proporção de genes exóticos que deve ser incorporada em populações adaptadas de origem tropical. Os resultados obtidos mostraram que para produção, acamamento, quebramento do colmo e espigas doentes, a melhor proporção de genes exóticos a ser incorporada variou de 6,25% a 12,5%. Esta tendência, entretanto, não foi observada para os caracteres altura da planta e altura da espiga.

Em soja, os melhoristas americanos têm utilizado as PI's (*Plant Introduction*), denominação dos acessos mantidos pelo sistema de conservação dos Estados Unidos da América, na tentativa de ampliar a variabilidade genética das suas cultivares. Embora as PI's contribuam com genes úteis que não estão disponíveis nas cultivares adaptadas, geralmente elas atuam no sentido de reduzir a produtividade (Vello *et al.*, 1984). Todavia, Thorne & Fehr (1970) relataram que a utilização das PI's no melhoramento de populações de soja aumentou a variabilidade para produção de grãos. Schoener & Fehr (1979) desenvolveram populações com diferentes proporções de introgressão (100%, 75%, 50%, 25% e 0%) de parentais PI's. Os autores observaram produtividade média e variabilidade genética suficiente na população com 50% de introgressão.

Kenworthy (1980) enfatizou que o uso de germoplasma exótico em programas de melhoramento amplia a base genética do germoplasma para seleção e disponibiliza maior variabilidade na descendência como resultado da hibridação. Além disso, a curto prazo, a incorporação de 25% de germoplasma exótico pode contribuir para o desenvolvimento de linhagens mais produtivas e, a longo prazo, manter a variabilidade genética para ciclos subseqüentes de seleção. Populações de soja com diferentes proporções de PI's também foram estudadas por Vello *et al.* (1984): AP10 (100%), AP11 (75%), AP12 (50%), AP13 (25%) e AP14 (0% de exóticos). As quatro populações com algum nível de introgressão apresentaram maior variabilidade genética e menor produtividade média que a população adaptada (AP14). Os autores ressaltaram a importância do uso de elevado número de PI's no desenvolvimento de populações para programas de longo prazo e concluíram que 25% de germoplasma exótico deve permitir uma combinação adequada entre produtividade e variabilidade. Na continuidade desse trabalho, Ininda *et al.* (1996) reportaram os ganhos com seleção para produção de grãos após três ciclos de seleção recorrente. Os ganhos observados foram 5,4%, 2,8%, 3,1%, 2,0% e 2,5%, para as populações AP14, AP13, AP12, AP11 e AP10, respectivamente. Os resultados indicaram que, após três ciclos de seleção recorrente, as PI's usadas na composição das populações AP10 até AP13 não aumentaram o ganho genético para produção de grãos quando comparadas com AP14, que foi desenvolvida a partir de cultivares e linhagens experimentais adaptadas.

No Brasil, Zimback (1992) avaliou as gerações F_2 obtidas por cruzamentos em cadeia entre genótipos adaptados e exóticos de soja. Foram observadas diferenças entre as médias das cadeias de cruzamentos, sendo que a cadeia formada por 50% de materiais exóticos foi superior apenas para o caráter peso de 100 sementes, similar para porcentagem de óleo e inferior para a maioria das características estudadas em relação à cadeia com 100% de materiais adaptados. Montaño-Velasco (1994) na análise genética das progênies $F_{2:3}$ verificou que a variabilidade observada diferiu entre as cadeias de cruzamentos, sendo ligeiramente superior na cadeia de cruzamentos de linhagens exóticas com adaptadas, apenas para os caracteres peso de 100 sementes e porcentagem de óleo, enquanto para os demais caracteres avaliados, incluindo produção de grãos e produção de óleo, a variabilidade foi maior na cadeia adaptada.

5. ALTERNATIVAS DE INTROGRESSÃO

Dentre os fatores que influenciam nos resultados de um programa de melhoramento, a escolha do germoplasma é o que pode ser alterado com maior facilidade e com menor custo, sendo talvez o fator de maior importância para o sucesso do programa (Goodman, 1985).

Várias são as alternativas para incorporar novas características nos materiais adaptados, sendo que a escolha da metodologia a ser empregada depende da natureza genética do caráter, número de genes envolvidos, herdabilidade e das interações com o ambiente. Segundo Hallauer (1978) a seleção recorrente é considerada o método mais indicado para adaptação de germoplasma exótico, sendo que inicialmente a seleção massal pode ser satisfatória para caracteres com alta herdabilidade e, posteriormente, métodos mais elaborados e que exploram melhor a variância genética devem ser empregados.

Simmonds (1993) propôs uma distinção entre os termos introgressão e incorporação para as atividades que visam a ampliação da base genética. Segundo o autor, denomina-se de introgressão aqueles programas que têm por objetivo a transferência de um único gene ou um complexo de genes para um germoplasma elite adaptado. Isso tem sido usual na transferência de genes maiores de resistência a doenças e em alguns casos de tolerância a estresses. Por outro lado, denomina-se de incorporação aqueles programas que visam ao desenvolvimento de populações base para o melhoramento, como por exemplo a síntese de novos compostos de ampla base genética. Todavia, a distinção entre esses dois termos não parece ser necessária, uma vez que nos programas de pré-melhoramento (*pre-breeding*) ambas as estratégias têm sido usadas, sendo portanto, complementares. Desta forma, ambos os termos indicam ampliação ou enriquecimento da base genética para futuros programas de melhoramento, independentemente do período de tempo. Os programas de pré-melhoramento têm sido considerados como o mecanismo mais eficiente para aumentar a utilização tanto de germoplasma exótico quanto dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma (Smith & Duvick, 1989; Cooper *et al.*, 1998; Nass, 1999; Nass & Paterniani, 2000).

O método do retrocruzamento é uma alternativa eficiente para a transferência de caracteres de herança simples e na adaptação de germoplasma exótico. O primeiro retrocruzamento para o germoplasma adaptado foi considerado por Eberhart (1971) como a melhor população base para a prática de seleção. Estudos através de simulação em computadores demonstraram que, com o aumento do nível de dominância e com a utilização de parentais mais contrastantes, é recomendável lançar mão de gerações adicionais de retrocruzamentos antes de iniciar a seleção (Dudley, 1982). Quando o germoplasma exótico não é adaptado para um determinado local, um ou dois retrocruzamentos para o material adaptado são necessários. Entretanto, quando a população exótica tiver sido previamente selecionada para adaptabilidade, podem ser obtidos efeitos positivos imediatos (Crossa *et al.*, 1987; Mungoma & Pollak, 1988).

Crossa (1989) baseado na probabilidade de fixação de alelos verificou que se a população exótica tiver sido selecionada para adaptabilidade e possuir alelos favoráveis em alta freqüência, a população de cruzamento pode ser utilizada diretamente como população base no processo de seleção. Caso o retrocruzamento para o parental adaptado seja utilizado, então um aumento no tamanho da população é necessário para conservar os alelos favoráveis previamente incorporados.

Outra alternativa para utilização de germoplasma exótico é a síntese de novas populações e sua posterior introdução em programas de melhoramento. Esta é uma das principais contribuições do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) para os programas de melhoramento de milho tropicais e temperados. O CIMMYT tem desenvolvido compostos (*pools*) com base no ciclo vegetativo dos materiais, zoneamento climático, coloração e endosperma dos grãos (Salhuana, 1987).

6. TIPOS DE INTRODUÇÃO

O aproveitamento das características úteis para o melhoramento presentes no germoplasma exótico pode ser conseguido de diferentes maneiras. Neste termos, exótico não significa necessariamente germoplasma de outro país, mas qualquer

material que apresenta adaptação a condições diferenciadas em relação ao ambiente onde está sendo introduzido. De acordo com Miranda Filho (1996) introdução de germoplasma refere-se a uma designação generalizada que envolve a introdução de quaisquer materiais genéticos.

Quando se trata de introdução, há uma preocupação quanto ao problema de amostragem e/ou de tamanho efetivo populacional. Esta preocupação não existe quando se trata de linhagens homozigóticas e clones, pois uma única semente ou um propágulo pode representar o genótipo. No caso de populações, o problema de amostragem só é preocupante quando se tem interesse em preservar as propriedades genéticas da população de referência, entretanto para o melhoramento, raramente este é o caso. Na maioria das vezes o material introduzido entra em um esquema de cruzamentos e retrocruzamentos para fins de introgressão e um tamanho de amostra reduzido pode ser suficiente para atender as necessidades do melhorista (Miranda Filho, 1996). Deve-se ressaltar que, em se tratando de introdução para fins de conservação dos recursos genéticos, o rigor e a atenção em relação aos critérios de amostragem assumem papéis extremamente importantes (Vencovsky, 1986; Vilela-Morales *et al.*, 1997).

A seguir serão identificados os possíveis tipos de introdução, os quais podem auxiliar na ampliação da variabilidade genética disponível para os melhoristas.

6.1 INTRODUÇÃO DE ESPÉCIE

A introdução de uma espécie é sem dúvida uma das formas mais eficientes de ampliar a variabilidade genética de um país. Uma vez que cada espécie deve ter se originado em locais específicos no mundo, fica evidente que praticamente todos os países do mundo já se beneficiaram e continuam se beneficiando desse tipo de atividade. Geralmente a decisão de introduzir uma nova espécie é respaldada pela semelhança entre o ambiente onde a espécie existe naturalmente e o novo ambiente no qual se deseja a sua introdução. Esse tipo de atividade é tão importante que muitos pesquisadores a consideram como um método de melhoramento de plantas.

Desde a época do descobrimento da América, tem-se observado inúmeros exemplos de intercâmbio e introdução de espécies, com resultados benéficos para inúmeros países. Cite-se, por exemplo, o milho (*Zea mays* L.), originário da América Central, que se espalhou rapidamente na era pós-Colombo e hoje é cultivado praticamente em todas as áreas agrícolas do mundo (Hallauer & Miranda Filho, 1995). Outras espécies importantes da América que se espalharam pelo mundo foram o tomate (*Lycopersicon esculentum*), a batata (*Solanum tuberosum*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) e o algodão (*Gossypium* spp.), entre outros inúmeros exemplos. Em contraposição, muitas espécies do Velho Mundo fora introduzidas nas Américas, trazendo inúmeros benefícios e inclusive alterando o hábito de alimentação dos povos. Dentre as espécies introduzidas, destacam-se o trigo (*Triticum* spp.), o arroz (*Oryza sativa*), as frutas cítricas (*Citrus* spp.) e o café (*Coffea arabica* e outras espécies). A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) no Brasil foi introduzida logo após o descobrimento, mas outras espécies afins (*S. robustum*, *S. spontaneum* etc.) foram introduzidas posteriormente como fontes de resistência a diversas doenças da espécie.

Outro exemplo do sucesso na introdução de uma espécie foi o caso da soja no Brasil. Essa introdução foi realizada na Bahia em fins do século XIX, entretanto essa espécie foi melhor explorada comercialmente somente a partir de 1970, sendo muito cultivada entre as latitudes 22° a 30° S, uma vez que as cultivares e as linhagens introduzidas do sul dos Estados Unidos da América desenvolviam-se satisfatoriamente nessa faixa de latitude. A maioria das cultivares de soja é sensível às variações do fotoperíodo. Nos ambientes tropicais o fotoperíodo curto provoca, na maior parte do germoplasma de soja, uma floração e maturação muito rápidas não permitindo um crescimento adequado e, conseqüentemente, proporcionando uma produção irrelevante (Toledo *et al.*, 1994). O caráter período juvenil longo tem sido utilizado eficientemente para atrasar o florescimento sob condições de dias curtos, permitindo que os materiais adquiram porte adequado para viabilizar a colheita mecânica. O desenvolvimento de cultivares com essa característica permitiu o cultivo de soja em regiões de baixa latitude e certamente constitui-se em uma expressiva contribuição do melhoramento genético para a agricultura nacional.

6.2 INTRODUÇÃO DE CULTIVAR

Neste caso, geralmente, o objetivo é a utilização direta de uma cultivar no sistema produtivo. Entretanto, também existe a possibilidade dela ser utilizada como genitor em cruzamentos com materiais adaptados. Tratando-se de variedades, há que se tomar cuidado com a representatividade genética da amostra introduzida, a fim de que os efeitos da deriva genética sejam minimizados. No caso de híbridos, pode-se introduzir diretamente a semente híbrida ou seus genitores homozigóticos.

Existem inúmeros casos de introdução direta de cultivares tanto por instituições públicas como privadas. No caso de empresas privadas, em milho, a maioria das introduções é usada de forma direta na composição de híbridos ou como fontes para a melhoria de determinada característica de interesse nos programas de obtenção de híbridos. Por sua vez, nas instituições públicas, após a identificação dos materiais introduzidos com potencial para melhoramento, os mesmos são incorporados aos programas passando a se constituir parte da coleção ativa de germoplasma. Um exemplo importante é caso da população de milho Suwan 1, que foi introduzida e, posteriormente, lançada como BR-105. Esta variedade foi originada de 36 introduções provenientes das ilhas Caribe, América do Sul, Índia, México, América Central, de germoplasma Tuxpeño e Caribe dos Estados Unidos. Após quatro recombinações, feitas na Tailândia, iniciou-se o processo de seleção para *downy mildew* (*Peronosclerospora sorghi*). Denominado de Thai Composite - C1, em 1971 foi cruzado com duas variedades resistentes ao *downy mildew* e retrocruzado três vezes com ciclos mais avançados de seleção do Thai Composite. Após forte pressão de seleção exercida pela doença, foi liberado em 1974 e passou a ser denominado de Suwan 1. Com sua introdução no Brasil, foram iniciados os trabalhos de melhoramento pela Embrapa Milho e Sorgo. Até o ano de 1985 havia passado por cinco ciclos de seleção recorrente com irmãos germanos, sendo que a partir desta data, iniciou-se um programa de seleção recorrente recíproca com a variedade BR-106. Este programa tem continuidade até hoje. A variedade BR 105 foi distribuída para diversas empresas privadas de sementes, que passaram a utilizá-la como fonte para extração de linhagens de excelente capacidade combinatória.



Colhedoras e Semeadoras para parcelas experimentais

Seu parceiro em equipamentos no melhoramento de plantas e pesquisa no Brasil.

O FOCO DE NOSSAS ATIVIDADES: MELHORAMENTO DE PLANTAS E PESQUISA AGRÍCOLA

Nossos **equipamentos** são importantes no trabalho de pesquisa na agricultura.

Os equipamentos utilizados para este propósito são específicos para pesquisa, e utilizam componentes especiais e detalhes que diferem dos utilizados na agricultura comercial.

A tecnologia moderna de nossas máquinas, torna o trabalho dos pesquisadores muito mais rápido e eficiente.

Consulte nosso representante mais próximo.

HEGE Maschinen

SEEDMECH do Brasil

WINTERSTEIGER

SEEDMECH DO BRASIL, estabeleceu-se em setembro de 2001. Centro de distribuição no Brasil, para prover peças de reposição,

Germek (1992) destacou que as cultivares de algodão norte-americanas, como *Express*, *Texas Bigball*, *Stoneville*, *Alburn*, *Acala*, *Delfos* e *Delta Pineland*, inicialmente foram utilizadas diretamente e, posteriormente, tiveram grande influência no desenvolvimento de novas cultivares no Brasil.

Vieira *et al.* (1999) relataram sobre o programa de melhoramento genético do feijoeiro da Universidade Federal de Viçosa iniciado em 1955. Os acessos introduzidos eram colocados em ensaios comparativos de produtividade, onde foi possível identificar a cultivar Rico 23, um feijão preto introduzido da Costa Rica e lançado em 1959, chegando a ser recomendado para sete Estados: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Goiás.

Inúmeros exemplos podem ser citados, os quais reforçam a importância e o interesse na introdução de cultivares, uma vez que muitos dos acessos introduzidos podem ser utilizados como fonte direta em programas de melhoramento ou apenas como fonte para incorporação de genes específicos.

6.3 INTRODUÇÃO DE CITOPLASMA

A introdução de um determinado tipo de citoplasma pode ter interesse em programas de desenvolvimento de híbridos, através da exploração de fontes para macho-esterilidade, ou quando existe herança materna envolvida no controle genético da característica que se deseja melhorar.

Um citoplasma específico de milho (citoplasma T ou Texas, dos Estados Unidos), que confere macho-esterilidade, foi introduzido no Brasil quando iniciou-se a produção de semente híbrida com fêmeas macho-estéreis, que dispensavam a operação de emasculação ou despendoamento, contribuindo para reduzir o custo de produção de sementes. Quando ocorreu a epidemia de *Helminthosporium maydis,* nos Estados Unidos em 1970 e no Brasil em 1971, aboliu-se o uso do citoplasma-T (Miranda Filho & Viégas, 1987). Posteriormente descobriu-se, no Brasil, uma fonte alternativa de citoplasma estéril (citoplasma C ou Charrua), não suscetível a *H. maydis*, que foi então exportada para os Estados Unidos para novas pesquisas sobre o uso da macho-esterilidade.

6.4 INTRODUÇÃO DE GENES

Nesta situação o interesse é centrado na introdução de um ou mais genes específicos. Por meios convencionais é obvio que não se consegue introduzir apenas o gene de interesse, entretanto, as técnicas que utilizam o DNA recombinante têm permitido tal procedimento. Deve-se, aqui, enfatizar o interesse pelo(s) gene(s), sendo que o veículo de introdução pode ser representado por qualquer material (linhagens, variedades etc.). Após a introdução, seguem-se cruzamentos e retrocruzamentos para a introgressão do gene desejado no material adaptado.

Como exemplos de introdução de genes pode ser citado o gene opaco-2 (o_2), que na condição homozigota recessiva confere elevado teor de lisina e triptofano no milho; situação similar ocorreram com os genes recessivos su_2 (*sugary*) e sh_1 (*shrunken*) que são utilizados para produção comercial de milho doce. O gene *Ht* (dominante) confere resistência a *Exserohilum turcicum* e foi introduzido no Brasil para fins de incorporação nos híbridos comerciais. Inúmeros outros exemplos são disponíveis para ilustrar a importância da introdução de genes específicos.

7. FORMAS DE UTILIZAÇÃO DE EXÓTICOS

Diante das diferentes possibilidades de introdução descritas no item anterior, inúmeras alternativas são possíveis para a seqüência dos trabalhos tanto de pré-melhoramento quanto dos programas de melhoramento. A seguir são apontadas as diferentes possibilidades de utilização dos materiais exóticos introduzidos.

7.1 USO DIRETO NA PRODUÇÃO

Refere-se ao aproveitamento de qualquer tipo de material genético diretamente no sistema produtivo. Aqui, podem ser incluídos os diversos tipos de cultivares (variedades ou híbridos), como já exemplificados no item 6.2. Além disso, híbridos de dendê e de coqueiro foram introduzidos da Costa do Marfim para uso direto em cultivos comerciais na região Nordeste do Brasil. Nas espécies de reprodução vegetativa, a introdução de clones para uso direto também tem ocorrido, como é o caso de clones de seringueira de alta produtividade, introduzidos da Malásia para utilização direta nas regiões de não ocorrência do fungo *Microcyclus ulei*.

7.2 USO DIRETO EM CRUZAMENTOS PARA PRODUÇÃO

Empresas de produção de sementes híbridas de milho têm feito introduções de linhagens elite que entram diretamente, sem qualquer modificação genética para adaptação ou quaisquer outras características, em cruzamento para produção comercial de híbridos. Estas linhagens são preservadas como tais e o seu valor genético só é explorado na condição híbrida. Germek (1992) relatou que nas introduções de videiras efetuadas pelo Instituto Agronômico de Campinas, predominaram as procedentes dos Estados Unidos, as quais contribuíram por meio de hibridações para a obtenção de diversas cultivares.

7.3 USO DIRETO EM PROGRAMAS DE PESQUISA

Em grande parte dos casos, o material introduzido (variedades ou populações, híbridos, linhagens, clones etc.) é utilizado diretamente em programas de pesquisa, sem qualquer informação anterior. Neste caso o material exótico pode seguir por três caminhos: (a) Utilização direta em cruzamento com material adaptado, seguida de retrocruzamentos para estabelecer uma proporção adequada de germoplasma exótico a ser incorporado; (b) Utilização direta em cruzamento com material adaptado, seguida de recombinação para fins de geração de compostos de ampla base genética. O composto ESALQ-PB1 de milho, foi sintetizado a partir de intercruzamentos entre variedades locais e exóticas, visando à redução do porte da planta (Miranda Filho, 1974); (c) Seleção recorrente diretamente na população introduzida, uma vez comprovada a existência de variabilidade genética. A população de milho Suwan-1, já mencionada neste capítulo, foi utilizada diretamente como especificado no item 6.2., mas em seguida submetida a vários ciclos de seleção recorrente intrapopulacional e interpopulacional (recíproca), em par com a população BR-106 (Santos *et al.*, 2000). A seleção recorrente fenotípica ou seleção massal pode ser utilizada para melhorar o grau de adaptação da população introduzida. Hallauer & Sears (1972) relataram sobre seis ciclos de seleção para adaptação às condições de clima temperado dos Estados Unidos, na população ETO da Colômbia, tipicamente de clima tropical, obtendo resultados surpreendentes.

7.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MATERIAL EXÓTICO *PER SE*

Quando não se conhece ou se tem pouca informação sobre as características do germoplasma exótico, é aconselhável realizar uma avaliação preliminar para esse fim. Miranda Filho (1992) avaliou 13 características quantitativas de 15 populações de milho oriundas de germoplasma temperado e cruzamentos temperado x tropical. Com base nos resultados, o autor agrupou as populações em dois conjuntos (I e II), cruzando-os com a população local ESALQ-PB1; deste programa surgiram quatro compostos: CEX-01 e CEX-02, resultantes de cruzamento de ESALQ-PB1 com os conjuntos I e II, respectivamente; e CEX-03 e CEX-04, resultantes de intercruzamentos dentro dos conjuntos I e II, respectivamente. Regitano Neto *et al.* (1997) avaliaram dez caracteres em um outro conjunto de 20 populações exóticas de origem similar às estudadas por Miranda Filho (1992); neste trabalho, deixaram indicações confiáveis sobre o possível uso das populações exóticas visando à alteração de caracteres específicos, principalmente os relacionados com a arquitetura da planta de milho.

A avaliação de populações *per se* pode incluir a estimação de parâmetros relacionados com a variabilidade. Lima *et al.* (1982) utilizaram progênies de meios irmãos e de autofecundação (S_1) para estimar a variância aditiva e o coeficiente de herdabilidade nas populações Suwan-DMR e Thai-DMR, e concluíram que a variabilidade genética em ambas as populações era de magnitude suficiente para garantir progressos em programas de seleção recorrente; de fato, dois ciclos de seleção recorrente fizeram aumentar a produtividade em 7,3% e 19,9% , respectivamente. O estudo de Lima *et al.* (1982) incluiu a estimação da depressão por endogamia em três caracteres, sendo que para produção de grãos a depressão foi de 43,0% em ambas as populações. A determinação da depressão por endogamia, como expressão da carga genética da população em estudo, pode constituir-se em informação de real valor, principalmente quando se tem em mente utilizá-la como fonte de linhagens endogâmicas para utilização em híbridos.

7.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MATERIAL EXÓTICO EM CRUZAMENTO

Em alguns casos há o interesse direto na exploração da heterose em cruzamentos envolvendo o material exótico. A heterose pode ser explorada totalmente na geração F_1 de um cruzamento (Exótico x Local ou Exótico x Exótico) ou parcialmente em gerações avançadas (compostos) envolvendo duas ou mais populações. Paterniani (1980) identificou o híbrido Piracicaba x Cristal como sendo o mais heterótico (36,8%) entre uma série de cruzamentos. Regitano Neto (1998) relatou sobre estimativas de heterose em 30 cruzamentos entre populações exóticas e as populações locais BR-105 e BR-106, com possibilidade de utilização direta da heterose em alguns cruzamentos, como por exemplo (Cuba 173 x B73) x BR-105, que exibiu heterose de 32% em relação à média dos pais. Dentre as populações e ambientes estudados foram observadas variações de heterose entre 0% a 68% para produção, evidenciando a variabilidade entre as populações exóticas e o potencial desses materiais para a exploração da heterose.

O esquema dialélico de cruzamentos para a avaliação dos padrões heteróticos entre populações tem sido amplamente utilizado. Do cruzamento dialélico entre sete

populações (locais e exóticas) de porte reduzido, foi eliminada uma população sendo as demais agrupadas em dois compostos (ESALQ-PB2 e ESALQ-PB3) de tamanho k=3, de modo a explorar o máximo da heterose no híbrido ESALQ-PB2 x ESALQ-PB3 (Miranda Filho, 1974; Sampaio & Miranda Filho, 1988).

Há outros casos em que o interesse é identificar os materiais mais promissores como fontes futuras para programas de melhoramento de forma direta ou aumentar a proporção de genes de germoplasma adaptado. Um exemplo a ser mencionado é o acordo entre a Embrapa Milho e Sorgo e o programa GEM do Departamento de Agricultura dos EUA. Germoplasma de diferentes origens e com proporções de 50% e 75% de genes tropicais foram introduzidos no Brasil com o objetivo de identificar fontes com adaptação subtropical e tropical, tanto para produtividade quanto para características qualitativas (proteína, óleo etc.).

Neste capítulo, procurou-se enfatizar que diferentes estratégias podem ser usadas para um eficiente aproveitamento dos materiais exóticos, de tal forma que a maximização dos conhecimentos relacionados aos recursos genéticos disponíveis possa ser útil aos programas nacionais de melhoramento e, em última análise, trazer benefícios aos produtores e a sociedade em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIDGES, W.C.; GARDNER, C.O. Foundation populations for adapted by exotic crosses. **Crop Science**, v.27, p.501-506, 1987.

BRIEGER, F.G.; GURGEL, J.T.A.; PATERNIANI, E.; BLUMENSCHEIN, A.; ALLEONI, M.R. **Races of maize in Brazil and other Eastern South America countries**. Washington: NAS-NRC, 1958. (Publication, 593)

COCHRAN, D.E. Progress of cytoplasmatic and genetic sterility in hybrid seed corn production. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 30., Chicago, 1975. **Proceedings**. Washington: American Seed Trade Association, 1975. p.116-130.

COOPER, H.D.; SPILLANE, C.; KERMALI, I.; ANISHETTY, N.M. Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.114, p.1-8, 1998.

CREECH, J.L.; REITZ, L.P. Plant germ plasm now and for tomorrow. **Advances in Agronomy**, v.23, p.1-49, 1971.

CROSSA, J. Theoretical considerations for the introgression of exotic germplasm into adapted maize populations. **Maydica**, v.34, p.53-62, 1989.

CROSSA, J.; GARDNER, C.O. Introgression of an exotic germplasm for improving an adapted maize population. **Crop Science**, v.27, p.187-190, 1987.

CROSSA, J.; GARDNER, C.O.; MUMM, R.F. Heterosis among populations of maize (*Zea mays* L.) with different levels of exotic germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.73, p.445-450, 1987.

DUDLEY, J.W. Theory for transfer of alleles. **Crop Science**, v.22, p.631-637, 1982.

DUVICK, D.N. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve. **Economic Botany**, v.38, p.161-178, 1984.

EBERHART, S.A. Regional maize diallels with U.S. and semi-exotic varieties. **Crop Science**, v.11, p.911-914, 1971.

GERMEK, E.B. **A importância da introdução de plantas nos trabalhos de melhoramento**. Campinas: Instituto Agronômico, 1992. 15p. (Documentos, 28).

GOODMAN, M.M. Exotic maize germplasm: status, prospects, and remedies. **Iowa State Journal of Research**, v.59, p.497-527, 1985.

GOODMAN, M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving. **Journal of Heredity**, v.81, p.11-16, 1990.

GOODMAN, M.M. Broadening the genetic diversity in maize breeding by use of exotic germplasm. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (Ed.) **Genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p.139-148.

GRIFFING, B.; LINDSTROM, E.W. A study of the combining abilities of corn inbreds having varying proportions of corn belt and non corn belt germplasm. **Agronomy Journal**, v.46, p.545-552, 1954.

HALLAUER, A.R. Potential of exotic germplasm for maize improvement. In: WALDEN, D.B., (Ed.) **Maize breeding and genetics**. New York: John Wiley, 1978. p.229-247.

HALLAUER, A.R.; SEARS, J.H. Integrating exotic germplasm into Corn Belt maize breeding programs. **Crop Science**, v. 12, p.203-206, 1972.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa University Press, 1995. 468p.

HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, v.20, p.509-517, 1971.

HOLDEN, J.; PEACOCK, J.; WILLIAMS, T. **Genes, crops and the environment**. New York: Cambridge University Press, 1993. 162p.

ININDA, J.; FEHR, W.R.; CIANZIO, S.R.; SCHNEBLY, S.R. Genetic gain in soybean populations with different percentages of plant introduction parentage. **Crop Science**, v.36, p.1470-1472, 1996.

JAIN, H.K. Plant genetic resources and policy implications for a changing agriculture. **Indian Journal Genetics**, v.53, p.223-237, 1993.

KENWORTHY. W.J. Strategies for introgressing exotic germplasm in breeding programs. In: CORBIN, F.T. (ed.) WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2., Raleigh, 1979. **Proceedings**. Boulder: Westview Press, 1980. p.217-223.

LIMA, M.; GIMENES-FERNANDES, N.; MIRANDA FILHO, J.B.; PEREIRA, J.C.V.A. Introduction of maize (*Zea mays* L.) germplasms as sources for downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) resistance. **Maydica**, v.27, p.159-168, 1982.

LONNQUIST, J.H. Consideration and experiences with recombinations of exotic and Corn Belt maize germplasms. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 29., Chicago, 1974. **Proceedings**. Washington: American Seed Trade Association, 1974. p.102-117.

MAGNAVACA, R.; OLIVEIRA, A.C.; MORAIS, A.R.; GAMA, E.E.G.; SANTOS, M.X. Family hybrid selection of quality protein maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v.34, p.63-71, 1989.

MICHELINI, L.A.; HALLAUER, A.R. Evaluation of exotic and adapted maize (*Zea mays* L.) germplasm crosses. **Maydica**, v.38, p.275-282, 1993.

MIRANDA FILHO, J.B. Cruzamentos dialélicos e síntese de compostos de milho (*Zea mays L.*) com ênfase na produtividade e no porte da planta. Piracicaba: ESALQ/USP, 1974. 116p. Tese, Doutorado.

MIRANDA FILHO, J.B. Exotic germplasms introduced in a Brazilian maize breeding program. **Brazilian Journal of Genetics**, v.15, p.631-642, 1992.

MIRANDA FILHO, J.B. Estrutura genética da coleção de germoplasma de milho. In: WORKSHOP SOBRE GENÉTICA PARA RECURSOS GENÉTICOS DE MILHO. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1996. 9p.

MIRANDA FILHO, JB. Inbreeding depression and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (Ed.) **Genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p.69-80.

MIRANDA FILHO, J.B.; VENCOVSKY, R. Analysis of diallel crosses among open-pollinated varieties of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v.29, p.217-234, 1984.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (Ed.) **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.277-340.

MONTAÑO-VELASCO, J.C. Análise genética de progênies F_3 de soja derivadas de cruzamentos em cadeia com ênfase na produção de óleo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 115p. Tese, Doutorado.

MORO, J.R.; NASPOLINI FILHO, V.; VIANNA, R.T.; GAMA, E.E.G. Introdução de novos germoplasmas de milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, p.867-882, 1981.

MUNGOMA, C.; POLLAK, L.M. Heterotic patterns among ten Corn Belt and exotic maize germplasm. **Crop Science**, v.28, p.500-504, 1988.

NASS, L.L. Variabilidade genética de populações semi-exóticas de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. 136p. Tese, Doutorado.

NASS, L.L. Pré-melhoramento em milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., 1999, Brasília. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

NASS, L.L.; MIRANDA FILHO, J.B. Inbreeding depression rates of semi-exotic maize (*Zea mays* L.) populations. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, p.585-592, 1995.

NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, p.581-587, 2000.

NASS, L.L.; PELLICANO, I.J.; VALOIS, A.C.C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v.16, p.983-988, 1993.

NASS, L.L.; MIRANDA FILHO, J.B.; COSTA, F.M.P.; NISHIKAWA, M.A.N. Potencial genético de linhagens de milho introduzidas do Cimmyt. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., Recife, 1998. **Globalização e segurança alimentar**; resumos. Recife: IPA, 1998. p.57.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Genetic vulnerability of major crops**. Washington: NAS-NRC, 1972.

NISHIKAWA, M.A.N.; NASS, L.L.; MIRANDA FILHO, J.B. Avaliação de germoplasma exótico de milho (*Zea mays* L.) para resistência a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. p.81.

PATERNIANI, E. Heterosis in intervarietal crosses of maize (*Zea mays* L.) and their advanced generations. **Brazilian Journal of Genetics**, v.3, p.235-249, 1980.

PATERNIANI, E. An evaluation of the genetic diversity in the varieties currently utilized. In: PLANT BREEDING RESEARCH FORUM; Report 1987. Caracas, 1985. p.45-58.

PATERNIANI, E. Diversidade genética em plantas. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV, UNESP, 1988. p.75-77.

PATERNIANI, E. Maize breeding in the tropics. **CRC Critical Review in Plant Science**, v.9, p.125-154, 1990.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Cultura do milho:** fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafós, 1993. p.23-43.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M.M. **Races of maize in Brazil and adjacent areas.** Mexico: CIMMYT, 1977. 95p.

PATERNIANI, E.; LONNQUIST, J.H.. Heterosis in interracial crosses of corn (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v.3, p.504-507, 1963.

PEETERS, J.P.; GALWEY, N.W. Germplasm collections and breeding needs in Europe. **Economic Botany**, v.42, p.503-521, 1988.

REGITANO NETO, A. Incorporação de germoplasma exótico em milho. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. 133p. Tese, Doutorado.

REGITANO NETO, A.; NASS, L.L.; MIRANDA FILHO, J.B. Potential of twenty exotic germplasms to improve Brazilian maize architecture. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.691-696, 1997.

REITZ, L.P. New wheats and social progress: improved varieties of wheat have helped make possible unprecedentedly high levels of food production. **Science**, v.169, p.952-955, 1970.

ROBINSON, R.A. **Return to resistance:** breeding crops to reduce pesticide dependence. Davis: agAccess, 1996. 480p.

SALHUANA, W. Strategies for increasing the use of germplasm. In: PLANT BREEDING RESEARCH FORUM; Report 1987. Caracas, 1985. p.141-172.

SAMPAIO, N.F.; MIRANDA FILHO, J.B. Propriedades genéticas e potencial para o melhoramento da produtividade de dois compostos de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16., Belo Horizonte, 1986. **Anais**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1988. p.14-320.

SANTOS, M.X. Estudo do potencial genético de duas raças brasileiras de milho (*Zea mays* L.) para fins de melhoramento. Piracicaba: ESALQ/USP, 1985. 186p. Tese, Doutorado.

SANTOS, M.X.; MIRANDA FILHO, J.B. Genetic potential of two Brazilian races of maize (*Zea mays* L.) for breeding purposes. **Journal of Genetics & Breeding**, v.46, p.83-90, 1992.

SANTOS, M.X.; MIRANDA FILHO, J.B.; SOUZA JÚNIOR, C.L. Potencial genético de duas raças brasileiras de milho para fins de melhoramento: II. Caracteres da planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, p.1489-1500, 1990.

SANTOS, M.X.; POLLAK, L.M.; PACHECO, C.A.P.; GUIMARÃES, P.E.O.; PETERNELLI, L.A.; PARENTONI, S. N.; NASS, L.L. Incorporating different proportions of exotic maize germplasm into two adapted populations. **Genetics and Molecular Biology**, V.23, P.445-451, 2000.

SCHOENER, C.S.; FEHR, W.R. Utilization of plant introductions in soybean breeding populations. **Crop Science**, v.19, p.185-188, 1979.

SIMMONDS, N.W. Introgression and incorporation. Strategies for the use of crop genetic resources. **Biology Reviews**, v.68, p.539-562, 1993.

SMITH, J.C.S.; DUVICK, D.N. Germplasm collections and the private plant breeder. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources.** Cambrigde: Cambrigde University Press, 1989. p.17-31.

THORNE, J.C.; FEHR, W.R. Exotic germplasm for yield improvement in 2-way and 3-way soybean crosses. **Crop Science**, v.10, p.677-678, 1970.

TOLEDO, J.F.F.; ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; PANIZZI, M.C.C.; KASTER, M.; MIRANDA, L.C.; MENOSSO, O.G. Genetics and breeding. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da soja. **Tropical soybean:** improvement and production. Rome: FAO, 1994. p.19-36. (Plant Production and Protection Series, 27)

VALLS, J.F.M. A busca de germoplasma de plantas forrageiras e estratégias para sua coleta. **Dialogo**, n.28, p.309-318, 1990.

VELLO, N.A.; FEHR, W.R.; BAHRENFUS, J.A. Genetic variability and agronomic performance of soybean populations developed from plant introduction. **Crop Science**, v.24, p.511-514, 1984.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1986. 15p. (Boletim de Pesquisa, 1)

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, Cenargen, 1997. 78p.

WELLHAUSEN, E.J. Exotic germplasm for improvement of Corn Belt maize. In: ANNUAL HYBRID CORN INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 20., Chicago, 1965. **Proceedings**. Washington: American Seed Trade Association, 1965. p.31-45.

ZIMBACK, L. Cruzamentos em cadeia entre genótipos adaptados e exóticos de soja com ênfase na produção de óleo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. 178p. Tese, Doutorado.

6

CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

AFONSO CELSO CANDEIRA VALOIS[1]
LUCIANO LOURENÇO NASS[2]
MARISA DE GOES[2]

[1]Embrapa Sede, C.P. 040315 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.
[2]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica abrange todas as espécies de plantas, animais e microrganismos, envolvendo ainda os ecossistemas e os processos ecológicos aos quais as espécies pertencem. Este conceito, elaborado ao longo dos anos, foi reafirmado durante a Convenção da Diversidade Biológica, promulgada no Rio de Janeiro em 1992.

Os países detentores da megadiversidade biológica são Brasil, Colômbia, Equador, México, Venezuela, Madagascar, Zaire, China, Índia, Indonésia, Malásia e Austrália. O Brasil é o mais rico em plantas, animais e microrganismos, pois possui cerca de 20% do total existente no Planeta.

Dentro deste contexto, nota-se que a maior parte da biodiversidade encontra-se nos países em desenvolvimento, que são dependentes de tecnologias, capacitação de recursos humanos e infra-estrutura existentes em países desenvolvidos, que por sua vez são altamente dependentes de biodiversidade. Este aspecto se traduz em um grande poder de negociação de países do Hemisfério Sul frente a países do Norte.

Khoshoo (1996) discutiu a relação entre biodiversidade e biotecnologia dividindo os países do mundo em quatro grupos principais: (1) pobres em biodiversidade e biotecnologia; (2) pobres em biodiversidade e ricos em biotecnologia; (3) ricos em biodiversidade e pobres em biotecnologia; e (4) ricos em biodiversidade e biotecnologia (Figura 1). No grupo 1 encontram-se os países do Oriente Médio (por exemplo, Arábia Saudita); no grupo 2 os países desenvolvidos como Estados Unidos, Japão, Alemanha, França, Inglaterra; no grupo 3 Indonésia, Índia, China, Malásia, Brasil, México e outros países tropicais ou subtropicais; e no grupo 4 não existe nenhum país com tais características. O autor salientou que existe um fluxo de biodiversidade do grupo 3 para o grupo 2. Entretanto, considerou difícil a avaliação do fluxo de biotecnologia na direção oposta.

A troca permanecerá desigual até que os países classificados no grupo 3 sejam auto-suficientes em biotecnologia, haja vista que tais países têm a possibilidade de alcançar o grupo 4, enquanto os países do grupo 2 não têm condição de atingir esse quadrante, uma vez que não dispõem de alta biodiversidade.

Fazendo-se uma análise sobre os cerca de 120 produtos que entram na dieta alimentar da humanidade vemos que apenas 15 espécies de plantas (arroz, banana, batata, batata-doce, beterraba açucareira, cana-de-açúcar, centeio, cevada, feijão, coco, mandioca, milho, soja, tomate e trigo) são consumidas por cerca de 80% da população e que apenas quatro espécies (arroz, batata, milho e trigo) são utilizadas por 60% da população mundial.

Diante deste quadro, é fácil o entendimento de que trata-se de um processo bastante vulnerável para a segurança alimentar dos povos, o que aumenta a responsabilidade dos países detentores de biodiversidade em aprofundar os estudos no desenvolvimento de tecnologias que estimulem o uso de espécies autóctones no sentido de aumentar a oferta e atender à demanda dos consumidores, diminuindo a

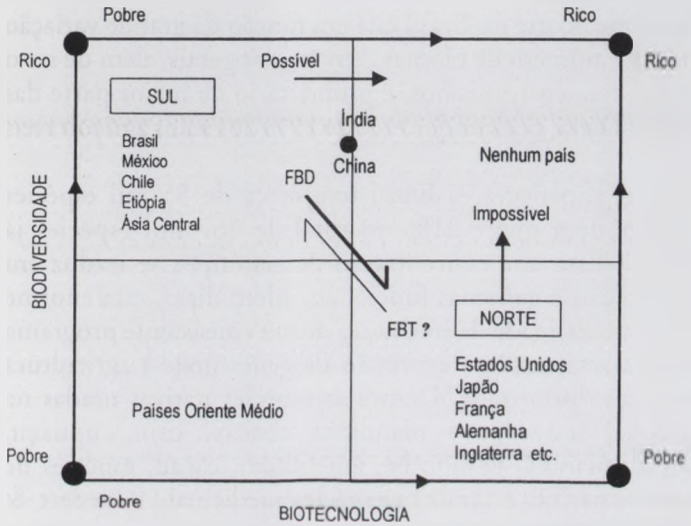


FIGURA 1. Relação entre biodiversidade e biotecnologia de acordo com Khoshoo (1996). (FBD: Fluxo de biodiversidade; FBT: Fluxo de biotecnologia)

dependência por espécies exóticas e aumentando o poder de barganha com os países do Norte. Mesmo países como o Brasil, proprietários de rica biodiversidade, são extremamente dependentes de produtos externos; cerca de 80% dos produtos alimentícios, que nos chegam à mesa, são originários de outros países.

Todos estes fatos aumentam a importância da conservação *ex situ* de recursos genéticos, isto é, o manejo do germoplasma fora do local de origem, tanto autóctones como exóticos, disponibilizando materiais para uso em programas de melhoramento genético, biotecnologia e ciências afins, no sentido da geração de novos genótipos para a segurança alimentar e outras utilidades.

O presente capítulo enfoca a aplicação de tecnologias disponíveis na conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais, com base na competência técnica acumulada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ao longo dos seus vinte e cinco anos de atuação.

2. BIODIVERSIDADE E RECURSOS GENÉTICOS

O binômio biodiversidade e recursos genéticos forma a base sólida da agrobiodiversidade visando ao desenvolvimento de uma agricultura sustentável na dimensão do agronegócio, da utilização social e do equilíbrio ambiental.

A biodiversidade está relacionada com a variabilidade genética e com os aspectos evolucionários e ecológicos, podendo ser entendida como a soma da variação que ocorre na natureza quanto a genes, espécies e ecossistemas, se refletindo no número de espécies e suas combinações, além das recombinações genéticas envolvendo as espécies.

A diversidade genética acolhe a informação genética nas espécies da flora, fauna e microbiota, enquanto que a diversidade de espécies considera os graus de diferenciação para adaptação nos diferentes nichos ecológicos, bem como a diversidade de ecossistemas. Já a diversidade de ecossistemas abrange a variedade, número e freqüência de habitats, além dos processos ecológicos e comunidades bióticas.

A rica biodiversidade que ocorre no Brasil está em função da grande variação ecológica, dimensão territorial e número de biomas. Em termos gerais, além de ser o mais rico em plantas, animais e microrganismos, é proprietário da maior parte das reservas florestais intactas do planeta, possuindo cerca de 19% dos solos agricultáveis do mundo.

Para o caso de plantas superiores, o Brasil tem cerca de 55 mil espécies identificadas, o que corresponde a quase 21% do total de 267 mil espécies já classificadas ao nível mundial. Esta alta concentração de genótipos se traduz em elevado número de genes tropicais e genomas funcionais. Além disso, esta enorme disponibilidade aponta para a necessidade da efetivação de um consistente programa de prospecção, isolamento, caracterização e expressão de genes úteis à agricultura sustentável, dentro de uma ação priorizada. Dentre as espécies nativas usadas na alimentação humana e animal destacam-se: mandioca, abacaxi, caju, cupuaçu, maracujá, castanha-do-Brasil, guaraná, jabuticaba, amendoim, cacau, espécies de palmeiras, algumas forrageiras nativas e também espécies medicinais (Goedert & Wetzel, 1999), além de muitas outras espécies de uso regional.

Centros de origem correspondem à região geográfica onde se originou uma espécie ou foi primeiramente domesticada, enquanto que centros de diversidade atestam a região geográfica com elevado grau de diversidade genética (IBPGR, 1991). Esta diversidade pode ser primária se houver a ocorrência de espécies de interesse econômico em associação com espécies parentes silvestres, com características primitivas e elevada freqüência de caracteres dominantes, podendo ser ainda secundária, isto é, com pouca ocorrência de parentes silvestres, com baixos níveis de variação genética e pronunciada ocorrência de caracteres recessivos. Todos os cinco biomas brasileiros, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Campos e Florestas Meridionais acolhem centros de origem e centros de diversidade genética de espécies.

No processo de exploração máxima da variabilidade genética para efeito da conservação *ex situ* tem sido considerado o conceito de *gene pool* ou complexo gênico. Eles são classificados em *gene pool* primário (GP1) onde os cruzamentos são comuns e geralmente geram progênies férteis, a segregação de genes é praticamente normal e a transferência genética geralmente ocorre com facilidade; *gene pool* secundário (GP2) em que os cruzamentos com GP1 são possíveis apesar da existência de algumas barreiras que os dificultam, geram progênies com níveis variáveis de esterilidade ou fertilidade, pareamento cromossômico pobre ou até nulo, existindo dificuldade de levar os híbridos à maturidade e à gerações subseqüentes; e *gene pool* terciário (GP3) onde os cruzamentos usando o GP1 geram progênies anômalas, com graus de letalidade ou completamente estéreis. Nesta classe, somente a aplicação de ferramentas biotecnológicas torna possível a exploração da variabilidade do complexo gênico (Harlan & de Wet, 1971).

Os recursos genéticos estão incluídos na diversidade biológica e abrangem inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos que, em equilíbrio atuam em significativa interação em sistemas biológicos. Possuem interesse socioeconômico real e potencial visando à utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins (United Nations Environment Programme, 1992).

Em linhas gerais, os recursos genéticos abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, espécies de parentes silvestres, raças locais, variedades, linhagens melhoradas, linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais e populações experimentais, dentre outras. Apesar de que na atualidade nem todas as espécies possuem demanda para uso, no futuro poderão ser altamente desejáveis levando-se em conta a utilização de genes e alelos existentes. Para aquelas espécies que possuem enorme importância para uso atual ou potencial deve ser dirigido um esforço especial no sentido da efetuação do manejo relacionado com a coleta, conservação, caracterização, avaliação, documentação, informação e disponibilidade de pronunciado nível de variabilidade genética.

Considerando que os recursos genéticos abrangem o conjunto de amostras de populações de plantas, animais e microrganismos que abarcam variabilidade genética de grande interesse para uso, os mesmos são representados pelo germoplasma que por seu turno, é o conjunto de materiais hereditários de uma espécie, isto é, a base física da herança genética (IBPGR, 1991).

3. FASES DO MANEJO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

O desenvolvimento de ações para a conservação e uso dos recursos genéticos deve estar fundamentado em bases sólidas de planejamento e com perspectivas de execução a longo prazo. Desta forma, programas nacionais de conservação são criados para dar suporte a um complexo de ações de pesquisa, apoio e desenvolvimento de recursos genéticos, sendo de fundamental importância a identificação de espécies e atividades prioritárias na busca por tecnologias eficientes para a conservação e uso do germoplasma, em bases sustentáveis e com racionalização dos recursos financeiros (Goedert & Wetzel, 1999).

Os procedimentos para a conservação *ex situ* de germoplasma vegetal requerem o uso de metodologias técnico-científicas como base para atividades de rotina e pesquisa, não só para permitir a prática de uma conservação bem manejada, como também para promover e induzir ao uso do germoplasma armazenado.

De uma maneira geral, os processos de cunho técnico que conduzem ao correto manejo do germoplasma conservado envolvem as seguintes atividades:

3.1 PROSPECÇÃO E COLETA

A prospecção ou pré-coleta é uma fase de grande auxílio para a efetivação da coleta propriamente dita, pois permite delinear com antecedência, todas as fases consideradas imprescindíveis para o pleno sucesso da coleta a ser efetuada.

A coleta de germoplasma – processo de localizar os recursos genéticos no campo, amostrar o germoplasma e transferir esses recursos para um banco de germoplasma – é o passo inicial para a conservação *ex situ* dos recursos genéticos vegetais (Guarino *et al.*, 1999). Embora o processo de coleta possa parecer uma atividade simples, com regras pré-estabelecidas, sua execução requer estudos prévios, sempre que possível, para se conhecer entre outros aspectos o mecanismo de reprodução da espécie, os principais polinizadores e estudos de simulação gráfica para a definição de áreas potenciais de coleta. Além disso, o conhecimento das características fenológicas, em ambientes semelhantes à região onde será efetuada a

coleta, é fundamental, pois poderá auxiliar na definição da época mais apropriada para a realização da expedição (Vilela-Morales, 1999).

As coletas são efetuadas tanto em populações silvestres ou primitivas como em populações domesticadas. Diversos materiais podem ser alvo de coleta, entre eles: sementes, bulbos, tubérculos, pólen, plantas inteiras etc. A equipe de coleta deve ter conhecimento adequado de botânica, ecologia, genética de populações, melhoramento de plantas e fitopatologia. Além disso é necessário ter um bom conhecimento do país ou região onde será efetuada a expedição, incluindo aspectos socioeconômicos e costumes locais (Esquinas-Alcázar, 1993). Inúmeros aspectos relacionados com as atividades de coleta são amplamente discutidos por Bennett (1970), Creech (1970), Chang (1985) e Guarino *et al.* (1995).

Para a captura da variabilidade genética existente, nas coletas devem ser utilizados procedimentos de amostragem, levando-se em conta os mecanismos de reprodução das plantas, o tamanho efetivo da população e a freqüência gênica. Marshall & Brown (1975) reconheceram quatro classes de alelos: comum e dispersos, comum e restritos, raros e dispersos, e raros e restritos. Segundo os autores a classe comum e dispersos não apresenta problema, sendo tais alelos capturados mesmo dentro de pequenas amostras coletadas de poucas populações. Se os alelos são raros, não importando a distribuição, a probabilidade deles serem incluídos depende do tamanho das amostras e do número de populações que podem ser amostradas. Caso seja restrita, o conhecimento da distribuição pode ajudar, porém amostras maiores são necessárias. A classe mais importante para coleta é aquela com distribuição comum em áreas restritas. Em termos do tamanho da amostra no processo de coleta, esta deve ser mais pronunciada em espécies autógamas por possuírem o fenômeno da variação genética livre, em contraste com as espécies alógamas que oferecem uma variação genética potencial (Vilela-Morales *et al.*, 1997). Para exemplificar tal fenômeno os autores usaram dois locos com dois alelos (Aa e Bb). No caso de autógamas os genótipos possíveis são AABB, AAbb, aaBB e aabb, enquanto que para as alógamas são AABB, AABb, AAbb, AaBB, AaBb, Aabb, aaBB, aaBb e aabb. No primeiro caso nenhum genótipo contém todos os alelos possíveis, o que dificulta a coleta do germoplasma. Por outro lado, nas alógamas existe a presença do duplo heterozigoto (AaBb) que contém todos os alelos e, conseqüentemente, facilita o processo de amostragem.

As expedições de coleta de germoplasma devem ser organizadas para atender às seguintes alternativas: a) coletar germoplasma de produtos tradicionais ou com interesse econômico; b) coletar germoplasma de produtos ou culturas alternativas ou potenciais; c) coletar germoplasma com risco eminente de destruição, em operações de resgate; d) coletar germoplasma em locais com diversidade genética expressiva, de modo a aumentar os níveis de variação genética disponível para os programas de pesquisa e desenvolvimento (Coradin, 1990).

Sistemas de Informação Geográfica (SIG) têm sido utilizados para realizar levantamentos ecogeográficos a fim de identificar áreas alvo para a coleta de germoplasma, entre elas: a) áreas de alta diversidade para uma determinada cultura; b) áreas onde a cultura e seus parentes silvestres coexistem; c) áreas para proteger germoplasma de interesse específico; d) áreas para identificar genótipos que estão

sub-representados nas coleções; e) áreas representativas de falhas ecogeográficas nas coleções; f) áreas de risco de erosão genética (Greene & Guarino, 1999). Um levantamento constatou a existência de aproximadamente 835.000 acessos (excluindo os 675.000 acessos existentes nos centros internacionais do *Consultative Group on International Agriculture Research* - CGIAR) em 340 bancos de germoplasma na América Latina e Caribe; no Brasil, até 1994, 300 expedições foram realizadas, as quais agregaram cerca de 40.000 acessos ao sistema de conservação (Guarino *et al.*, 1999).

O passaporte é considerado o documento de identidade da amostra coletada, sendo que os dados obtidos podem variar de uma instituição para outra. Entretanto, alguns dados são imprescindíveis como informações geográficas, nome do coletor, dados edafoclimáticos, tipo de vegetação, existência de fatores causadores de estresses bióticos e abióticos, possível interesse econômico e informações básicas das amostras obtidas (Lleras, 1988; Esquinas-Alcázar, 1993). Costa (1999) enfatizou que a organização dos dados de passaporte, existentes nos bancos ou coleções de germoplasma, é fundamental para se ter uma visão coerente das atividades realizadas ou a realizar com germoplasma de um produto ou grupo de produtos. Na circulação do germoplasma, seja como trânsito interno, introdução ou exportação, é recomendável a obtenção e o registro de dados de passaporte originais do acesso, uma vez que esse simples cuidado pode evitar duplicações inconvenientes economizando tempo e dinheiro. Costa & Vilela-Morales (1994) utilizando dados de passaporte dos acessos de mandioca existentes no Brasil, verificaram que dos 4.300 acessos disponíveis, 30% eram duplicações. Ritschel *et al.* (1998) utilizando marcadores morfológicos na caracterização preliminar do germoplasma brasileiro de batata-doce detectaram 23% de duplicações.

A utilização de dados de passaporte e de descritores morfológicos permite orientar, de forma mais segura, futuros trabalhos envolvendo técnicas com marcadores moleculares (Costa, 1999). O avanço observado nas técnicas do DNA recombinante também tem sido incorporado nas atividades de coleta. Miller & Tanksley (1990) demonstraram que o uso de polimorfismo baseado em tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) permitiu estimar que a probabilidade de adicionar novos genes à coleção de tomate poderia aumentar vinte vezes pela simples inclusão de um acesso de *Lycopersicon peruvianum*, um parente silvestre do tomate.

3.2 INTERCÂMBIO E QUARENTENA

O intercâmbio de germoplasma tem sido uma prática bastante utilizada visando ao enriquecimento da variabilidade genética conservada. O intercâmbio de germoplasma oferece oportunidade para a incorporação de "novos" genes de interesse para utilização nos programas de melhoramento.

Esta prática exige um controle fitossanitário rigoroso tendo em vista evitar a entrada de pragas e patógenos inexistentes na agricultura dos respectivos países. Assim, nos procedimentos de intercâmbio os seguintes critérios devem ser considerados com rigor: a) a amostra deve ter a representatividade genética da população de origem (muitas vezes esse item não é observado, por vários motivos, mas especialmente devido à baixa disponibilidade do material na coleção de origem); b) a amostra deve estar

livre de pragas (insetos e patógenos); c) a inspeção fitossanitária deve ser organizada de modo a possibilitar a detecção de insetos, fungos, bactérias, vírus, ácaros e nematóides; d) os procedimentos quarentenários devem ser rígidos quanto à eliminação das amostras contaminadas.

De maneira geral, as amostras movimentadas no processo de intercâmbio podem ser de livre intercâmbio, de intercâmbio restrito, de germoplasma avançado ou de pesquisa. Na atualidade, em face dos direitos de propriedade intelectual, nas ações de intercâmbio de recursos genéticos têm sido praticada a assinatura de acordos de transferência de material visando assegurar os direitos das partes envolvidas no processo.

A quarentena é um determinado período de incubação no qual pode ocorrer o aparecimento e detecção de pragas e sintomas de doenças. Esta prática é um excelente mecanismo de proteção para a agricultura, pois evita a entrada de pragas e doenças em áreas até então isentas desses organismos.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo das atividades de intercâmbio de germoplasma realizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 1997 e 1998.

TABELA 1. Intercâmbio realizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 1997 e 1998.

Descrição	1997	1998
Acessos importados	15.251	23.405
Acessos exportados	1.004	344
Acesso de trânsito interno	2.684	3.269
Total do intercâmbio de acessos de plantas	18.939	27.018

Fonte: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (1998; 1999).

3.3 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

Esta prática tem grande importância no sentido de disponibilizar a variabilidade genética para uso em programas de melhoramento genético, biotecnologia e ciências afins. Para a escolha do melhor procedimento de conservação da amostra, inicialmente devem ser conhecidos os tipos de sementes produzidas pelos genótipos, de acordo com a fisiologia. Assim, as sementes podem ser: a) ortodoxas – quando suportam secagem entre 4% a 6% de umidade, porque se apresentam secas em sua maturação fisiológica e devido ao baixo grau de umidade, suportam a exposição prolongada a temperaturas subzero (-10°C a -20°C), exemplos: arroz, milho e feijão; b) intermediárias – quando suportam certo grau de secagem (em torno de 10% de umidade), porém este não é suficiente para conservá-las ou protegê-las dos danos causados por baixas temperaturas, portanto, embora mais secas que em seu estado normal, não suportam temperaturas subzero, exemplos: café e citros; e c) recalcitrantes – quando não suportam secagem e não podem ser conservadas em temperaturas subzero devido ao alto teor de água que possuem em sua maturação.

Sementes ortodoxas podem ser conservadas a longo prazo em temperaturas subzero, preferencialmente variando entre -10°C e -20°C, porém o ideal é que seja em torno de -18°C ou abaixo, em coleção de base. Geralmente as sementes intermediárias têm sido conservadas a médio prazo entre 5°C e 10°C (Ellis *et al.*,

1991); os períodos de sobrevivência em baixa temperatura, assim como o grau de secagem, variam entre espécies e até mesmo entre genótipos. Várias pesquisas têm sido realizadas em anos recentes na busca de métodos que viabilizem a conservação *ex situ* dessas espécies, no entanto ainda existem limitações que tornam impraticável sua conservação a longo prazo em bancos de germoplasma (Eira, 1996). Os resultados obtidos pelo congelamento de sementes ou embriões zigóticos em nitrogênio líquido têm sido promissores na conservação de várias espécies com sementes intermediárias e recalcitrantes (Normah, 1994; Berjak & Dumet, 1996; Dussert *et al.*, 1997; 1998; Althoff, 1998). Espécies que possuem sementes recalcitrantes, podem ser conservadas a campo, *in vitro* ou em criopreservação (-196°C) de tecidos, pólen, embriões e sementes. Nesses processos de conservação *ex situ*, deve haver todo o cuidado para que sejam evitadas a erosão genética pela perda ou redução da viabilidade da semente, a instabilidade genética pelo aparecimento de mutações como aneuploidia, ou mesmo a variação somaclonal pela constante repicagem das amostras conservadas *in vitro*. Para isso a metodologia escolhida deve ser comprovadamente a mais adequada e deve ser estabelecido um consistente procedimento do monitoramento das coleções.

Para o caso da conservação a campo, útil para conservar as espécies que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias, que não produzem sementes e outras que produzem sementes ortodoxas mas são altamente heterozigotas e, normalmente, são de propagação vegetativa, atenção deve ser dada para as seguintes limitações: ocupação de áreas extensas por longos períodos; grande necessidade de recursos humanos, financeiros e materiais para implantação, condução e manutenção das coleções; necessidade de duplicação das coleções para reduzir os riscos de perda pela ocorrência de catástrofes de ordem biótica, abiótica e antrópica; longos períodos para expressão das características genéticas e uso de condições ambientais não compatíveis com a expressão das características fenotípicas. São muito importantes os cuidados a serem tomados para apresentar soluções alternativas a estas limitações, considerando sempre a relação custo benefício, pois, muitas das importantes espécies que ocorrem no Brasil, especialmente perenes, produzem sementes recalcitrantes.

A biotecnologia pode ter papel relevante especialmente para as espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes e intermediárias e espécies com problemas severos de produção de sementes (Rao & Riley, 1994).Também o DNA de espécies com risco de erosão genética, extinção ou com interesse para o desenvolvimento de biotecnologias pode ser conservado em bancos genômicos, cujo procedimento é da maior importância para países ricos em genes tropicais, como o Brasil.

3.4 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

Estas duas práticas são da maior importância para o conhecimento e uso do germoplasma conservado. Em termos gerais, a caracterização pode ser morfológica, reprodutiva, agronômica, bioquímica, citogenética e molecular; baseando-se na classificação dos acessos por seus caracteres qualitativos, enquanto que a avaliação considera os caracteres quantitativos (Vilela-Morales, 1988). Visando a execução de um procedimento adequado, deve ser definida uma lista mínima de descritores por espécie, sendo que na caracterização são utilizados descritores com alta herdabilidade,

e por conseguinte, pouco influenciados pelo ambiente. Para o caso da avaliação, cujos caracteres são comandados por muitos pares de genes e ocorre acentuada influência do ambiente, o procedimento deve ser repetido em diferentes locais de modo que possa ser melhor decomposto o efeito da interação genótipo x ambiente.

O *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) tem disponibilizado várias listas de descritores para diversas espécies de plantas proporcionando uma melhor uniformização na caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (Rao & Riley, 1994); estas listas contêm grande quantidade de descritores que podem ser utilizados na íntegra ou selecionados em descritores mínimos, de acordo com a necessidade imediata do usuário.

Os procedimentos de caracterização e avaliação são importantes para a formação de coleções nucleares, que são estruturas físicas com cerca de 10% a 15% do número de acessos das coleções originais, mas que encerram cerca de 70% a 80% da representatividade genética daquelas coleções, e são elaboradas com a função de incentivar e orientar o uso do germoplasma conservado.

3.5 REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO

A regeneração é o processo de renovação da amostra originalmente obtida. Nesse aspecto o tipo de reprodução praticado pela espécie é muito importante, sendo mais facilmente realizado nas espécies autógamas do que nas alógamas.

O processo de regeneração é idêntico ao processo de multiplicação para a produção de sementes a fim de repor os estoques dos bancos ativos ou para atividades de avaliação e distribuição entre os usuários, especialmente os melhoristas (Frankel *et al.*, 1995). Caso o poder germinativo (PG) das sementes seja reduzido para 85% em relação ao PG constatado no início do processo de conservação, devem ser utilizados procedimentos de regeneração de modo que cada genótipo deixe a sua contribuição gamética para a próxima geração.

Atenção deve ser dada aos efeitos da seleção natural, os quais devem ser minimizados no ambiente em que é conduzida a regeneração. Vencovsky (1986) e Breese (1989) enfatizaram a necessidade de adequada representatividade genética, explorando o conceito do tamanho efetivo populacional no processo de regeneração, como forma de evitar problemas com deriva genética e efeitos da seleção natural. Frankel *et al.* (1995) ressaltaram que a deriva genética, causadora de perdas de alelos raros não-adaptativos, é menos prejudicial que a seleção natural, a qual pode afetar adversamente a freqüência de alelos adaptativos. Os autores salientaram também que ambos os inconvenientes podem ser evitados com um tamanho efetivo mínimo de 30, porém deve-se preferir um tamanho efetivo de 50 ou mais.

3.6 DOCUMENTAÇÃO E INFORMAÇÃO

Os avanços na área de informática vêm sendo sistematicamente incorporados aos trabalhos com recursos genéticos com o objetivo de facilitar tais atividades. A disponibilidade de tecnologias e *softwares* mais eficientes e de fácil manuseio constituem-se em ferramentas extremamente úteis para as diversas rotinas existentes no trato do germoplasma (Costa, 1999). Além de auxiliar nos trabalhos de documentação, os avanços da informática têm contribuído no intercâmbio e disseminação da informação ao redor do mundo. Hawtin *et al.* (1996) destacaram a possibilidade de troca de informações

pelo SINGER (*System-wide Information Network on Genetic Resources*) sobre o germoplasma disponível nos diversos centros internacionais de pesquisa coordenados pelo CGIAR. Obviamente a Internet apresenta-se como um veículo de grande importância na disseminação dessas informações.

Estas atividades são dirigidas para o monitoramento das informações referentes ao enriquecimento da variabilidade genética através da coleta e intercâmbio de germoplasma, cadastramento ou inventário das coleções, acompanhamento e análise do estado da conservação dos acessos, além da caracterização, avaliação e uso do germoplasma.

A documentação e informação em conjunto com a caracterização e avaliação formam a base primordial que conduz ao uso do germoplasma conservado. Isto requer a formação e implementação de um sistema de informação de recursos genéticos que seja automatizado e integrado ao nível nacional, que além dos componentes acima definidos, abranjam: base de dados sobre tecnologias e pesquisas relacionadas com recursos genéticos, base de dados bibliográficos sobre recursos genéticos e tecnologias apropriadas, definição de sistemas geográficos e de sensoriamento remoto para reconhecer, determinar e monitorar locais com diversidade genética de interesse, além da definição de sistemas especialistas (Vilela-Morales, 1988).

Na prática, a introdução de acessos às coleções está relacionada com o registro do máximo de dados que os identifiquem na coleção, tais como o número de registro pelo qual o acesso será conhecido na coleção (no Brasil é o BRA000000), origem e procedência, poder germinativo, número estimado de sementes ou de amostras; no caso de material oriundo de coletas, as informações de caderneta de campo, além das informações de caracterização e avaliação. Esse conjunto de dados, denominados de dados de passaporte, são essenciais no sentido de disponibilizar a coleção ao usuário.

O conhecimento etnobiológico de comunidades indígenas e tradicionais representa um fator inestimável que deve ser levado em consideração. Assim, principalmente nas bases de dados sobre a diversidade das espécies nativas, a inclusão de informações etnobiológicas são de alto valor estratégico para qualquer país (Vilela-Morales, 1999). Conforme salientou Esquinas-Alcázar (1993), quando as variedades desaparecem o conhecimento sobre as mesmas também é perdido, fazendo com que a erosão genética esteja atrelada a uma correspondente erosão de conhecimento.

4. BANCOS E COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

A conservação *ex situ* de recursos genéticos encontra nos bancos e coleções de germoplasma as estruturas físicas onde são armazenados os acessos para a manutenção da variabilidade genética visando à utilização (IBPGR, 1991).

Para o caso específico de plantas, no levantamento da FAO em 1996, o número de bancos ao nível mundial somava 1.308, totalizando 5,5 milhões de acessos conservados, assim distribuídos: África – 6% dos acessos em 124 bancos; América Latina e Caribe – 12% dos acessos em 227 bancos; América do Norte – 14% dos acessos em 101 bancos; Ásia – 28% dos acessos em 293 bancos; Europa – 34% dos acessos em 496 bancos; Leste Europeu – 6% dos acessos em 67 bancos. Além disso, incluem-se as ações e esforços desenvolvidos por Centros Internacionais ligados ao CGIAR, que conservam cerca de 0,6 milhão de acessos em 12 bancos de germoplasma (Tabela 2).

No Brasil, existem atualmente cerca de 180 bancos, somando mais de 200 mil acessos de espécies vegetais, com destaque para as produtoras de grãos, frutíferas, florestais, medicinais, ornamentais, adoçantes e estimulantes, laticíferas, condimentares e corantes, raízes e tubérculos, biocidas, palmeiras, leguminosas, fibrosas, oleaginosas, gramíneas e hortaliças, dentre outras, totalizando 84 produtos (Brasil, 1998; Wetzel & Bustamante, 1999). A maioria dos bancos de germoplasma (110 bancos) está integrada ao principal programa de conservação *ex situ* em desenvolvimento no País, que é o de Conservação e Uso de Recursos Genéticos, pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), implantado no âmbito do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) coordenado pela Empresa. O programa tem como objetivo geral o enriquecimento, a conservação e a documentação dos recursos genéticos autóctones e exóticos, de importância socioeconômica atual e potencial para o país, promovendo e aumentando, via caracterização e avaliação, a utilização desses recursos em programas de melhoramento ou diretamente pelo agricultor, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (Goedert & Wetzel, 1999).

Os bancos de germoplasma inseridos no referido Programa compõem o Sistema de Curadoria de Germoplasma (Tabela 3), coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, contando com a seguinte estrutura:

- Uma Supervisão Geral do Sistema de Curadoria de Germoplasma
- Curadorias de Germoplasma de Produtos ou Grupo de Produtos
- Curadores Adjuntos
- Curadorias de Bancos de Germoplasma
- Curadores *Ad Hoc* de Germoplasma de Produto ou Grupo de Produto.

O Sistema de Curadorias de Germoplasma tem por objetivo definir, sistematizar e integrar todas as atividades indispensáveis ao manejo, conservação e uso de germoplasma no âmbito da Embrapa, bem como recomendar que seja adotado procedimento semelhante em todas as instituições do SNPA (Goedert & Wetzel, 1999; Costa, 1999).

TABELA 2. Acessos conservados *ex situ* nos Centro Internacionais do CGIAR.

Centro	Principais Culturas	Número de Acessos[A]
CIMMYT	Trigo, Milho, Triticale, Cevada	106.300
ICRISAT	Sorgo, Milheto, Grão-de-bico, Amendoim	103.085
ICARDA	Cevada, Trigo, Grão-de-bico, Forrageiras, Lentilha	87.770
IRRI	Arroz	82.670
CIAT	Feijão, Mandioca, Forrageiras	56.700
IITA	Arroz, Caupi, Soja, Mandioca, Batata-doce	39.860
CIP	Batata, Batata-doce	11.590
ILCA	Forrageiras	10.000
WARDA	Arroz	6.076
INIBAP	Banana	563

Fonte: Adaptado de Berthaud (1997)
[A]Aproximado

TABELA 3. Constituição atual do Sistema de Curadorias de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

GRUPOS	CURADORIAS
Curadorias de Recursos Genéticos Animais	Animais Domésticos de Grande Porte
	Animais Domésticos de Pequeno Porte
	Animais Silvestres
Curadorias de Recursos Genéticos de Microrganismos	Microrganismos de Alimentos
	Microrganismos de Controle Biológico
	Microrganismos de Sanidade Animal
	Microrganismos de Sanidade Vegetal
	Microrganismos de Solos
Curadorias de Recursos Genéticos de Adoçantes, Estimulantes, Condimentares e Corantes	Adoçantes e Estimulantes
	Condimentares e Corantes
Curadorias de Recursos Genéticos de Medicinais, Aromáticas e Biocidas	Medicinais e Aromáticas
	Biocidas
Curadorias de Recursos Genéticos de Cereais	Arroz
	Aveia, Centeio, Cevada, Trigo e Triticale
	Milho, Milheto e Sorgo
Curadorias de Recursos Genéticos de Espécies Florestais, Laticíferas e Palmeiras	Espécies Florestais Nativas da Caatinga
	Espécies Florestais Nativas da Floresta Amazônica
	Espécies Florestais Nativas do Cerrado / Pantanal
	Espécies Florestais Nativas da Mata Atlântica
	Espécies Florestais Exóticas
	Espécies Laticíferas
	Palmeiras
Curadorias de Recursos Genéticos de Fibrosas, Leguminosas e Oleaginosas	Amendoim
	Caupi, Fava, Feijão e Soja
	Colza, Gergilim, Girassol e Mamona
	Fibrosas
Curadorias de Recursos Genéticos de Forrageiras e Adubos Verdes	Gramíneas Forrageiras
	Leguminosas Forrageiras e Adubos Verdes
Curadorias de Recursos Genéticos de Fruteiras	Fruteiras Convencionais de Clima Temperado
	Fruteiras Convencionais de Clima Tropical
	Fruteiras não Convencionais
Curadorias de Recursos Genéticos de Hortaliças, Ornamentais, Raízes e Tubérculos	Hortaliças
	Hortaliças não Convencionais
	Ornamentais
	Raízes e Tubérculos

Fonte: Goedert & Wetzel (1999)

Os jardins botânicos e os arboretos são também importantes locais de conservação *ex situ* de germoplasma vegetal (Frankel & Soulé, 1981). Os citados jardins compõem áreas protegidas, herbários e coleções de plantas vivas onde se aliam os objetivos técnico-científicos de pesquisa e rotina de conservação e aqueles de educação ambiental e cultural. As coleções de plantas vivas são classificadas, identificadas, ordenadas e documentadas. No Brasil existem 40 Jardins Botânicos, para um universo de cerca de 1.700 ao nível mundial, que conservam principalmente

espécies medicinais, ornamentais e florestais. No País, os Jardins Botânicos estão incluídos na Rede Brasileira de Jardins Botânicos, criada em 1991, como ação incentivadora ao intercâmbio de plantas e conhecimentos técnico-científicos e coordenação de planos, programas e projetos em rede em relação às organizações conservacionistas ligadas ao tema. Arboretos são matas ou bosques compostos por espécies nativas e exóticas que são conservadas para efeito de produção de sementes e mudas, além de se constituir em infra-estrutura para fornecer suporte para ações de pesquisa e educação ambiental. No Brasil ainda são poucos os arboretos catalogados, apesar de também se constituírem em importantes bases físicas para a conservação e uso de germoplasma vegetal.

Outras importantes estruturas para a conservação *ex situ* de germoplasma são os próprios herbários, pois além de serem da maior importância para a classificação taxonômica das espécies, também encerram os materiais genéticos que podem ser perfeitamente usados em programas relacionados, principalmente no atual estágio de conhecimentos sobre o uso de ferramentas biotecnológicas. Ao nível mundial os herbários encerram mais de 2 bilhões de excicatas; no Brasil os mais de 115 herbários ativos conservam um apreciável acervo de mais de 4 milhões de espécimes vegetais.

No sentido de fortalecer o processo de conservação e uso de recursos fitogenéticos na América Latina e Caribe, o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) coordena cinco Redes assim distribuídas: PROCITRÓPICOS/TROPIGEN, PROCISUR/SUBPROGRAMA DE RECURSOS GENÉTICOS, PROCIANDINO/REDARFIT, MESOAMÉRICA/ REMERFI e CARIBE/CAPGERNet, sendo que o Brasil participa das redes ligadas ao PROCITRÓPICOS e PROCISUR. Além disso, está organizada na Amazônia brasileira a "Rede de Conservação e Uso de Recursos Genéticos Amazônicos – GENAMAZ", sob a coordenação da Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM), com prioridades para plantas medicinais, fruteiras e microrganismos, congregando um número superior a 20 instituições.

5. TIPOS DE CONSERVAÇÃO EX SITU

A prática da conservação de germoplasma vegetal *ex situ* teve sua fase embrionária há cerca de 10 mil anos, quando o homem pela primeira vez guardava sementes que lhe garantiriam uma nova safra, isto é, a prática da conservação *ex situ* coincide com a domesticação das espécies e o início da agricultura propriamente dita. Desde então, ano após ano, sementes e órgãos vegetativos têm sido cuidadosamente conservados a cada final de safra. No entanto, no princípio esta conservação era um ato instintivo de sobrevivência e durante milhares de anos não houve o cuidado de separar sementes e propágulos que bem representassem as plantas matrizes; eram até mesmo separados aqueles que por sua aparência não tinham valor. Numa fase mais recente, somente os representantes mais vigorosos por ocasião da colheita eram escolhidos para o próximo plantio. Esta seqüência seletiva foi que propiciou o surgimento dos recursos genéticos que serviram de base à agricultura de nossos dias.

A conservação de germoplasma hoje tem seus princípios bem definidos graças à iniciativa da FAO que na década de 70, com o apoio de cientistas do mundo todo, definiu regras e prioridades para a conservação de germoplasma. Na época surgiram

em vários países os primeiros centros de conservação de germoplasma. O governo brasileiro, sensibilizado com a causa, em 1974, criou em Brasília o Cenargen, um centro de pesquisa com a missão de pesquisar, conservar e promover a utilização dos recursos genéticos de importância para o país.

A conservação *ex situ* de germoplasma pode ser definida como aquela em que o germoplasma é conservado fora de seu ambiente natural, por estar sofrendo pressões que podem levá-lo à extinção ou para estar mais facilmente disponível. Na medida do possível esta conservação é feita sob condições de armazenamento que propiciem o aumento do período de sobrevivência e garantam a estabilidade genética do material conservado.

A necessidade da conservação *ex situ* geralmente é motivada pela ação antrópica. O fator mais ameaçador à conservação da diversidade das espécies cultivadas é a introdução de cultivares novas, geralmente de alta produtividade, em substituição às variedades tradicionais, as quais são importantes fontes de genes pelo elevado poder adaptativo que apresentam para os diversos fatores de estresses ambientais, bióticos e abióticos, existentes nos locais onde eram cultivadas. Outro fator importante é a destruição do habitat natural, como o que tem ocorrido com as florestas tropicais, cerrado, mangues e outros biomas hoje em processo de degradação, onde ocorrem espécies de uso atual (via extrativismo) e potencial, além de parentes silvestres de espécies cultivadas. Este processo de perda da variabilidade é conhecido como erosão genética. Além dos fatores já citados, vários outros podem levar à erosão genética, como pode ser observado na Tabela 4, publicada originalmente em relatório da Comissão de Recursos Genéticos para Alimentação e Agricultura (FAO, 1998).

As primeiras coleções *ex situ* foram desenvolvidas nos jardins botânicos, e no caso da Europa estas datam da Idade Média. Poucos sobreviventes existem daquela época em que os exploradores europeus coletavam espécimes em terras recém-conquistadas e levavam para suas coleções de plantas exóticas. Deve-se ressaltar que o valor de tais coleções é mais histórico que científico, pois inicialmente não visavam

TABELA 4. Principais causas da erosão genética segundo relatório da FAO (1998).

Causas	Número de Países
Expansão da fronteira agrícola*	61
Pressão populacional**	46
Degradação do ambiente	33
Políticas governamentais	22
Pragas / Plantas daninhas / Doenças	9
Conflitos civis	6
Extrativismo desenfreado das espécies	52
Redução no tempo de pousio***	6
Pastoreio excessivo	32
Substituição de variedades locais	81
Mudança do sistema agrícola	18

* Incluindo desmatamento e queimadas.
** Incluindo urbanização.
*** Citado em casos de agricultura itinerante.

a conservação genética, mas sim coleções de indivíduos que representassem um pouco da flora exótica de regiões recém-descobertas. Atualmente 698 dos 1.700 jardins botânicos do mundo praticam a conservação *ex situ* de germoplasma, desempenhando papel importante, especialmente na conservação de coleções de plantas de pouco interesse agronômico atual, envolvendo espécies de uso medicinal, ornamental, florestal e parentes silvestres de plantas cultivadas, além de germoplasma de interesse local (Heywood, 1990; 1993; FAO, 1998).

A conservação *ex situ* pode ser usada tanto para espécies cultivadas como para silvestres e pode ser feita das maneiras já referidas, as quais dependem em primeira instância de características reprodutivas específicas do germoplasma que se deseja conservar. Outros fatores também importantes são os objetivos da coleção, como o tempo que se pretende conservar e disponibilidade de recursos físicos e financeiros. Hoje se somam no mundo cerca de 6 milhões de acessos sendo conservados *ex situ* na forma de sementes desidratadas, embriões e meristemas criopreservados, plântulas *in vitro* e plantas inteiras em coleções de campo (FAO, 1998). No Brasil a estimativa é de 200 mil acessos de germoplasma vegetal, sendo conservados a médio ou longo prazo, distribuídos por todo o território nacional, especialmente em centros da Embrapa, universidades e institutos de pesquisa.

Com relação aos objetivos, uma coleção pode ser usada para conservar o germoplasma a longo ou a médio prazo, para distribuição e pesquisa, em coleções de base e ativa. Recomenda-se que as coleções ativas tenham, sempre que possível, uma duplicação conservada a longo prazo, pois estão sujeitas a perdas por ataques de pragas, doenças, fatores edafoclimáticos, roubo e perdas de identificação.

Basicamente existem três formas de conservação *ex situ*, que dependem de características reprodutivas do germoplasma que se quer conservar:

a) conservação de sementes, indicada para conservar espécies que produzem sementes ortodoxas e são propagadas sexualmente;
b) conservação *in vitro*, para plantas de propagação vegetativa e/ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias;
c) conservação no campo, para espécies produtoras de sementes recalcitrantes ou intermediárias, de propagação vegetativa ou perenes.

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação de germoplasma vegetal, não só por sua simplicidade e eficácia, mas especialmente porque a maioria das espécies usadas na agricultura moderna produz sementes que na sua maturação podem ter o conteúdo de água reduzido até 4% a 6% e desta forma se conservam por longos períodos em baixas temperaturas; tais sementes são chamadas ortodoxas. A temperatura mais indicada na conservação a longo prazo de sementes ortodoxas varia de -18°C a -20°C (Hanson, 1985; Faiad *et al*, 1998). Testes de germinação são realizados para determinar o poder germinativo (PG) inicial das amostras, o qual deve estar acima de 85% para a maioria das espécies. Mesmo em condições ideais de armazenamento, as sementes podem sofrer uma redução no PG ao longo do tempo, portanto deve ser realizado um monitoramento periódico do germoplasma ao longo dos anos. Quando esta redução se aproxima de 85% do PG inicial, o acesso deve ser regenerado, pois a perda da viabilidade das sementes pode levar a uma erosão genética no próprio banco de germoplasma.

Estima-se que entre 2 a 3 milhões dos 6 milhões acessos do germoplasma vegetal conservados *ex situ*, estejam sendo mantidos em Coleções de Base na forma de sementes ortodoxas. É importante lembrar que este total inclui duplicações, tanto entre coleções como dentro das mesmas, reduzindo este número para cerca de 2 milhões de acessos únicos (FAO, 1998). Não é conhecido ao certo qual o número de duplicações de acessos existente nas coleções de germoplasma. No entanto, duplicações propositais das coleções são de grande importância na conservação *ex situ*, pois proporcionam maior segurança contra riscos que possam levar à erosão genética. Quanto mais riscos apresenta a forma de conservação, maior necessidade de duplicações da coleção. Coleções inteiras ou partes delas devem ser conservadas em outro local no próprio país ou mesmo em outro. O mais importante é que haja infra-estrutura adequada. Um exemplo é a coleção mundial de batata (*Solanum tuberosum*) que tem uma parte duplicada *in vitro* na Alemanha e outra no Equador, enquanto a coleção completa é mantida no Peru que é o centro de origem e domesticação da espécie; na forma de sementes em câmaras e clones *in vitro* a 6°C em Lima e em Huancayo no campo, onde é replantada anualmente.

No Brasil, sementes de cerca de 400 espécies de forrageiras, cereais, olerícolas, florestais, oleaginosas, fibrosas, corantes, especiarias, medicinais e outras vêm sendo conservadas a longo prazo em câmaras à -20°C, em Brasília, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), totalizando aproximadamente 76.000 acessos de germoplasma semente.

A conservação a médio prazo de sementes ortodoxas é feita preferencialmente em temperaturas baixas, não sendo, necessariamente, abaixo de zero. Mesmo quando conservadas em câmaras com temperatura reduzida (5°C), devem ser monitoradas periodicamente, sendo regeneradas sempre que o PG baixar, evitando a deterioração do acesso.

A conservação *in vitro* é indicada para espécies com sementes recalcitrantes, tais como as da seringueira (*Hevea* spp.) e do cacau (*Theobroma cacao*) que perdem a viabilidade rapidamente e não suportam desidratação e/ou conservação em temperaturas subzero; espécies de propagação vegetativa, como a banana (*Musa* spp.) e o morango (*Fragaria* sp.) e mesmo para as espécies que apesar de produzirem sementes ortodoxas, são propagadas tradicionalmente por via vegetativa (clonagem) para que mantenham características desejáveis que poderiam desaparecer com a segregação na propagação via semente sexual, como a mandioca (*Manihot esculenta*), batata (*Solanum tuberosum*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*).

Levando-se em consideração a estabilidade genética, os explantes mais indicados na conservação *in vitro* são meristemas ou ápices e embriões zigóticos ou sementes inteiras no caso destas serem de tamanho bastante reduzido como as de orquídeas (CIAT, 1986; Scowcroft, 1984). Os acessos são conservados de forma asséptica em recipientes herméticos apropriados, sob cultivo em meio nutritivo, em condições que reduzam o crescimento, possibilitando o máximo de intervalo sem que haja necessidade de subcultivos em meios nutritivos recém-preparados.

Algumas técnicas têm sido desenvolvidas para que esta redução de tempo entre subcultivos das coleções *in vitro* aconteça: alteração do meio nutritivo pela omissão ou redução de fatores essenciais ao crescimento das plântulas e pela introdução

de retardantes de crescimento como ácido abscísico, manitol, sorbitol ou alteração física do ambiente como redução de temperatura, diminuição da intensidade luminosa, redução no suprimento de oxigênio pela submersão em óleo mineral, silicone líquido ou meio de cultura líquido (Goes, 1993; Mendes & Goes, 1996; Ashmore, 1997; Engelmann, 1997). O uso de duas ou mais técnicas integradas também tem dado bons resultados.

A conservação *in vitro* sob cultivo mínimo é considerada como Coleção Ativa por conservar o germoplasma em desenvolvimento (IBPGRI, 1986). Sendo a forma rotineira de conservação deste tipo de germoplasma, é amplamente usada em todo o mundo desde meados da década de 70. Segundo o relatório da FAO (1998), mais de mil espécies vêm sendo conservadas sob crescimento mínimo nos últimos 15 anos, porém esta não é a maneira ideal de conservação pelo fato de ser necessário um grande número de subcultivos ao longo do período de conservação, expondo o germoplasma a riscos de seleção, contaminação, perda de identificação e perda da estabilidade genética, além do fato de ser uma técnica dispendiosa tanto na instalação como manutenção, pois requer equipamentos e mão-de-obra especializada e demanda grande consumo de energia elétrica. Estima-se que apenas 38 mil acessos são conservados *in vitro* em todo o mundo (FAO, 1998).

Uma coleção de germoplasma conservada em nitrogênio líquido é considerada como Coleção de Base, pois nestas condições as atividades metabólicas e divisões celulares do explante são reduzidas a zero, mantendo-o teoricamente por período indefinido, sem que seja necessária manipulação do mesmo e garantindo a estabilidade genética e a segurança do germoplasma. A criopreservação em nitrogênio líquido é a forma ideal de conservação de germoplasma de espécies que não produzem sementes ortodoxas. Hoje mais de 80 espécies já foram congeladas com algum sucesso em nitrogênio liquido (-196°C) ou vapor (entre -154°C e -196°C). Apesar dos resultados de pesquisa, apenas *Rubus* spp., *Pyrus* spp., *Solanum tuberosum* e *Elaeis* spp. têm uma rotina de criopreservacão já definida.

O custo desse tipo de conservação é menor que o da conservação sob crescimento mínimo, pois, apesar de usar os mesmos equipamentos da cultura de tecidos para a manipulação do explante antes do congelamento e na regeneração da planta após a conservação, dispensa o uso de energia elétrica e os subcultivos que são bastante dispendiosos ao longo dos anos. Uma vez determinada a rotina, o custo da criopreservação depende basicamente do suprimento de nitrogênio líquido para a manutenção do nível dos botijões. No caso de sementes recalcitrantes é ainda mais barato, pois estas não requerem o uso de equipamentos para cultivo. Stanwood *et al.* (1986) relataram que o custo médio da conservação convencional de uma amostra de sementes de cebola por um período acima de 100 anos é estimado em US$1,65/ano e pode ser reduzido para US$0,42/ano usando técnicas de criopreservação. A técnica é recomendada também para sementes ortodoxas, tornando a conservação mais segura e menos dispendiosa.

Ainda não existe uma rotina generalizada de criopreservação de germoplasma, pois poucos são os materiais biológicos que suportam temperaturas abaixo de zero em seu estado natural, sendo necessária a adição de produtos químicos de ação crioprotetora ou um condicionamento prévio que proporcione maior resistência ao

explante (Goes & Mendes, 1996). Pesquisas em criopreservação vêm sendo feitas em todo o mundo, sendo que na última década foram desenvolvidos protocolos cuja aplicação têm sido testada com sucesso para um grande número de espécies. A vitrificação é uma destas técnicas e consiste em usar uma solução crioprotetora altamente concentrada de compostos osmoticamente ativos, como o PVS2, que tem sido a mais usada atualmente e contém 30% de DMSO, 15% de glicerol e 15% de etileno glicol (Towill & Jarret, 1992); tal solução impede que haja cristalização da água no congelamento, ocorrendo uma vitrificação, evitando assim a ruptura de membrana pelos cristais. Os maiores problemas desta técnica são o alto grau de toxidez das soluções crioprotetoras e a possibilidade de ocorrer recristalização durante o descongelamento, o que causa injúrias no explante.

Outra técnica, que tem sido aplicada com sucesso para várias espécies, é a encapsulação e desidratação, onde o explante é encapsulado como nas sementes sintéticas (artificiais), em meio de cultura contendo Alginato de Sódio. Estas cápsulas são desidratadas em câmara de fluxo laminar ou dessecador antes do congelamento ou através do crescimento prévio em meios adicionados de compostos de efeito osmótico como açúcares e polióis.

A regeneração do explante é um dos pontos dos mais cruciais no sucesso da criopreservação, independente da técnica usada no congelamento. Com exceção das sementes as quais geralmente dispensam crioprotetores e técnicas especiais de regeneração, a criopreservação depende da cultura de tecidos, e portanto, só pode ser praticada quando se dispõe de laboratório adequado. A criopreservação tende a se tornar cada vez mais freqüente na conservação dos recursos genéticos vegetais, entretanto esta alternativa não substitui as metodologias *ex situ* convencionais (Engelmann, 1999).

Coleções de campo são usadas na conservação de espécies de propagação vegetativa, espécies que produzem sementes recalcitrantes e espécies arbóreas, além daquelas que produzem quantidades reduzidas de sementes como as forrageiras. São indicadas preferencialmente na conservação de espécies perenes, pois coleções de campo de plantas anuais podem ser mais caras, especialmente em países com menor disponibilidade de terras de uso agrícola e de invernos rigorosos; além do que os riscos de perda são maiores no campo. As coleções de campo devem ser localizadas em áreas geográfica e ambientalmente semelhantes àquelas de origem do germoplasma, no caso de coleções de espécies de grande abrangência territorial, envolvendo vários ecossistemas, recomendando-se que sejam feitas coleções regionais, como é feito com a mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil, que tem quatro coleções regionais, na Amazônia, Bahia, Brasília e Santa Catarina, garantindo a boa sobrevivência do germoplasma sem impor pressões além daquelas naturais.

Coleções de campo geralmente são duplicatas de coleções *in vitro*, usadas na caracterização e avaliação. Estima-se que cerca de 527 mil acessos de germoplasma são conservados em coleções de campo hoje no mundo.

Coleções de trabalho tanto podem ser mantidas em campo como em câmaras. Elas contêm geralmente espécies e acessos de interesse do melhorista e devem estar caracterizadas e avaliadas para que possam ser incluídas em programas de melhoramento.

Coleções dinâmicas são um tipo especial de coleção de campo em que várias espécies silvestres, parentes de uma espécie cultivada, são conservadas em uma só área, não só assegurando sua sobrevivência mas especialmente possibilitando sua co-evolução ao lado de outras espécies do mesmo gênero, facilitando estudos filogenéticos e o controle da produção de sementes (Second *et al.*, 1997; Second, 1998).

Muitas são as vantagens da conservação *ex situ,* com destaque para as seguintes: mantém o material em um espaço pequeno sob cuidado intensivo facilitando a aquisição pelos usuários do sistema, garante a sobrevivência de germoplasma que foi substituído, dá grande segurança ao germoplasma, independe da ação antrópica, evita erosão genética e disponibiliza a diversidade máxima do germoplasma. Além disso, o fato de reunir muitos acessos em um só local, facilita a caracterização/avaliação nas coleções de campo e nas coleções *in vitro* mantêm material indexado e livre de patógenos dispensando a quarentena na sua entrada ou saída do país ou da região. No entanto, dependendo da forma de conservação, existem algumas desvantagens como a interrupção da evolução quando são usadas técnicas que reduzem drasticamente as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; o risco de instabilidade genética nas coleções de sementes ortodoxas e *in vitro*; o alto custo de algumas técnicas como a regeneração no campo de coleções de sementes ortodoxas ou aquelas que requerem mão-de-obra especializada; o alto consumo de eletricidade e equipamentos sofisticados ou o uso de grandes áreas de campo de boa fertilidade por longos períodos. Outras desvantagens são a deriva genética (perda aleatória de genes devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas) e pressão de seleção (material geralmente é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distintas do seu local de coleta). De acordo com Esquinas-Alcázar (1993) ambos os fenômenos, deriva genética e pressão de seleção, produzem uma erosão genética cumulativa, a qual pode em certos casos exceder a erosão genética verificada atualmente no próprio ambiente.

Com o avanço das técnicas do DNA recombinante as barreiras entre as espécies estão sendo quebradas e a possibilidade de transferência de genes tem despertado muito interesse nos pesquisadores. Desta forma, é possível pensar em bibliotecas de DNA, as quais conservariam genes de interesse para os programas de melhoramento (Ford-Lloyd & Jackson, 1986; Peacock, 1989; Rao & Riley, 1994; Adams, 1997). Uma grande vantagem na conservação de DNA é a facilidade com que este material pode ser mantido por tempo indeterminado, sem sofisticação nenhuma e com total garantia da estabilidade.

Hawtin *et al.* (1996) apontaram diversas questões que precisam ser melhor compreendidas na conservação *ex situ*: a) melhor entendimento da relação entre umidade da semente e longevidade, especialmente em níveis de umidade da semente muito reduzidos; b) desenvolver métodos de secagem de sementes de menor custo; c) definir melhor os protocolos para crescimento mínimo de tecidos *in vitro* e para tecidos criopreservados de uma ampla gama de espécies e genótipos; d) desenvolver e aprimorar técnicas de manejo para bancos de germoplasma de campo.

A conservação *ex situ* tem sido recomendada como duplicação de coleções *in situ,* trazendo maior segurança especialmente em áreas com riscos da ação antrópica e de catástrofes como vulcões, terremotos e furacões.

6. UTILIZAÇÃO DO GERMOPLASMA CONSERVADO

De maneira geral, o nível de utilização do germoplasma conservado ao nível mundial ainda é bastante baixo, não chegando a 5%. Isso faz com que consistentes ações e esforços sejam desenvolvidos no sentido de estimular o uso dos acessos estocados, pois apesar da preciosidade genotípica do material conservado é bastante alto o custo operacional de mantê-lo sem a devida utilização. Os principais usuários do germoplasma com grande dimensão de variabilidade genética são os melhoristas, que no entanto preferem usar as suas próprias coleções de trabalho, ou de outros especialistas (Nass *et al.*, 1993), muitas das vezes com reduzida variabilidade, desconhecendo as outras modalidades de bancos e coleções de germoplasma que geralmente têm amplas condições de proporcionar bons ganhos genéticos aos programas e cultivares modernas.

No entanto, para a condução ao incremento do uso do germoplasma conservado têm-se notado a enorme necessidade de serem incentivadas e desenvolvidas em maior escala as atividades de caracterização, avaliação, documentação e informação, bem como a produção e disponibilidade de amostras de modo a atender de imediato as necessidades dos programas, especialmente de melhoramento genético. De fato, conforme salientou Vilela-Morales (1999) os níveis de utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético somente deverão aumentar, se além das informações de passaporte e outras de controle burocrático, o material genético disponibilizado apresentar níveis expressivos de informações genéticas e utilitárias, relacionadas com adaptação ambiental, potencial genético, conhecimento etnobiológico, potencial industrial e potencial socioeconômico.

Para serem utilizadas pelos melhoristas as fontes de diversidade genética devem incluir alelos úteis não presentes nas populações elites. Os programas de melhoramento das culturas de maior importância econômica incluem apenas uma pequena porcentagem do germoplasma disponível para cada espécie (Brown, 1983). No caso do milho, por exemplo, a espécie vegetal melhor estudada geneticamente, das cerca de 300 raças conhecidas no Hemisfério Ocidental apenas 5% já foram devidamente exploradas pelo melhoramento (Goodman, 1990).

Dentre as inúmeras razões para o uso limitado do germoplasma disponível nos bancos, a falta de dados de avaliação parece ser um dos mais críticos. Nesse particular, os programas de pré-melhoramento (*pre-breeding*) assumem um papel estratégico, atuando como elo de ligação entre os recursos genéticos e o melhoramento de plantas (Nass, 1999; Nass & Paterniani, 2000). Até esses acessos serem avaliados *per se* e em cruzamentos eles continuarão de limitado valor para os melhoristas.

O *screening* de coleções muito grandes para características específicas pode ser muito caro e lento. Nesse sentido o estabelecimento de coleções nucleares (*core collections*) tem sido sugerido para facilitar o uso dos recursos genéticos vegetais (Brown, 1989; Hodgkin *et al.*, 1995).Caracteres adaptativos específicos podem auxiliar na estratificação dessas coleções (Hawtin *et al.*, 1996).

O melhoramento de plantas depende basicamente de quatro fontes principais de diversidade: parentes silvestres, mutações, raças locais e cultivares modernas. Dessas opções, a variabilidade menos explorada até o momento é a existente entre as raças locais (Hawtin *et al.*, 1996). Análises envolvendo isoenzimas e dados moleculares

evidenciam que as raças locais e os parentes silvestres das plantas cultivadas são os principais portadores de reservas de diversidade genética entre os *gene pools* (Miller & Tanksley, 1990).

O germoplasma caracterizado e avaliado para características de interesse torna-se atrativo para os melhoristas na busca por novas combinações genotípicas. Nesse contexto, a avaliação, a documentação e os programas de pré-melhoramento são fundamentais para aumentar a utilização do germoplasma não melhorado (Chang, 1992). Caso os bancos de germoplasma não consigam manter seus acessos caracterizados, avaliados e com valor agregado oferecido pelo potencial de uso, certamente sua conservação despertará pouco interesse entre os melhoristas e, mais grave ainda, não sensibilizando os executivos que controlam os orçamentos destinados à pesquisa, quanto à importância dos recursos genéticos vegetais. Nos países em desenvolvimento este fato é comumente observado, pois os recursos genéticos continuam a constituir atividades estratégicas, mas com respaldo de segunda categoria (Vilela-Morales, 1999).

Cooper *et al.* (1998) enfatizaram que o Plano Global de Ação para Recursos Genéticos coordenado pela FAO tem por objetivo fortalecer a ligação entre conservação e utilização, disponibilizando melhor a informação, manejando mais eficientemente os acessos disponíveis, priorizando um contato mais estreito entre conservacionistas e melhoristas, principalmente via programas nacionais de recursos genéticos vegetais e também por maiores investimentos em programas de pré-melhoramento.

As tendências atuais de incentivo e de imprimir velocidade na criação de novas cultivares respaldado pelas leis de propriedade intelectual e pela relativa curta vida útil dos genótipos considerados elites, vão conduzir a que os melhoristas voltem as suas atenções, ações e esforços para o uso dos bancos de germoplasma em maior escala, até mesmo com o bom proveito das modernas tecnologias disponíveis de manejo do germoplasma conservado, visando a consistente disponibilização das informações e amostras para pronta utilização. Para isso é primordial a integração e complementação de atividades, o fortalecimento das rotinas quanto ao correto manuseio dos acessos, além do direcionamento das ações e esforços de pesquisa e validação para instruir e proporcionar a real utilização do germoplasma conservado. A formação de coleções nucleares, bem como o desenvolvimento de programas de pré-melhoramento são ações decisivas para a obtenção de bons ganhos genéticos em menor espaço de tempo e com menor custo operacional, principalmente diante da variabilidade genética disponível e das modernas tecnologias alternativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Conservation of DNA: DNA banking. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. (Ed.) **Biotechnology and plant genetic resources**: conservation and use. Wallingford: CAB International, 1997. p.163-174.

ALTHOFF, M.A. **Viabilidade de sementes de mamão criopreservadas**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 4p. (Pesquisa em Andamento, 17).

ASHMORE, S.E. **Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 67p.

BENNETT, E. Tactics of plant exploration. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) **Genetic resources in plants.** Oxford: Blackwell, 1970. p.157-179.

BERJAK, P.; DUMET, D. Cryopreservation of seeds and isolated embryonic axes of neem (*Azadirachta indica*). **Cryo-Letters**, v.17, p.99-104, 1996.

BERTHAUD, J. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. **Euphytica**, v.96, p.1-12, 1997.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional em decorrência do que dispõe o artigo 26 da Convenção sobre Diversidade Biológica**; Brasil. Brasília, 1998. 283p.

BREESE, E.L. **Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks:** the scientific background. Rome: International Board for Plant Genetic Resources,1989. 69p.

BROWN, A.D.H. The case for core collections. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.136-156.

BROWN, W.L. Genetic diversity and genetic vulnerability: an appraisal. **Economic Botany**, v.37, p.4-12, 1983.

CHANG, T.T. Germplasm enhancement and utilisation. **Iowa State Journal of Research**, v.54, p.349-364, 1985.

CHANG, T.T. Availability of plant germplasm for use in crop improvement. In: STALKER, H.T.; MURPHY, J.P. (Ed.) **Plant breeding in the 1990s**. Melksham: Redwood Press, 1992. p.17-35.

CIAT. **Biotechnology Research Unit:** annual report. Cali: International Centre of Tropical Agriculture, 1986. 67p.

COOPER, H.D.; SPILLANE, C.; KERMALI, I.; ANISHETY, N.M. Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.114, p.1-8, 1998.

CORADIN, L. **Coleta de germoplasma**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1990. 26 p.

COSTA, I.R.S. Documentação e informatização de recursos genéticos. In: MARIANTE, A.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Ed.) SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

COSTA, I.R.S.; VILELA-MORALES, E.A. Cassava genetic resources in South America. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1., Rome, 1994. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1994. p.16-20.

CREECH, J.L. Tactics of exploration and collection. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) **Genetic resources in plants.** Oxford: Blackwell, 1970. p.221-229.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, J.L. ; HAMON, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **Cryo-Letters**, v.18, p.269-276, 1997.

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, J.L. ; HAMON, S. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica, C. costatifructa, C. racemosa and C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, v.8, p.9-15, 1998.

EIRA, M. T. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevidéu: IICA; Procisur, 1996. p.119-122.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior. II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Biology**, v.42, p.653-657, 1991.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Relatório anual:** 1997. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 157p. (Documentos, 29).

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Relatório anual:** 1998. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1999. 204p. (Documentos, 38).

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD B.V.; NEWBURY, H.J. (Ed.) **Biotechnology and plant genetic resources:** conservation and use. United Kingdom: Wallingford, 1997. p.119-161.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant genetic resources. In: MARIANTE, A.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Ed.) SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

ESQUINAS-ALCÁZAR, J.T. Plant genetic resources. In: HAYWARD, M.D.; BOSEMARK, N.O.; RAMAGOSA, I. **Plant breeding:** principles and prospects. London: Chapman & Hall, 1993. p.33-51.

FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; FERREIRA, F.R.; GONDIM, M.T.P.; WETZEL, M.M.V.S.; MENDES, R.A.; GOES, M. DE; MIRANDA, A.R. **Manual de procedimentos para conservação de germoplasma semente a longo prazo na Embrapa**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 21p. (Documentos, 30).

FAO. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture.** Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1998. 510p.

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. **Plant genetic resources**: an introduction to their conservation and use. Moulton: Castlefield Press, 1986. 146p.

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.E. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.D.H.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 299p.

GOODMAN, M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving. **Journal of Heredity**, v.81, p.11-16, 1990.

GOEDERT, C.O.; WETZEL, M.M.V.S. Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 9p. /CD-ROM/

GOES, M. de. Studies on the conservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] germplasm. Bath: University of Bath, 1993. 169p.Thesis (Ph.D)

GOES, M. de; MENDES, R.A. Conservação de germoplasma vegetal *in vitro*-criopreservação. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevidéu: IICA/Procisur, 1996. p.139-142.

GREENE, S.L.; GUARINO, L. (Ed.) **Linking genetic resources and geography**: emerging strategies for conserving and using crop biodiversity. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1999. (Special Publication, 27)

GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Ed.) **Collecting plant genetic diversity**. Wallingford: CAB International, 1995. 748p.

GUARINO, L.; LIBREROS, D.; ASTORGA, C. Enrichment of plant genetic resouces collections in Latin America and the Caribbean through germplasm collecting: history and prospects. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 12p. /CD-ROM/

HANSON, J. **Procedures for handling seeds in gene banks**: practical manuals for gene banks. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1985. n.1, 115p.

HARLAN, J.R.; de WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, v.20, p.509-517, 1971.

HAWTIN, G.; IWANAGA, M.; HODGKIN, T. Genetic resources in breeding for adaptation. **Euphytica**, v.92, p.255-266, 1996.

HEYWOOD, V.H. Jardins Botânicos e conservação de recursos genéticos vegetais. In: UNESCO. **Como gerir os nossos recursos genéticos**. Mitra-Sintra: Publicações Europa-América, 1990. 11p.

HEYWOOD, V. H. Broadening the basis of plant resources conservation. In: GUSTALFSON, J. P. (Ed.) **Gene conservation and exploitation**. New York: Plenum Press, 1993. 28p.

HODGKIN, T.; BROWN, A.D.H.; van HINTUM, T.J.L.; VILELA-MORALES, E.A (Ed.) **Core collections and plant genetic resources**. London: Jonh Wiley & Sons, 1995. p.253-259: Future directions.

IBPGR. **Design, planning and organization of *in vitro* genebanks**: report of a subcommittee of the IBPGR Advisory Committee on in vitro storage. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1986. 17p.

IBPGR. **Elsevier's dictionary of plant genetic resources**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 187p.

KHOSHOO, T.N. Biodiversity in the developing countries. In: di CASTRI, F.; YOUNÈS, T. (Ed.) **Biodiversity, science and development**: towards a new partnership. Wallingford: CAB International; International Union of Biological Sciences, 1996. p.304-311.

LLERAS, E. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV, 1988. p.23-42.

MARSHALL, D.R.; BROWN, A.D.H. Optimum sample strategies in genetic conservation. In: FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. (Ed.) **Plant genetic resourses for today and tomorrow**. London: Cambridge University Press, 1975. p.53-80.

MENDES, R.A.; GOES, M. de. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA/Procisur, 1996. p.129-138.

MILLER, J.S.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.437-448, 1990.

NASS, L.L. Pré-melhoramento em milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/

NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, p.581-587, 2000.

NASS, L.L.; PELLICANO, I.J.; VALOIS, A.C.C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v.16, p.983-988, 1993.

NORMAH, M.N. Seed storage and cryoexposure behavior in hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Barcelona). **Cryo-Letters**, v.15, p.315-322, 1994.

PEACOCK, W.J. Molecular biology and genetic resources. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.363-376.

RAO, V.R.; RILEY, K.W. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.97, p.3-20, 1994.

RITSCHEL, P.S.; THOMAZELLI, L.F.; HUAMAN, Z. Caracterização morfológica de germoplasma de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v.16, 1998.

SCOWCROFT, W.R. **Genetic variability in tissue culture:** impact on the germplasm conservation and utilization. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1984. 41p.

SECOND, G.; ALLEM, A C.; EMPERAIRE, L.; INGRAM, C.; COLOMBO, C.; MENDES, R.A. ; CARVALHO, L.J.C.B. AFLP based *Manihot* and cassava numerical taxonomy and genetic structure analysis in progress: implications for dynamic conservation and genetic mapping. **African Journal of Root and Tuber Crop**, v.2, p.140-147, 1997.

SECOND, G. *Manihot glaziovii*, an example for a proposed dynamic conservation of cassava genetic resources. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.17, p.18, 1998. Suplemento.

STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E.; TOWIL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm: pilot research project. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.65, p.18-19, 1986.

TOWILL, L.E.; JARRET, R.L. Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] shoot tips by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.11, p.175-178, 1992.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Convention on biological diversity**. s.l., 1992. 24p.

VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1986. 15p. (Boletim de Pesquisa, 1).

VILELA-MORALES, E.A.; Documentação e informática de recursos genéticos. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAV, 1988. p.135-147.

VILELA-MORALES, E.A. Princípios genéticos da informação para recursos genéticos vegetais. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 8p. /CD-ROM/

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CENARGEN, 1997. 78p.

WETZEL, M.M.V.S.; BUSTAMENTE, P.G. (Org). **Diretório de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 140p.

7

CONSERVAÇÃO *IN SITU* DE ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS

PAULO KAGEYAMA[1]
FLÁVIO B. GANDARA[2]
ROLAND VENCOVSKY[3]

[1]Depto. de Ciências Florestais - USP/ESALQ, C.P. 9 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.
[2]Depto. de Ciências Biológicas - USP/ESALQ.
[3]Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.

1. INTRODUÇÃO

A conservação *in situ* de recursos genéticos tem sido considerada a forma mais efetiva, principalmente para os casos em que toda uma comunidade de espécies está sendo o objetivo da conservação, como por exemplo os de programas com espécies florestais tropicais. Nesse caso, não só as espécies alvo, que têm valor econômico atual, como também aquelas de valor potencial, estão incluídas no programa de conservação genética, inclusive também os seus polinizadores, dispersores de sementes e predadores. É importante ressaltar que no caso da conservação *in situ*, muito embora isso seja óbvio, é necessário que se conheça geneticamente as espécies em conservação, não bastando que só se mantenha intocada a área onde as espécies em conservação estão vegetando, ou a conservação da natureza.

As florestas tropicais formam, sem dúvida, os biomas com maior diversidade de espécies do planeta, tendo sido o alvo da discussão para a conservação *in situ*, e objeto de um acordo mundial assinado por cerca de 170 países na Rio-92, ou a Convenção da Diversidade Biológica (United Nations Environment Programme, 1994). Para o Brasil, que possui dois biomas florestais tropicais de suma importância, a Amazônia e a Mata Atlântica, a discussão sobre a conservação genética *in situ* é de importância estratégica, justamente neste momento em que a grande evolução do conhecimento da biotecnologia de ponta coloca em evidência a biodiversidade como uma das mais valiosas matérias-primas no mundo em termos econômicos, principalmente para a indústria farmacêutica e química fina.

Por outro lado, a Amazônia, com cerca de 4 milhões de km^2 de área de floresta tropical, onde em torno de 87,5% desta ainda permanecem intactos, tem muita diferença com a Mata Atlântica, em que temos somente cerca de 7% de florestas tidas como primárias, dos cerca de 1 milhão de km^2 outrora existentes (Brasil, 1998). Essas cifras nos coloca numa situação de muita responsabilidade em termos de conservação *in situ* do pouco que ainda resta do bioma Atlântico e da imensa biodiversidade que temos na Amazônia. Por exemplo, a Mata Atlântica do Estado de São Paulo, muito embora tenha poucos remanescentes de florestas pouco perturbadas, mostra uma diversidade muito expressiva, com cerca de 2000 espécies arbóreas hoje identificadas, revelando uma necessidade urgente de preservação e conservação, assim como de restauração das áreas degradadas e com potencial de preservação.

A alta diversidade de espécies das florestas tropicais vem sendo enfatizada mais para as espécies arbóreas, já que estes tipos de organismos são os mais conhecidos botanicamente, por serem mais facilmente levantados e identificados. Porém, mesmo assim, ainda hoje vêm sendo identificadas espécies arbóreas novas na Mata Atlântica, sem contar a Amazônia onde ainda existe um número significativo de espécies a serem identificadas botanicamente. É muito freqüente em levantamentos fitossociológicos em parcelas de 1 hectare encontrar-se mais de 300 espécies arbóreas diferentes nessa pequena área (Oliveira, 1997). Esta alta diversidade de espécies

arbóreas das florestas tropicais está associada a uma alta freqüência de espécies denominadas raras, ou aquelas que ocorrem a uma muito baixa densidade de indivíduos na mata, e justamente sendo a maioria delas as menos conhecidas quanto às suas características ecológicas e, portanto, de difícil manejo e conservação (Kageyama & Gandara, 1994).

Na região do Vale do Itajaí em Santa Catarina, onde as espécies vegetais da Mata Atlântica foram intensivamente estudadas, Reis (1993) mostrou que o número de espécies arbóreas representava somente cerca de 35% das espécies vegetais, sendo os restantes 65% das espécies referentes às epífitas (31%), às herbáceas (14%), às lianas (11%), e às espécies arbustivas (9%). Para completar a evidência da alta diversidade de espécies da floresta tropical, Kricher (1997) aponta que, nesses ecossistemas tropicais, a diversidade de espécies de animais e microrganismos é estimada em cerca de 100 vezes em relação ao número de espécies vegetais. Assim, se consideramos um número de espécies vegetais em um dado hectare como sendo de 500, que é plenamente normal ocorrer, o número de espécies dos organismos animais e de microrganismos fica estimado em 50.000 nesse mesmo hectare. Dessa forma, torna-se impressionante e possível de ser entendida a cifra de que o número total de espécies estimado pode atingir um valor de 50 milhões ou até mais, com somente 1,5 milhões identificados taxonomicamente, ou somente 3% do total (World Conservation Monitoring Center, 1992).

Com esta diversidade de espécies tão imensurável das florestas tropicais, pode-se depreender que a grande diferença entre esses biomas e os de baixa diversidade nos climas temperados, é a grande interação entre as plantas e os animais e microrganismos. Assim, constata-se que a maioria das espécies arbóreas tropicais (97,5%) é polinizada por insetos, morcegos e beija-flores (Bawa *et al.*, 1985) e que nos ecossistemas tipicamente tropicais as sementes são também dispersas por animais frugívoros (Estrada & Fleming, 1986). Esta alta associação das espécies arbóreas com animais e microrganismos tem, sem dúvida, grande implicação com a conservação genética *in situ*, já que estes organismos associados devem também estar presentes e ser considerados nos programas de conservação.

Dessa forma, a conservação *in situ* das florestas tropicais deve ser considerada como uma conservação da biodiversidade, se julgarmos que nos ecossistemas naturais onde se dá esse tipo de conservação, não só as espécies alvo que estão sendo monitoradas são objeto da conservação, como também as outras espécies associadas a elas também recebem o mesmo tratamento. Como dissociar estes dois grupos de espécies na conservação é principalmente o que define as metodologias de conservação *in situ* que vêm sendo propostas pelos diversos autores.

2. ESTRUTURA GENÉTICA DE ESPÉCIES ARBÓREAS

Muitos autores têm mostrado como diversos fatores podem determinar a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais. Dois autores foram pioneiros nesta linha: Bawa (1974) mostrou que as espécies arbóreas tropicais apresentam predominantemente polinização cruzada e Hamrick (1983) descreveu que o fluxo gênico via pólen e sementes e o *status* sucessional são os fatores principais que determinam a estrutura genética de populações naturais.

Os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas tropicais foram iniciados na Malásia (Gan *et al.*, 1981) e tiveram um grande avanço nas florestas neotropicais do Panamá (Hamrick & Loveless, 1986), Costa Rica (Bawa & O'Malley, 1987), e Brasil (Harrit, 1991; Paiva, 1992).

Estudos relacionados à variação genética em populações naturais de espécies arbóreas tropicais requerem a utilização de técnicas de quantificação da diversidade genética, bem como uma adequada amostragem de espécies e populações. Para isso, é necessário um bom entendimento da ecologia desses ecossistemas. Em vista dessas dificuldades, foi apenas em meados da década de 80 que se estabeleceram linhas de estudo nesta área, iniciando-se o entendimento da estrutura complexa das populações das espécies arbóreas tropicais (Hamrick & Loveless, 1986; Bawa & O'Malley, 1987).

Avanços nas técnicas de quantificação da diversidade genética, inicialmente utilizando técnicas de genética quantitativa e estabelecendo testes de progênie e procedências (Kageyama, 1990), e mais tarde utilizando isoenzimas e polimorfismos de DNA, resultaram em um número razoável de estudos com espécies arbóreas tropicais (Gandara *et al.*, 1997; Grattapaglia *et al.*, 1998).

As espécies arbóreas da Mata Atlântica estudadas até o momento mostram alta diversidade genética e uma alta taxa de cruzamento – acima de 90% – ou são preferencialmente de polinização cruzada (Tabela 1).

3. ECOLOGIA DE POPULAÇÕES NATURAIS

Um problema real para os pesquisadores é como selecionar as espécies para estudo e conservação, quais são as informações necessárias e como aplicá-las em

TABELA 1. Estudos genéticos com espécies arbóreas da Mata Atlântica – Brasil e algumas características ecológicas relacionadas.

Espécie	Família	D*	N	N_i	P	A	H_o	H_e	t_m	Autor
Aspidosperma polyneuron	Apocynaceae	I	8	116	50.0	1.8-2,0	0,237-0,238	0,243-0,270	0,82-0,90a	Maltez (1997)
Bauhinia forficata	Caesalpiniaceae	I	4		100,0	3,8	0,451	0,503	0,98 (0,03)	Santos (1994)
Bowdichia virgilioides	Fabaceae	R	10	56	28.0	1,2	0,126	0,126	-	Herritt (1991)
Cariniana legalis	Lecythidaceae	I	10	92	30,0	1,42	0,140	0,140	-	Herritt (1991)
Chorisia speciosa	Bombacaceae	R	9	53	77,8	2,2	0,245	0,284	0,88 (0,09)	Souza (1997)
Cordia trichotoma	Boraginaceae	R	10	67	40,0	1,45	0,184	0,184	-	Herritt (1991)
Cryptocaria moschata	Lauraceae	I	20	214	85,0	2,0	0,323	0,351	0,87 (0,03)	Moraes (1998)
Genipa americana	Rubiaceae	C	8	342	50,0	1,63	0,195	0,182	0,82	Sebbenn (1997)
Johanesia princeps	Euphorbiaceae	I	10	60	27,0	1,45	0,141	0,141	-	Herritt (1991)
Myracrodruon urundeuva	Anacardiaceae	R	3	1020	66,7	2,8	0,140-0,160	0,358-0,243	0,34a	Moraes (1993)
Cedrela fissilis	Meliaceae	R	14	184	76.9	2,31	0,222	0,243	0,92	Gandara (1996)
Euterpe edulis	Arecaceae	C	7	1000	100,0	3,4	0,496	0,463	0,96	Reis (1996)

*D: densidade populacional (C: comum D>10 adultos/ha, I: intermediário 10>D>1 adulto/ha, R: raro D<1 adulto/ha); N: número de locos; N_i: tamanho da amostra; P: porcentagem de locos polimórficos; A: número médio de alelos por loco; H_o: heterozigosidade média observada; H_e: heterozigosidade média esperada; t_m: taxa de cruzamento multilocos (a taxa de cruzamento aparente),

programas de conservação genética. Em ecossistemas muito ricos em espécies, como as florestas tropicais, é fundamental ter uma boa compreensão do ecossistema como um todo a fim de levantar hipóteses corretas para coletar dados úteis de cada espécie. As espécies modelo, ou aquelas que representam guildas na comunidade, formam uma estratégia útil para selecionar poucas espécies para estudar e monitorar em programas de conservação.

As espécies da Mata Atlântica estão sendo estudadas seguindo esta estratégia de amostragem e podem representar alguns dos principais grupos detectados como importantes em florestas tropicais. As características consideradas nesses estudos estão baseadas na densidade populacional, polinização e dispersão de sementes e grupo sucessional (Tabela 1).

Vários artigos conjeturaram a existência de grupos de espécies com características e funções comuns, também chamados de guildas, os quais também devem apresentar estruturas genética e populacional semelhantes (Gandara *et al.*, 1997). Sugere-se, para estes fins, cinco grupos baseados em padrões ecológicos (*status* sucessional) e demográficos (densidade populacional), e respostas à perturbação antrópica. Estes grupos são:

Grupo 1: Espécies que são raras na floresta primária e que se tornam comuns em florestas secundárias após distúrbios antrópicos. São geralmente espécies secundárias na sucessão e emergentes ou do dossel.

Grupo 2: Espécies que são raras na floresta primária e que desaparecem em florestas secundárias. São espécies que necessitam do ambiente da floresta primária e são secundárias ou climácicas.

Grupo 3. Espécies especializadas em ambientes com características edáficas restritivas, como topo de morros, solos rasos ou encharcados. Estas espécies podem tornar-se comuns em florestas secundárias.

Grupo 4. Espécies pioneiras que ocorrem em clareiras grandes na floresta primária. São consideradas raras na floresta primária e ocorrem em alta densidade nos primeiros estágios da sucessão.

Grupo 5. Espécies tolerantes à sombra ou climácicas. São espécies comuns sob o dossel da floresta primária e têm diferentes comportamentos em florestas secundárias.

O trabalho está em monitorar os parâmetros demográficos (abundância, distribuição etária ou de tamanhos, mortalidade e taxa de crescimento) e genéticos (heterozigosidade esperada, taxa de cruzamento e autocorrelação espacial) das espécies modelo. Estes parâmetros são altamente dependentes das interações com outras espécies (polinização, dispersão de sementes, predação, competição etc.), e portanto, podem indicar a manutenção das interações de uma considerável parte da comunidade, se permanecerem estáveis. Assim, os dados obtidos de poucas espécies modelo podem ser extrapolados para boa parte da comunidade.

4. CONSERVAÇÃO *IN SITU* DE FLORESTAS TROPICAIS

A conservação genética *in situ* de uma espécie é a manutenção de amostras de populações da mesma em seu ecossistema natural, com condições de diversidade

genética que permitam o seu desenvolvimento, a manutenção de suas populações e a continuidade de evolução (Frankel *et al.*, 1995). Este tipo de conservação difere da *ex situ*, que mantém uma amostra representativa de uma ou mais populações de uma espécie em questão, em condições fora de seu habitat natural, tanto na forma de propágulos armazenados como de plantas vivas em arboretos ou coleções. Pode-se perceber que a conservação *in situ* se presta muito mais para programas: a) de longo prazo, ou muitas gerações; b) que envolvem um conjunto de muitas espécies e populações; c) que englobam também espécies de valor potencial; d) que incluem espécies com sementes recalcitrantes ou de difícil cultivo.

Para as espécies arbóreas tropicais, por serem de ciclo de vida muito longo, pode-se depreender que mesmo a conservação *ex situ* não se adequa aos modos tradicionais de espécies agrícolas anuais, ou através da conservação de amostras de sementes. Dessa forma, a conservação *ex situ* em espécies arbóreas tem sido também na forma de populações de plantas vivas cultivadas. Porém, não se deve confundir com coleções de poucos espécimes de uma espécie, como por exemplo a maioria dos jardins botânicos e de arboretos.

Como se pode depreender, portanto, a conservação genética *in situ* adequa-se perfeitamente à situação da alta diversidade das florestas tropicais, já que seria impossível armazenar, em condições *ex situ*, as centenas ou milhares de espécies de um desses ecossistemas, juntamente com toda a sua fauna associada e que interage com as mesmas. Dessa forma, a grande diferença entre as duas formas de conservação, *in situ* e *ex situ*, é principalmente pelo fato de a primeira não ser estática, ou permitir que toda a comunidade que vem sendo conservada tenha a possibilidade de continuidade da evolução, incluindo também os processos de coevolução entre as plantas e os animais e microrganismos.

Assim, nas florestas tropicais, que são o ponto focal deste trabalho, onde a altíssima diversidade de espécies é a predominância, e onde as espécies de valor potencial são em muito maior número que as de alto valor atual, faz muito mais sentido a conservação *in situ* do que a *ex situ*. Por outro lado, nesse caso, pode-se ter diferentes graus desse tipo de conservação, desde aquela pura *in situ* na floresta primária até uma plantação com uma amostra representativa de populações de muitas espécies em uma área específica para conservação genética, simulando uma condição natural. Esse caso, denominado de "conservação *in situ* de restauração", pode ser comparado à conservação *in situ* do agricultor em espécies agrícolas.

É importante novamente ressaltar que a simples proteção de uma área com vegetação natural, tais como os diversos tipos de Parques e Reservas, não representa uma conservação genética *in situ*. Para que seja considerada como tal, é importante que a diversidade genética contida na área seja conhecida e monitorada, além de protegida, de forma que possibilite comprovar o que se está conservando, inclusive que se possa disponibilizar este recurso genético para uso pelo homem. Assim, as metodologias de conservação *in situ* da floresta tropical que vêm sendo propostas baseiam-se nas formas de se quantificar toda a diversidade genética das incontáveis espécies desses ecossistemas.

Na impossibilidade de se quantificar toda a diversidade genética de uma área candidata, o que seria o estudo de várias populações de milhares de espécies, por exemplo, as propostas têm sido na direção de se representar toda essa riqueza de espécies por uma amostra delas. Como fazer essa seleção de espécies de tal forma que as mesmas representem o comportamento de toda a comunidade, ou que o monitoramento de algumas delas possa demonstrar que toda a biodiversidade está em plena integridade genética, vem sendo a tendência seguida.

Diversas formas têm sido apontadas para escolher espécies alvo para as ações na conservação *in situ*, com diferentes formas de se escolher as espécies a serem estudadas e monitoradas. As espécies denominadas "bandeira" seriam aquelas que teriam um carisma tal que atenderiam ao apelo da sociedade, valorizando o trabalho de conservação. Tais espécies devem ter também características que as façam ter importância para a comunidade da floresta, ou serem uma referência para a conservação.

Uma outra forma de selecionar espécies que sejam referência para a conservação seria através de espécies modelo, que representariam grupos de espécies com características comuns, e que teriam padrões genéticos e ecológicos extrapoláveis dentro de certa medida para todo o grupo. Um conjunto de espécies modelo, para os diversos grupos ecológicos, poderia portanto representar uma comunidade florestal.

Uma outra maneira de se considerar espécies que poderiam ser tomadas como mais importantes no ecossistema, e que teriam um papel de referência na conservação *in situ*, foi a proposta por Gilbert (1980) e reforçada por Terborgh (1986). Essa abordagem foi denominada de "Espécies-Chave", e baseia-se no princípio de que as espécies vegetais fariam parte de um sistema maior e que estaria compartimentalizado em subsistemas, e estes estariam interligados por "Elos Móveis" (animais polinizadores e dispersores). Neste sistema, algumas espécies vegetais seriam chaves, por alimentarem esses elos móveis em períodos de carência alimentar. A proposta é a de que essas espécies-chave poderiam ser identificadas e seriam escolhidas para representar a comunidade vegetal; estas seriam então as que mereceriam estudos mais completos (genéticos e ecológicos) e seriam monitoradas na conservação *in situ*.

Essa metodologia de uso das espécies-chave, apesar de ter um conteúdo teórico defensável, e de ter tido grande aceitação quando proposta, apresenta uma dificuldade muito grande a ser transposta, que é, justamente, a da identificação das espécies-chave. Como apontado por Janzen (1980), essas espécies-chave não são indicadas mas sim descobertas a partir de estudos que apontariam o seu papel essencial no fornecimento de alimento, em períodos críticos, aos animais que fazem realmente a ligação no emaranhado sistema de interação entre as espécies. Somente quando um número significativo de espécies vegetais tiver sido estudado com profundidade é que espécies poderiam ser apontadas como candidatas a espécies-chave. Isso significa que somente o entendimento da complexidade da biodiversidade das florestas tropicais é que permitiria identificar essas espécies-chave.

Por outro lado, a utilização do tamanho efetivo da população de espécies raras, ou de muito baixa densidade na floresta natural, tem sido referida como uma metodologia prática para delimitar áreas de conservação *in situ*. Considerando que

as espécies arbóreas podem ser consideradas como alógamas (Bawa, 1974), e que nas populações naturais, sem perturbação antrópica, essas espécies teriam tamanho efetivo igual ao seu número de indivíduos, esse parâmetro poderia ser aplicado para definir áreas mínimas para a conservação *in situ* (Kageyama & Gandara, 1994). Assim, se todas essas premissas, que são discutíveis, forem aceitas, pode-se utilizar o conceito do tamanho efetivo (N_e) para verificar se uma dada espécie alvo tem uma população adequada, conforme a fundamentação de amostragem estatístico-genética apontada por Vencovsky (1987).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande desafio da conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais é, sem dúvida, a altíssima diversidade de espécies associada à pouca informação genética e ecológica dessas espécies. Somente como referência, estima-se que existam cerca de 2000 espécies arbóreas somente no Estado de São Paulo. Diante desse quadro, a estratégia deve ser para a busca de espécies modelo, baseada em características genético-ecológicas que possam representar padrões de variação genética em populações naturais.

O estado atual de conservação da Mata Atlântica, com somente cerca de 7% de cobertura original, aponta uma altíssima prioridade para a conservação *in situ*. As áreas remanescentes desse ecossistema (unidades de conservação e áreas particulares) representam, sem dúvida, ainda uma grande fonte de biodiversidade; no entanto, pouco ainda se sabe sobre a efetividade da conservação genética das espécies que restam nessas áreas.

Por outro lado, o rápido avanço do desmatamento da Floresta Amazônica (cerca de 12,5% desmatado) vem acarretando uma perda expressiva de populações de espécies arbóreas, especialmente as de madeira mais valiosa, e de sua diversidade genética. Nessa situação, as informações genéticas sobre essas espécies podem permitir um planejamento na implantação de unidades de conservação e reservas genéticas, bem como, auxiliar no estabelecimento de práticas de manejo sustentável das florestas tropicais.

Não se pode ainda esquecer de mencionar o Cerrado como um ecossistema de grande diversidade de espécies arbóreas, que tem sido relegado a um segundo plano nos programas de conservação nacionais. A aptidão agrícola das áreas de cerrado tem feito com que boa parte de sua área tenha sido desmatada. Estudos mais recentes vêm mostrando que a diversidade de plantas do Cerrado é comparável a outras áreas de florestas tropicais.

Finalmente, deve-se enfatizar que unidades de conservação não significam propriamente conservação *in situ*, como têm sido muitas vezes mencionado. A efetividade da conservação *in situ* exige primeiro que se conheça a diversidade genética das populações das espécies nelas contidas, e segundo que se monitorem os padrões da variação genética ao longo do tempo. A tendência que vem sendo verificada aponta para a escolha de espécies modelo representativas de grupos de espécies com características ecológicas e genéticas semelhantes que representem boa parte da diversidade de plantas. Essas espécies modelo são as que devem ser intensivamente estudadas e monitoradas.

AGRADECIMENTOS

Os autores são muito gratos a todos os que contribuíram para o avanço do conhecimento do LARGEA/ESALQ/USP sobre a estrutura genética de espécies arbóreas tropicais, e que permitiram aos autores esta síntese do que consideramos importante para a conservação genética *in situ* das florestas tropicais. Em especial somos gratos aos técnicos de laboratório e campo do LARGEA, representados por Elza M. Ferraz e Gelson D. Fernandes, assim como aos seus pós-graduandos e graduandos. Agradecemos à FAPESP pelo financiamento das pesquisas que geraram os dados deste trabalho, ao IPGRI-Roma – que financia o Projeto IPGRI/LARGEA (1999-2002); ao CENARGEN/Embrapa – parceiro no Projeto GEF/Banco Mundial, à FAO-Roma pelo grande apoio ao LARGEA no período de 1989-1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, p.85-92, 1974.

BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. Estúdios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas espécies arbóreas de bosques tropicales. **Revista de Biologia Tropical**, v.35, p.177-188, 1987.

BAWA, K.S.; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.; GRAYUM, M.H.; COVILLE, R.E. Reproduction Biology of Tropical Lowland Rain Forest Trees: II. Pollination systems. **American Journal of Botany**, v.72, p.346-356, 1985.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre a diversidade biológica**: Brasil. Brasília, 1998. 283p.

ESTRADA, A.; FLEMING, T.H. **Frugivores and seed dispersal**. The Hague: Dr. W. Junk Publish, 1986. 346p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: University Press, 1995. 299p.

GAN, Y.; ROBERTSON, F.W.; SOEPADMO E.. Isozyme variation in some rain forest trees. **Biotropica**, v.13, p.20-28, 1981.

GANDARA, F.B. Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Campinas: IB/UNICAMP, 1996. 69p. Dissertação, Mestrado.

GANDARA, F.B.; GRATTAPAGLIA, D.; KAGEYAMA, P.Y.;BATISTA, J.L.F.; CIAMPI, A.Y.;WALTER, B.M.T.;CAVALCANTI; T.B.; UDRY, C.; ABDALA, G. Towards the development of genetic and ecological parameters for *in situ* conservation of forest genetic resources. In: WORKSHOP SOBRE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS. **Proceedings and Papers**. Pirinópolis-GO: IBAMA/GTZ, 1997. p.95-111.

GILBERT, L.E. Food web organization and the conservation of neotropical diversity. In: SOULÉ M.E.; WILCOX, B.A. **Conservation biology**. Sunderland: Sinauer, 1980. p.11-33.

GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y.; GAIOTTO, F.A.; SQUILASSI, M.G.; COLLEVATTI, R.G.; RIBEIRO, V.J.; REIS, A.M.; GANDARA, F.B.; WALTER, B.M.; BRONDANI, R.P. DNA technologies for forest tree breeding and conservation. In: INTERNATIONAL FOUNDATION FOR SCIENCE WORKSHOP. **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**; proceedings. Florianópolis: 1998. p.50-61.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural forest populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MAC BRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.) **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1983. p.335-348.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees. Procedures and preliminary results. **Biotropica**, v.18, p.201-217, 1986.

HERRIT, M.M. Ecology and genetic variation of four hardwoods of Brazil's Atlantic Forest Region. Raleigh: North Caroline State University, 1991. 204p. Thesis, PhD.

JANZEN, D.H. When is it coevolution. **Evolution**, v.34, p.611-612, 1980.

KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure of tropical tree species of Brazil. In: BAWA, K.S.; HADLEY, M. (Ed.) **Reproductive ecology of tropical forest plants**. Paris: UNESCO,1990. p.375-387. (Man and Biosphere Series).

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., Serra Negra, 1993. **Anais**. São Paulo, 1994. v.2, p.1-9.

KRICHER, J. **A Neotropical companion**. 2.ed. Princeton: University Press, 1997. 451p.

MALTEZ, H.M. Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. – Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no estado de São Paulo. Campinas: IB/UNICAMP, 1997. 132p. Dissertação, Mestrado.

MORAES, M.L.T. Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão *Anacardiaceae (Syn: Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler. Piracicaba: ESALQ/USP, 1993. 139p. Tese, Doutorado.

MORAES, P.L.R. Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees *E Martius ex. Nees (Lauraceae)* Rio Claro: UNESP, 1998. 197p. Tese, Doutorado.

OLIVEIRA, A.A. Diversidade, estrutura e dinâmica do componente arbóreo de uma floresta de terra firme de Manaus, Amazonas. São Paulo: IB/USP, 1997. 187p. Tese, Doutorado.

PAIVA, J.R. Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. 145p. Tese, Doutorado.

REIS, A. Manejo e conservação das florestas catarinenses. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina,1993. 137p. Tese, Professor Titular.

REIS, MS Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro *(Euterpe edulis Martius).* Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 210p. Tese, Doutorado.

SANTOS, E.M.G. Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. *(*Caesalpiniaceae*).* Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 114p. Dissertação, Mestrado.

SEBBENN, A.M. Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana l.* (Rubiaceae), a partir de isoenzimas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 107p. Dissertação, Mestrado.

SOUZA, L.M.I. Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill. (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 76p. Dissertação, Mestrado.

TERBORGH, J. Keystone plant resources in the tropical forest. In: SOULÉ, M.E. **Conservation biology**: the science of scarcity and diversity. Sunderland: Sinauer, 1986. p.330-344.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME-UNEP. **Convention on biological diversity**: textes and annexes. Genebra, 1994.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **IPEF**, v.35, p.79-84, 1987.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTER. **Global biodiversity**: status of the earth's living resources. London: Chapman & Hall, 1992. 585p.

8

MELHORAMENTO DE ESPÉCIES ALÓGAMAS

CLÁUDIO LOPES DE SOUZA JR.

Depto. de Genética, USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13.400-970 - Piracicaba, SP.

1. INTRODUÇÃO

São denominadas de espécies alógamas aquelas cuja forma de reprodução natural ocorre com o acasalamento entre plantas; assim, as plantas de uma geração qualquer são naturalmente oriundas de gametas femininos e masculinos de diferentes plantas. Esse tipo de acasalamento tem conseqüências fundamentais para as tecnologias utilizadas para o desenvolvimento de cultivares desse conjunto de espécies.

Dentre as espécies cultivadas alógamas importantes estão o milho, girassol, eucalipto, cana-de-açúcar, mandioca; hortaliças como a cenoura, cebola, beterraba e as brássicas; e frutíferas como a manga, abacate, maçã, kiwi etc. Algumas dessas espécies são propagadas assexuadamente como a cana-de-açúcar e a mandioca, enquanto outras são propagadas sexuadamente via sementes como o milho. Das espécies alógamas importantes, pode-se citar como fontes de produtos a ração para animais, o óleo e o xarope para refrigerantes obtidos do milho; açúcar e álcool combustível obtidos da cana-de-açúcar; celulose para fabricação de diversos tipos de papéis e embalagens e, também, a madeira para construção de móveis obtidos do eucalipto; frutas para consumo interno e exportação como o abacate, maçã e kiwi; e as hortaliças, que são excelentes fontes de vitaminas, como a cenoura, beterraba, couve, couve-flor, repolho, etc. Portanto, as espécies alógamas constituem-se em um grupo diversificado de espécies que têm sido aproveitadas e/ou utilizadas das mais diversas formas.

Devido à diversidade de espécies que compõem o grupo das alógamas não é possível apresentar as tecnologias utilizadas para o melhoramento de cada espécie, uma vez que cada espécie apresenta problemas específicos que podem ser resolvidos, solucionados ou, ainda, amenizados via melhoramento genético. Por exemplo, para algumas espécies a produtividade, isto é, a quantidade de produto produzido por unidade de área, é o caráter mais importante; enquanto para outras a qualidade do produto, como por exemplo o sabor e a palatabilidade, podem ser mais importantes que a produtividade em si; em algumas espécies a obtenção de cultivares resistentes às doenças e/ou pragas norteiam os programas de melhoramento, enquanto em outras a importância dada a esses problemas pode ser secundária. Além disso, a tecnologia utilizada para se obter cultivares nas espécies que se propagam assexuadamente é completamente diferente daquelas espécies que se propagam apenas sexuadamente via sementes. Nesse capítulo serão apresentadas as bases genéticas das tecnologias que são utilizadas para o desenvolvimento de cultivares para as espécies que apresentam propagação assexuada e, também, aquelas para o desenvolvimento de cultivares das espécies que são propagadas via sementes. Assim, as bases genéticas que direcionam o melhoramento dos dois grupos de espécies e que necessariamente são utilizadas no desenvolvimento de cultivares é que serão enfocadas em detalhes.

2. ESTRUTURA GENÉTICA DAS ESPÉCIES ALÓGAMAS

Aceita-se que uma espécie é alógama quando apresenta cerca de 5% de autofecundação, ou seja, cerca de 95% de cruzamentos naturais. Essas espécies apresentam uma série de mecanismos que favorecem a alogamia, ou em outras palavras, dificultam a ocorrência de autofecundações naturais. Os principais mecanismos são: Monoecia em que as plantas apresentam sexos separados na mesma planta como o milho, onde o pendão é a inflorescência masculina e a espiga a inflorescência feminina, assim, os gametas masculinos e femininos são formados em diferentes partes da planta dificultando a ocorrência da autofecundação; Dioecia em que as plantas apresentam sexos diferentes como o kiwi e a araucária, o que, naturalmente, impede a autofecundação; as espécies que apresentam flores completas (hermafroditas) apresentam mecanismos como a Protoginia em que o estigma encontra-se receptivo mas não ocorre a liberação do pólen de forma simultânea, e a Protandria em que ocorre a liberação do pólen mas o estigma não se encontra receptivo de forma simultânea. Exemplos desses mecanismos podem ser encontrados em frutíferas como o abacate em que diferentes variedades apresentam esses dois mecanismos em diferentes etapas do dia; também, algumas espécies como as brássicas e o cacau apresentam um mecanismo denominado de auto-incompatibilidade que impede que plantas que possuem os mesmos alelos no loco que controla esse mecanismo cruzem-se e produzam descendentes. Algumas espécies – como o milho – apresentam simultaneamente dois mecanismos, isto é, a monoecia e a protandria.

A estrutura genética desses tipos de espécies é, portanto, determinada pela forma de acasalamento, que em uma população os cruzamentos se dão de forma aleatória. Para visualizar a estrutura genética dessas espécies, considere um loco qualquer com dois alelos B e b cujas freqüências em uma população são: f(B)= p e f(b)=q; naturalmente a soma dessas freqüências é 1. Dessa forma teremos gametas femininos com os alelos B e b e, também, gametas masculinos com os alelos B e b, com as freqüências acima citadas. Como para essas espécies aceita-se que podem ter até 5% de autofecundação, é preciso considerar também esse aspecto em sua estrutura genética. O coeficiente de endogamia (F), que mensura a quantidade de locos em homozigose nas populações, influencia as estruturas genéticas das populações alógamas. O acasalamento nessas espécies se dá de forma aleatória e, então, as freqüências dos genótipos nessa população podem ser apresentados como na Tabela 1.

Da Tabela 1 pode-se verificar que na ausência de endogamia (F=0) as freqüências genotípicas são funções apenas das freqüências alélicas e, nesse caso, a freqüência do loco em heterozigose é máxima para p=q=0,5. Qualquer nível de endogamia (F≠0) presente na população acarreta a redução na quantidade de locos em heterozigose e o conseqüente aumento nos locos em homozigose. Estendendo essa Tabela para um maior número de locos e alelos, pode-se verificar que as plantas

TABELA 1. Genótipos e freqüências genotípicas de uma população alógama.

Genótipos	Freqüências genotípicas (F≠0)	Freqüências genotípicas (F=0)
BB	$p^2 + Fpq$	p^2
Bb	2pq - 2Fpq	2pq
bb	$q^2 + Fpq$	q^2

das populações alógamas apresentam parte dos locos em homozigose e parte dos locos em heterozigose, e que a quantidade desses dependem das freqüências alélicas e da presença ou ausência da endogamia nas populações. Para apenas um loco e na ausência de endogamia, se não ocorrer seleção, mutação, deriva genética e migração, as freqüências alélicas não se alteram no decorrer das gerações e, conseqüentemente, as freqüências genotípicas também não se alteram. Essa propriedade é denominada de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na presença da endogamia, se o coeficiente de endogamia não se alterar no decorrer das gerações e, considerando as mesmas condições para populações não endogâmicas, as freqüências alélicas e genotípicas também se mantêm constantes com o decorrer das gerações. Essa propriedade é agora denominada de Equilíbrio de Wright. Para esses tipos de populações consideradas, se algum dos fatores que alteram as freqüências alélicas ocorrerem, isto é, se ocorrer mutação, seleção, deriva genética ou migração, basta apenas uma geração de intercruzamento aleatório para que as populações entrem novamente em equilíbrio. Evidentemente, isso ocorre para cada loco separadamente, uma vez que se considerarmos mais locos e, também, a existência de ligação entre locos, as populações não entram em equilíbrio com apenas uma geração de intercruzamento, necessitando de um maior número de gerações para entrar em equilíbrio, o que depende do número de locos e da taxa de recombinação dos locos ligados (Falconer & Mackay, 1996).

Essa forma de reprodução tem uma série de conseqüências para o desenvolvimento de cultivares dessas espécies, das quais podem ser citadas:

a) As plantas têm parte dos locos em heterozigose o que permite que alelos recessivos deletérios ou letais permaneçam nessas. Esses alelos recessivos deletérios ou letais são denominados de "Carga Genética" das populações e quanto maior a quantidade desses maior será a carga genética da população;

b) As populações de espécies alógamas normalmente apresentam uma redução geral do vigor e produtividade quando submetidas à endogamia devido à carga genética e, também, pela redução na quantidade dos locos em heterozigose em que não há alelos recessivos deletérios ou letais. Esse fenômeno é denominado de "Depressão por Endogamia";

c) Com exceção das espécies que podem ser propagadas assexuadamente, as plantas não transferem os seus genótipos à descendência, esses são formados de forma aleatória em cada geração;

d) A variabilidade genética das populações está associada as diferenças entre plantas envolvendo os locos em homozigose e heterozigose;

e) A seleção de genótipos superiores é feita utilizando-se da clonagem nas espécies que podem ser propagadas assexuadamente, ou via endogamia e posterior hibridação de linhagens nas demais espécies. Assim, a endogamia, usualmente praticada através da autofecundação, é utilizada normalmente nesse último grupo de espécies e é onde a depressão por endogamia adquire maior importância;

f) O melhoramento genético dessas espécies é feito aumentando-se as freqüências dos alelos favoráveis dos caracteres de importância econômica e/ou agronômica que serão submetidos à seleção.

3. OBJETIVOS GERAIS DE PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

As cultivares desenvolvidas nos programas de melhoramento genético precisam atender simultaneamente os produtores (agricultores) e os consumidores como indústrias de transformação e a população que consome os alimentos em natura ou processados. Os agricultores anseiam por cultivares que apresentem maior produtividade, que sejam resistentes às pragas e doenças, apresentem maior estabilidade de produção, que resistam às ocorrências climáticas indesejáveis como veranicos, ventos fortes, geadas, e que facilitem os tratos culturais. Os consumidores exigem produtos que apresentem melhor qualidade nutricional ou maior quantidade ou teor de um determinado produto ou substância. Por exemplo, os produtos consumidos em natura devem possuir maior quantidade de vitaminas ou proteínas, os produtos processados pelas indústrias devem ter maior quantidade de certos produtos como por exemplo o teor de óleo no caso do milho, ou maior teor de sacarose no caso da cana-de-açúcar, e assim por diante. Como os programas de melhoramento demandam prazos longos, isto é, como o desenvolvimento de uma cultivar exige muitos anos até que seja utilizada pelos agricultores, os melhoristas precisam se antecipar às mudanças tecnológicas que deverão ocorrer em um futuro próximo. Isso porque os agricultores só aceitarão novas cultivares se essas apresentarem alguma(s) vantagem(ns) em relação às anteriores, como por exemplo cultivares menos suscetíveis à pragas e doenças. O mesmo ocorre com os consumidores, isto é, os novos produtos só serão aceitos se trouxerem vantagens em relação aos que eram anteriormente consumidos.

Uma população ou um híbrido interpopulacional, isto é, a geração F_1 do cruzamento de duas populações, são constituídos de uma mistura de genótipos que possuem parte dos locos em homozigose e parte em heterozigose e cujas estruturas genéticas dependem das freqüências alélicas. Os caracteres normalmente manipulados pelos melhoristas são denominados de quantitativos ou poligênicos e quando plotados em gráficos de distribuição de freqüências apresentam uma distribuição denominada de normal. Assim, nas populações ou híbridos interpopulacionais de espécies alógamas, têm-se genótipos muito inferiores, medianamente inferiores, medianos, medianamente superiores, superiores e, também, "o genótipo superior". Nos programas de melhoramento é preciso classificar os genótipos corretamente para que "o(s) genótipo(s) superior(es)" sejam reconhecidos, selecionados e multiplicados para que os agricultores venham a utilizá-los. Evidentemente, os dados que são manipulados são de natureza fenotípica, isto é, o valor de cada caráter mensurado é função do genótipo, do ambiente em que este genótipo se encontra, e da interação do genótipo com esse ambiente. Portanto, para se manipular esses dados fenotípicos é necessário utilizar técnicas de experimentação para minimizar os efeitos do ambiente e da interação genótipo-ambiente e, também, conhecer os parâmetros genéticos que permitem conhecer a herança de cada caráter para manipulá-los de forma tecnicamente correta.

Para se praticar seleção de forma técnica e correta, é preciso que se conheça a herança de cada caráter. Para isso, são necessários estudos de natureza estatístico-genéticas para se estimar os componentes da variabilidade genética (σ^2_G) como a variância genética aditiva (σ^2_A) e a variância genética dominante (σ^2_D), os coeficientes de herdabilidade no sentido restrito ($h^2 = \sigma^2_A / \sigma^2_F$) e/ou amplo ($\sigma^2_G / \sigma^2_F$), as respostas

à seleção ($Rs=ds.h^2$), os graus médios de dominância (gmd), as interações genótipos por ambiente, as heteroses [$h=F_1-(P_1+P_2)/2$], e as depressões por endogamia ($DE=S_0-S_6$) de todos os caracteres de importância econômica e/ou agronômica que serão submetidos à seleção. Nestas expressões, F_1 refere-se à média do cruzamento das populações P_1 e P_2, S_0 refere-se à média de uma população não endogâmica e S_6 à média da mesma população com seis gerações de autofecundação, onde o coeficiente de endogamia é $F \approx 1,0$.

4. MELHORAMENTO DE ESPÉCIES DE PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

Diversas espécies alógamas podem ser propagadas assexuadamente como a cana-de-açúcar, mandioca, seringueira, eucalipto etc. A propagação vegetativa dessas espécies é utilizada para o plantio comercial, e, portanto, a reprodução das cultivares se dá assexuadamente, isto é, sem o uso de sementes. Dois aspectos desse tipo de propagação são importantes para o melhoramento genético dessas espécies: a) os genótipos são transmitidos integralmente através das gerações na ausência de mutações; b) o número de clones de cada planta (genótipo) aumenta de forma exponencial com o decorrer das gerações. Esses fatos asseguram que os genótipos selecionados possam ser utilizados comercialmente.

4.1 FORMAÇÃO DE POPULAÇÕES

As plantas das espécies de propagação assexuada são normalmente muito heterozigóticas e, por isso, apresentam elevada depressão por endogamia. Isto é, os descendentes de cruzamentos entre plantas aparentadas apresentam queda no vigor quando comparadas àquelas oriundas de cruzamentos entre plantas não aparentadas. Assim, a geração F_1 do cruzamento de dois clones apresenta variabilidade genética, e o nível dessa variabilidade genética depende do nível de heterozigose dos clones e de sua divergência genética. Por exemplo, para dois clones C_1 e C_2 com genótipos A_1A_2 e A_3A_4, respectivamente, a geração F_1 do seu cruzamento gera quatro genótipos distintos, isto é: A_1A_3, A_1A_4, A_2A_3 e A_2A_4, com freqüências ¼. Portanto, na geração F_1 já existe variabilidade genética disponível para se praticar seleção. Para mais locos, a quantidade de genótipos diferentes na geração F_1 é: $2^{n1}.2^{n2}$. Assim, se os clones parentais diferirem em 20 locos o número de genótipos diferentes será $2^{20}.2^{20} \approx 10^{12}$, e se os clones parentais diferirem em 50 locos o número de genótipos diferentes na geração F_1 será $2^{50}.2^{50} \approx 10^{30}$. Portanto, a geração F_1 apresenta variabilidade genética considerável mesmo se os clones parentais não forem muito divergentes geneticamente (Wricke & Weber, 1986).

As populações a serem submetidas à seleção são formadas via cruzamentos de clones (genótipos), e a geração F_1 é a geração de referência, isto é, a geração em que se inicia a seleção. Os cruzamentos para gerar os F_1's podem ser biparentais que se referem aos cruzamentos entre dois genótipos, ou multiparentais quando mais de dois genótipos estão envolvidos nos cruzamentos. Assim, cruzamentos do tipo $C_1 \times C_2$ são denominados biparentais, enquanto cruzamentos do tipo $(C_1 \times C_2) \times C_3$ ou $(C_1 \times C_2) \times (C_3 \times C_4)$ são denominados de multiparentais.

Um aspecto muito importante no melhoramento dessas espécies refere-se à seleção dos genótipos ou clones que serão utilizados nos cruzamentos para gerar as populações. Os caracteres quantitativos apresentam distribuição normal e, portanto, tem-se em uma população genótipos inferiores, medianos e superiores. No melhoramento visa-se selecionar e multiplicar o(s) genótipo(s) superior(es) de uma população e, portanto, o(s) genótipo(s) superior(es), isto é, aqueles que superam as cultivares em uso, devem estar presentes nas populações geradas para serem submetidas à seleção. Portanto, os clones que são utilizados em cruzamentos devem ser selecionados de forma que as populações geradas de seus cruzamentos tenham genótipos superiores àqueles em uso comercial. Para isso, são utilizados os seguintes critérios para a escolha dos clones parentais (Hoopes & Plaisted, 1987; Souza Jr., 1995a):

Cultivares Comerciais – procura-se aproveitar dos efeitos da seleção já praticados para produzi-los, aumentando-se a probabilidade de concentração de alelos favoráveis em alguns genótipos. Esses clones apresentam um elevado nível de produtividade e uma série de características favoráveis, como resistência às principais doenças, pragas e acamamento, precocidade, etc. Assim, a variabilidade genética para os caracteres menos complexos que a produtividade é menor, o que permite que a seleção para produtividade seja intensa.

Genealogias – é necessário que seja conhecida a genealogia das cultivares que farão parte dos cruzamentos para evitar que clones aparentados possam vir a ser utilizados em cruzamentos, uma vez que populações geradas de cruzamentos de clones aparentados apresentarão depressão por endogamia e conseqüente redução da variabilidade genética.

Divergência Genética – quanto maior a divergência genética dos genótipos envolvidos nos cruzamentos, maior será a variabilidade genética da população gerada. A divergência genética entre clones pode ser mensurada através do nível de heterose e/ou capacidade específica de combinação que podem ser estimadas pela análise de cruzamentos dialélicos. Esse item está relacionado com o anterior, uma vez que clones aparentados tendem a apresentar menor divergência genética que aqueles não aparentados.

Complementariedade de Caracteres – procura-se cruzar clones que possam se complementar, principalmente em relação à resistência à pragas e doenças. Assim, se o clone 1 for resistente ao patógeno A e suscetível ao patógeno B, procura-se entre os clones disponíveis para cruzamento aqueles que sejam resistentes ao patógeno B e resistentes ou suscetíveis ao patógeno A, visando obter clones que sejam simultaneamente resistentes a ambos patógenos, isto é, visando concentrar caracteres favoráveis em um único genótipo.

***Performance* das Cultivares** – o nível de *performance* das cultivares em um conjunto de ambientes também é muito importante pois indica que as cultivares superiores possuem concentrações mais elevadas de alelos favoráveis que as demais e, também, podem apresentar interações genótipo-ambiente mais favoráveis para esse conjunto de ambientes considerado que as demais.

Os critérios apresentados são aqueles que devem ser considerados em qualquer programa de melhoramento dessas espécies, entretanto, cada espécie tem as suas

particularidades as quais são adicionadas a esses critérios básicos. Dessa forma, é necessário manter um banco de dados com todas essas informações para que a seleção das cultivares que serão utilizadas em cruzamentos possa ser feita da forma mais criteriosa possível.

4.2 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO

O primeiro passo no processo seletivo é a formação de populações que serão submetidas à seleção e como mostrado no item anterior, estas são formadas via cruzamentos de cultivares comerciais que preencham aqueles critérios básicos. Uma vez realizados os cruzamentos, dispõe-se de sementes que são semeadas e tem-se a população de refência que é a geração F_1. O objetivo então é classificar corretamente os genótipos quanto aos seus méritos econômicos e/ou agronômicos, identificar o(s) superior(es), selecioná-lo(s) e multiplicá-lo(s) para que seja(m) utilizado(s) comercialmente.

A avaliação e seleção dos genótipos superiores é realizada em diversas etapas, uma vez que inicialmente tem-se apenas uma planta por genótipo, e após esta etapa inicial as plantas selecionadas são clonadas permitindo que sejam avaliadas em experimentos com repetições. À medida que se avança nas etapas de avaliação e seleção, o número de clones por genótipo (planta F_1) aumenta permitindo que estes sejam avaliados em experimentos com maior número de repetições e também em diversos locais. No final, tem-se poucos genótipos que serão avaliados em um grande número de locais e repetições por local e, geralmente, em diversos anos. Finalmente, então, pode-se comparar os genótipos selecionados com as cultivares em uso e aqueles que superarem em *performance* essas cultivares serão selecionados para recomendação para plantio, originando novas cultivares. A seguir será feita uma breve descrição das etapas que devem ser seguidas em um programa de melhoramento dessas espécies, mas como cada espécie tem as suas particularidades, apenas os aspectos gerais dessas etapas serão mencionados e, ainda, o número de etapas de avaliação/seleção diferem com o tipo de espécie (Fehr, 1987; Souza Jr., 1995a).

4.2.1 ETAPA INICIAL

Nesta etapa, tem-se um campo cujas plantas são originárias de sementes, isto é, corresponde à geração F_1. Assim, cada genótipo tem apenas uma planta, e é praticada seleção massal ou seleção fenotípica. No campo tem-se, geralmente, um número muito grande de plantas as quais são avaliadas individualmente para os caracteres de alta herdabilidade. As plantas só podem ser avaliadas e selecionadas se estiverem em competição completa, uma vez que aquelas que não estiverem nessa condição podem ser favorecidas e serem erroneamente selecionadas. Apenas os caracteres de alta herdabilidade devem ser selecionados nesta etapa, uma vez que a unidade de seleção refere-se a uma planta, não podendo, portanto, praticar-se seleção para caracteres de mediana a baixa herdabilidades.

4.2.2 ETAPAS INTERMEDIÁRIAS

As plantas selecionadas na etapa anterior são clonadas, e como tem-se apenas uma planta por genótipo, estarão disponíveis para avaliação poucos clones por

genótipo, limitando o número de repetições e o número adequado de plantas por parcela. Assim, pode-se ter apenas duas repetições com poucas plantas por parcela. Neste caso, a seleção será feita com base nas médias das repetições, mas como a precisão experimental ainda não é alta, a seleção deve ser feita para caracteres de alta e mediana herdabilidades. Em uma etapa seguinte, os genótipos selecionados na etapa anterior são clonados, gerando uma quantidade razoável de clones por genótipo. Nesta fase dispõe-se, ainda, de um grande número de genótipos para serem avaliados e, portanto, a quantidade de clones/genótipo e o número elevado de genótipos impedem que estes sejam avaliados em experimentos com grande número de repetições. Desse modo, aumenta-se o número de repetições, podendo a avaliação ser realizada em alguns locais e, também, com um número adequado de plantas por parcela, permitindo que se faça uma seleção branda para caracteres de baixa herdabilidade e uma alta intensidade de seleção para os caracteres de herdabilidade mediana, uma vez que seleção é praticada nas médias de cada caráter. Com o decorrer das gerações de avaliação/seleção, gradativamente a disponibilidade de clones por genótipo aumenta e a quantidade de genótipos a serem avaliados diminui. Conseqüentemente, a precisão das avaliações aumenta gradativamente devido ao aumento gradativo do número de repetições e locais de avaliação, o que permite ir aumentando de forma gradativa a intensidade de seleção para os caracteres de baixa herdabilidade.

4.2.3 ETAPAS FINAIS

Após diversas etapas de avaliação/seleção, tem-se poucos genótipos que por não terem mais restrições quanto ao número de clones/genótipo, são avaliados em um grande número de repetições, em diversos locais e anos, incluindo-se nessas avaliações as cultivares em uso que servem como testemunhas ou referências para comparações. Após essas avaliações, identifica-se o(s) genótipo(s) superior(es) que darão origem às cultivares que serão liberadas para plantios comerciais.

4.3 RESPOSTA À SELEÇÃO

A seleção nestas espécies é praticada em etapas, de forma que à medida que se avança aumenta a disponibilidade de clones por genótipo permitindo o aumento gradativo do número de repetições e de locais para a avaliação aumentando gradativamente a precisão experimental e, conseqüentemente, aumenta-se gradativamente a intensidade de seleção. Isso ocorre até ser possível identificar com precisão o(s) genótipo(s) superior(es) que é(são) liberado(s) como cultivar(es). A intensidade final de seleção é elevada e corresponde ao produto das intensidades de seleção de cada etapa (Wricke & Weber, 1986).

Como os genótipos selecionados são clonados, isto é, são transmitidos integralmente às gerações seguintes, a seleção explora toda a variabilidade genética de cada geração. A reposta à seleção para a etapa inicial onde é praticada a seleção fenotípica é: $Rs = i\ \sigma_G^2 / \sigma_F$, onde i é o diferencial de seleção estandardizado, σ_G^2 é a variância genética total ($\sigma_G^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2$) e σ_F é o desvio padrão fenotípico da unidade de seleção. A variância fenotípica da unidade de seleção na primeira etapa onde é praticada seleção massal ou fenotípica é: $\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$, onde σ_E^2 é a variância ambiental

do campo experimental. Na etapa seguinte, onde tem-se avaliação em experimentos com repetições em apenas um local esta variância é: $\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2/R$; nas etapas seguintes onde as avaliações são realizadas em experimentos com repetições em diversos locais tem-se: $\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_{GL}^2/L + \sigma_E^2/RL$ e nas etapas finais quando as avaliações são realizadas em experimentos com repetições em diversos locais e anos, tem-se: $\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_{GL}^2/L + \sigma_{GA}^2/A + \sigma_{GLA}^2/LA + \sigma_E^2/RLA$. Nestas expressões, σ_{GL}^2, σ_{GA}^2 e σ_{GLA}^2, referem-se às variâncias das interações genótipos com locais, genótipos com anos e genótipos com locais e anos; R, L e A, referem-se ao número de repetições, locais e anos. Verifica-se por essas expressões que a seleção torna-se mais eficiente gradativamente com o aumento do número de repetições, locais e anos de avaliação devido ao fato de a variância fenotípica reduzir-se gradativamente e, conseqüentemente, reduzindo o denominador da expressão da resposta à seleção. Estas expressões das variâncias fenotípicas de cada etapa seletiva, mostram, também, porque na etapa inicial deve-se praticar seleção apenas para os caracteres de alta herdabilidade e na etapa seguinte deve-se praticar seleção ainda para caracteres de alta herdabilidade e para caracteres de herdabilidade mediana; e somente quando tem-se avaliações em experimentos com repetições em mais que um local deve-se começar a praticar seleção para caracteres de baixa herdabilidade.

A resposta à seleção final é o somatório das respostas à seleção de cada etapa, isto é:

$$Rs = Rs_1 + Rs_2 + ... + Rs_{(n-1)} + Rs_{(n)}.$$

4.4 ÍNDICE DE SELEÇÃO

Como visto, a seleção de genótipos superiores em espécies de reprodução assexuada é realizada em diversas etapas. Assim, os genótipos avaliados em uma dada etapa corresponde àqueles selecionados na etapa anterior e, com exceção da primeira etapa em que é praticada uma seleção individual fenotípica, nas demais etapas a seleção é baseada na média de repetições. Supondo três etapas de avaliação, tem-se informações das *performances* dos genótipos que estão sendo avaliados na última etapa oriundos das avaliações da primeira e da segunda etapa. Essas informações podem ser aproveitadas e agrupadas na forma de um índice de seleção visando aumentar a eficiência da seleção nas etapas posteriores. Portanto, na segunda etapa tem-se informações da primeira etapa, na terceira etapa tem-se informações da primeira e da segunda etapa e assim por diante.

Sendo n e n' (n'>n) duas etapas de avaliação, onde os genótipos avaliados na etapa n' são aqueles selecionados na etapa n, o índice de seleção de um caráter j com as informações das duas etapas é (Wricke & Weber, 1986; Souza Jr., 1995a):

$$I_{ij} = b_n F_{ijn} + b_{n'} F_{ijn'},$$

onde I_{ij} é o índice de seleção do genótipo i para o caráter j agrupando as informações das etapas n e n', b_n e $b_{n'}$ são os pesos ponderados associados aos valores fenotípicos das gerações n e n', e F_{ijn} e $F_{ijn'}$ são os valores fenotípicos (médias) do caráter j do genótipo i nas gerações n e n', respectivamente. Como se dispõe dos valores fenotípicos, para esse índice ser estimado é necessário estimar os pesos relativos de cada etapa.

Esse índice é uma equação de regressão múltipla, onde esses pesos são os coeficientes de regressão parciais dos valores fenotípicos sobre o índice e que geram os melhores valores de b_n e $b_{n'}$. Dessa forma, tem-se um conjunto de equações lineares que são resolvidas pelo processo dos quadrados mínimos, em que a correlação entre o índice e o valor genotípico do caráter j seja o maior possível. Para se estimar esses pesos ponderados para cada geração utilizando-se desse processo, é necessário a obtenção de estimativas de variâncias e covariâncias fenotípicas e genéticas. Entretanto, como o que importa são os valores relativos destes pesos, pode-se obtê-los de forma mais simplificada, sem a exigência de se obter estas estimativas fazendo-se as seguintes restrições: $b_n + b_{n'} = 1{,}0$, $\sigma^2_{Gn} = \sigma^2_{Gn'}$ e $\sigma^2_{En} = \sigma^2_{En'}$. Com essas restrições, os pesos são: $b_n = r_n/(r_n + r_{n'})$ e $b_{n'} = r_{n'}/(r_n + r_{n'})$, e o índice de seleção torna-se (Souza Jr., 1995a):

$$I_{ij} = [r_n/(r_n + r_{n'})]\, F_{ijn} + [r_{n'}/(r_n + r_{n'})]\, F_{ijn'}.$$

Portanto, esse índice independe de estimativas de variâncias e covariâncias genéticas e é facilmente obtido pois depende apenas do número de repetições e dos valores fenotípicos do caráter em questão em cada etapa.

Considerando diversas etapas de seleção, o índice I_{ij} é:

$$I_{ij} = b_1 F_{ij1} + b_2 F_{ij2} + \ldots\ldots + b_n F_{ijn},$$

onde:
$b_1 = r_1/(r_1 + r_2 + \ldots + r_n)$,
$b_2 = r_2/(r_1 + r_2 + \ldots + r_n)$ e
$b_n = r_n/(r_1 + r_2 + \ldots + r_n)$,

assim, o peso ponderado para qualquer etapa de avaliação é:

$$b_n = r_n / \sum_{k=1}^{n} r_k .$$

A resposta à seleção baseada no índice é:

$$Rs_I = i_I\, \sigma^2_G / \sigma_{FI},$$

onde $\sigma^2_{FI} = \sigma^2_G + \sigma^2_E/(r_n + r_{n'})$ é a variância fenotípica do índice de seleção e, portanto, a expressão da resposta à seleção para duas etapas de seleção baseando-se no índice é:

$$Rs_I = i_I\, \sigma^2_G / \sqrt{\sigma^2_G + \sigma^2_E/(r_n + r_{n'})}.$$

Para que este índice seja utilizado, é preciso que a seleção baseada nele seja superior àquela baseada apenas nas informações da etapa n', cuja resposta à seleção é:

$$Rs_{n'} = i_{n'}\, \sigma^2_G / \sqrt{\sigma^2_G + (\sigma^2_E / r_{n'})},$$

e supondo-se que as intensidades de seleção sejam as mesmas, isto é, $i_I = i_{n'}$, a eficiência relativa (Ef) da seleção baseada no índice em relação àquela baseada na geração n', é:

$$Ef = Rs_I / Rs_{n'} = \sigma_{Fn'} / \sigma_{FI}, \text{ isto é:}$$

$$Ef = \sqrt{\sigma_G^2 + (\sigma_E^2 / r_{n'}) / \sigma_G^2 + [\sigma_E^2 / (r_n + r_{n'})]}.$$

O valor dessa eficiência é superior a 1,0, isto é: Ef > 1,0, uma vez que o desvio padrão fenotípico do índice é inferior ao desvio padrão fenotípico da etapa n'. Portanto, o uso do índice de seleção acarretará uma resposta à seleção superior àquela baseada apenas na informação da geração n. É óbvio, que essa eficiência será tanto maior quanto maior for a variância ambiental, e portanto, o índice de seleção trará maiores benefícios para caracteres muito influenciados pelo ambiente, isto é, para caracteres de baixa herdabilidade (Souza Jr., 1995a).

Outro aspecto que deve ser considerado é que o índice de seleção pode ser utilizado a partir da segunda etapa de avaliação e, portanto, ele é cumulativo. Assim, o uso do índice de seleção pode gerar no final do processo seletivo uma eficiência acumulada elevada mesmo com valores relativamente baixos para cada etapa. Além disso, pode-se com o uso do índice de seleção aplicar uma intensidade de seleção mais elevada o que aumentaria ainda mais a sua eficiência e, ainda, poderá auxiliar a reduzir o número de etapas de seleção (Souza Jr., 1995a).

5. HÍBRIDOS DE LINHAGENS

5.1 BASE GENÉTICA

Nas espécies alógamas que não possuem reprodução assexuada, os embriões das sementes são formados pela fusão de gametas oriundos de diferentes genitores. Assim, as plantas de uma população em uma geração qualquer são formadas por cruzamentos aleatórios de plantas da geração anterior. Portanto, uma população de uma espécie alógama compartilha de um mesmo conjunto gênico através das gerações, se não ocorrer migração. Nestas populações, os alelos recessivos deletérios e/ou letais, que compõem a carga genética destas, se mantêm escondidos nos locos em heterozigose e, então, essas populações, geralmente, apresentam uma depressão por endogamia acentuada. Também, cruzamentos de populações de origens diferentes, que são geneticamente divergentes, apresentam, geralmente, *performances* superiores às das populações parentais, cuja expressão é denominada de heterose.

As plantas das populações destas espécies alógamas são constituídas por parte dos locos em homozigose e parte dos locos em heterozigose e, como visto, não transferem o seu genótipo para a geração seguinte como aquelas que possuem reprodução vegetativa. Assim, é preciso uma tecnologia que permita fixar os genótipos de uma população, avaliá-los em experimentos com repetições, classificá-los quanto aos seus valores genotípicos corretamente, selecionar os genótipos superiores e multiplicá-los para serem liberados como cultivares. Esta tecnologia foi descrita no

início do século por Shull (1908, 1909, 1910) e consta, basicamente, de um sistema de endogamia seguida de hibridação, conforme descrito a seguir.

As plantas de uma população são submetidas à endogamia, geralmente via autofecundações sucessivas, até se obterem linhagens homozigóticas ou puras. Para fins de melhoramento, são utilizadas seis a oito gerações de autofecundação para se considerar que as linhagens são homozigóticas. Como cada linhagem homozigótica produz apenas um tipo de gameta, elas podem ser mantidas e multiplicadas cruzando-se artificialmente plantas da mesma linhagem, ou deixando-as cruzar livremente em campos isolados. Dessa forma, o genótipo de cada linhagem homozigótica é transmitido integralmente através das gerações, permitindo a sua multiplicação em larga escala. A seguir, as diferentes linhagens homozigóticas são cruzadas gerando os híbridos, e como as linhagens podem ser mantidas e multiplicadas, os genótipos dos híbridos também podem ser reproduzidos com precisão através das gerações e, conseqüentemente, podem ser produzidos e multiplicados quando necessário. Assim, tem-se uma tecnologia que permite fixar os genótipos de uma população alógama que não tem reprodução vegetativa. É preciso enfatizar, que esta metodologia não gera novos genótipos, apenas permite reproduzir aqueles existentes em uma população e, com isso, os genótipos de uma população podem ser fixados e multiplicados, permitindo avaliá-los, classificá-los corretamente e selecionar os genótipos superiores de uma população que serão posteriormente multiplicados e liberados como cultivares. Note, também, que quando se utiliza uma população como cultivar, denominada variedade, os agricultores estarão cultivando uma mistura de genótipos superiores, medianos e inferiores, enquanto que quando se utilizam híbridos de linhagens, os agricultores estarão cultivando apenas o(s) genótipo(s) superior(es) desta população.

5.2 POPULAÇÕES BASE

Os híbridos são, geralmente, obtidos de cruzamentos de linhagens oriundas de populações diferentes, com o intuito de se explorar a heterose existente nos cruzamentos das populações de origem. Assim, os híbridos são interpopulacionais, isto é, a sua produção final se dá com materiais oriundos de diferentes populações. Para se direcionar os cruzamentos, as populações são alocadas em Grupos Heteróticos distintos e esses grupos heteróticos são formados incluindo-se populações, linhagens ou sintéticos em grupos de tal forma que dentro de grupos os cruzamentos não manifestam heterose ou esta heterose é muito baixa, enquanto que entre grupos os níveis de heterose são elevados. Como a expressão genética da heterose é $h= \Sigma(p - r)^2d$, onde p e r são as freqüências dos alelos favoráveis em populações de grupos heteróticos distintos e d o efeito de dominância, a heterose só se manifesta quando as populações são divergentes geneticamente e quando o caráter tiver alto nível de dominância direcional (d) (Falconer & Mackay, 1996). Dessa forma, pode-se direcionar os cruzamentos para capitalizar a heterose nos híbridos e, conseqüentemente, os híbridos formados por cruzamentos de linhagens oriundas de diferentes grupos heteróticos apresentarão *performances* superiores daqueles híbridos formados por cruzamentos de linhagens oriundas do mesmo grupo heterótico (Hallauer *et al.*, 1988).

Os grupos heteróticos são produzidos utilizando-se, geralmente, de um delineamento genético denominado de cruzamentos dialélicos, em que uma série de materiais são cruzados entre si em todas as combinações possíveis. Esses cruzamentos e as populações parentais são avaliados em experimentos com repetições e a partir das médias dessas é possível se estimar as heteroses de cada cruzamento e suas significâncias, assim como um parâmetro denominado de capacidade específica de combinação que mensura a complementação das linhagens quanto aos alelos favoráveis nos locos com níveis altos de dominância.

As populações base são, então, formadas ou produzidas dentro de cada grupo heterótico. Podem ser formadas populações de base genética ampla que são produzidas pelo intercruzamento de diversas populações, ou populações de base genética restrita denominadas de sintéticos e que são produzidas pelo intercruzamento de algumas linhagens homozigóticas e, também, as populações formadas pelo cruzamentos de duas linhagens (cruzamentos biparentais). Essas linhagens ou populações utilizadas para se formar novas populações são escolhidas baseando-se nas suas *performances per se* e em cruzamentos com materiais de outros grupos heteróticos (Hallauer, 1990).

5.3 TIPOS DE HÍBRIDOS

Os tipos de híbridos encontrados no mercado são: híbridos simples, híbridos triplos e híbridos duplos. Um híbrido simples é produzido pelo cruzamento de duas linhagens; um híbrido triplo é produzido pelo cruzamento de um híbrido simples com uma linhagem; e um híbrido duplo é produzido pelo cruzamento de dois híbridos simples. Como visto no item anterior, os híbridos são produzidos por linhagens oriundas de grupos heteróticos distintos visando capitalizar a heterose. Assim, os híbridos simples são produzidos por cruzamentos de linhagens oriundas de um grupo heterótico A com linhagens de outro grupo heterótico B; os híbridos triplos são produzidos pelo cruzamento de um híbrido simples, oriundo do cruzamento de duas linhagens do mesmo grupo heterótico (por exemplo A), com uma linhagem de outro grupo heterótico B; e os híbridos duplos são produzidos pelo cruzamento de um híbrido simples oriundo do cruzamento de duas linhagens do mesmo grupo heterótico, por exemplo A, com outro híbrido simples oriundo do cruzamento de duas linhagens do mesmo grupo heterótico, por exemplo B.

Como as populações de espécies alógamas apresentam elevada depressão por endogamia, as linhagens endogâmicas geralmente apresentam baixa produtividade, o que pode tornar inexeqüível a produção de híbridos simples para algumas espécies. Assim, os híbridos triplos e duplos foram propostos para se contornar esse problema, uma vez que, ao contrário dos híbridos simples, as sementes destes híbridos são colhidas em híbridos simples que são muito mais produtivos que as linhagens pois nestes a depressão por endogamia é nula.

Para a produção de um híbrido simples são necessários dois campos para a multiplicação das linhagens e outro campo para a produção do híbrido simples, isto é são necessários três campos para a sua produção. Para um híbrido triplo, são necessários cinco campos para a sua produção, isto é, três campos de multiplicação das linhagens, um para a produção do híbrido simples e outro para a produção do híbrido triplo. Finalmente, para o híbrido duplo, são necessários sete campos, isto é,

quatro campos para a multiplicação das linhagens, dois campos para a produção dos híbridos simples e outro para a produção do híbrido duplo.

Além desses tipos de híbridos, que são os mais comuns, existem os híbridos simples obtidos de linhagens irmãs. Neste caso, linhagens aparentadas são desenvolvidas e os cruzamentos destas geram as linhagens denominadas de modificadas, uma vez que cruzamentos de linhagens aparentadas geram linhagens por terem um certo nível de endogamia. As linhagens modificadas de um determinado grupo heterótico podem ser cruzadas com linhagens modificadas ou não de outro grupo heterótico gerando os híbridos simples modificados. Esses tipos de híbridos foram propostos para se reduzir os custos de produção dos híbridos simples, uma vez que neste caso as sementes são colhidas nas linhagens modificadas que têm um nível de endogamia menor que as linhagens endogâmicas ou puras e, conseqüentemente, são mais produtivas.

5.4 OBTENÇÃO DE LINHAGENS

Como visto, os híbridos são produzidos de cruzamentos de linhagens e híbridos simples pertencentes a grupos heteróticos distintos para explorar a heterose dos cruzamentos das populações e, também, viu-se que os híbridos correspondem a genótipos existentes nos híbridos interpopulacionais. Portanto, a média de um híbrido interpopulacional corresponde à média de todos os híbridos produzidos de cruzamentos de linhagens extraídas das populações que geraram o híbrido interpopulacional. Desse modo, as *performances* de híbridos interpopulacionais são indicativos das *performances* dos híbridos de linhagens e, conseqüentemente, devem servir como base para a seleção das populações que serão utilizadas para a extração de linhagens. Outro aspecto que deve ser considerado é a depressão por endogamia dessas populações, uma vez que esta é, geralmente, muito elevada, e as linhagens devem ter um nível de *performance* mínimo para serem utilizadas comercialmente. Então, além da *performance* em cruzamentos, as populações devem ser avaliadas quanto à depressão por endogamia e selecionadas aquelas menos sensíveis à endogamia.

Escolhidas as populações, estas são submetidas a endogamia para se obter as linhagens. O processo mais rápido para se obter as linhagens se dá pela utilização de autofecundações sucessivas. Nesse processo, o nível de heterozigose é reduzido à metade em cada geração de autofecundação, de forma que na primeira geração de autofecundação (S_1) tem-se 50,00% de locos em homozigose, na segunda geração (S_2) 75,00%, na terceira geração (S_3) 87,50%, na quarta geração (S_4) 93,75%, na quinta geração (S_5) cerca de 96,88%, na sexta geração (S_6) cerca de 98,44% e na sétima geração (S_7) cerca de 99,22%. Na sétima geração de autofecundação, portanto, quase 100,00% dos locos estão em homozigose e, para fins de melhoramento, considera-se que as plantas já atingiram a homozigose. Nesta geração, as linhagens estão com os caracteres fixados e são facilmente distinguíveis umas das outras e, também, as variações entre plantas dentro de cada linhagem são praticamente imperceptíveis.

As populações sob autofecundações sucessivas são conduzidas pelo método denominado de genealógico (Hallauer, 1990). Este método é utilizado para o melhoramento de espécies autógamas e que, portanto, encontra-se descrito em detalhes

no capítulo referente ao melhoramento dessas espécies. Durante as gerações de autofecundação pratica-se alta intensidade de seleção para os caracteres de alta herdabilidade e descartam-se aquelas linhagens com elevada depressão por endogamia, isto é, aquelas com vigor muito reduzido e, portanto, pouco produtivas. Quando atinge-se a sexta ou sétima geração de autofecundação, em que os locos estão praticamente homozigotos com os caracteres fixados, enfatiza-se a seleção para produção de grãos que é um caráter de baixa herdabilidade. Nesta fase, portanto, as linhagens são selecionadas pelas suas *performances per se*, uma vez que para serem utilizadas na produção comercial de híbridos estas devem ter um nível mínimo de produtividade e excelentes características agronômicas como resistência à pragas e doenças, acamamento, etc. Em cada geração são mantidas as genealogias de cada linhagem com suas respectivas características para auxiliar a seleção e, também, para se conhecer o nível de parentesco destas.

5.5 SELEÇÃO DE LINHAGENS E HÍBRIDOS

Após a obtenção das linhagens selecionadas pela suas *performances per se*, estas deveriam ser avaliadas em cruzamentos com linhagens oriundas de populações de outro grupo heterótico, gerando os híbridos, para se proceder a seleção final daquelas que comporiam os híbridos a serem liberados comercialmente. Entretanto, o número de híbridos que podem ser produzidos a partir de um número baixo de linhagens é muito grande o que impede a obtenção e avaliação de todos os híbridos possíveis. Sendo n_1 e n_2 o número de linhagens de populações oriundas dos grupos heteróticos 1 e 2, respectivamente, o número de híbridos simples (NHS), duplos (NHT) e triplos (NHT) possíveis são: NHS = $n_1.n_2$; NHT= $n_1.n_2.(n_1-1)/2$ e NHT = $n_1.n_2.(n_2-1)/2$ para híbridos simples oriundos dos grupos 1 e 2, respectivamente, e NHD = $n_1.n_2.(n_1-1).(n_2-1)/4$. Por exemplo, para 100 linhagens de cada grupo podem ser obtidos 10.000 híbridos simples, 495.000 híbridos triplos de cada tipo e 24.502.500 híbridos duplos. Como para um programa de melhoramento o número de linhagens utilizado como exemplo é baixo, verifica-se a inexequibilidade de obtenção e avaliação de todos os híbridos possíveis de serem obtidos e avaliados em experimentos com repetições.

A correlação entre as *performances per se* das linhagens e as de seus híbridos é alta para os caracteres de alta herdabilidade, média para os caracteres de herdabilidade mediana e baixa para os caracteres de baixa herdabilidade. Portanto, para os caracteres de alta e mediana herdabilidade as *performances* das linhagens podem servir para prever as *performances* dos híbridos, mas para os caracteres de baixa herdabilidade, como produção de grãos, as *performances* das linhagens não podem ser utilizadas para prever as dos híbridos, uma vez que a correlação entre as linhagens e híbridos não tem valor preditivo. Como, geralmente, os caracteres de maior importância econômica se enquadram nesta última categoria, existe uma dificuldade inerente de prever a *performance* de híbridos com base nas das linhagens.

Assim, como o número de híbridos possíveis de serem obtidos é muito alto e não é possível a seleção dos mesmos a partir das *performances* das linhagens para os caracteres de baixa herdabilidade, deve-se fazer uma seleção prévia das linhagens para reduzir o seu número e, conseqüentemente, permitir produzir os híbridos para

serem avaliados e selecionados. A técnica utilizada para isso é denominada de seleção para capacidade de combinação. Para isso, as linhagens de um grupo heterótico são cruzadas com algum material de outro grupo heterótico e estes cruzamentos, denominados de *testcrosses*, são avaliados em experimentos com repetições em diversos locais. Os *testcrosses* que apresentarem *performances* superiores são selecionados e referem-se às linhagens que têm a maior concentração de alelos favoráveis, isto é aquelas que apresentarem capacidades de combinação superiores. Evidentemente, isso é feito para as linhagens extraídas de cada grupo heterótico. Nesta fase a intensidade de seleção é alta para reduzir o número de linhagens e permitir a obtenção de todos híbridos simples interpopulacionais. A seguir, as linhagens selecionadas dos dois grupos heteróticos são cruzadas em um esquema dialélico, onde são produzidos os híbridos simples, e estes são avaliados em experimentos com repetições em diversos locais e, muitas vezes, em alguns anos. Com os dados das médias dessas avaliações, pode-se, então, selecionar o(s) híbrido(s) simples superior(es) que poderá(ão) ser liberado(s) como cultivar(es) comercial(is).

Para a produção de híbridos triplos e duplos o problema permanece, isto é, com um pequeno número de linhagens são possíveis de serem obtidos um número muito alto desses tipos de híbridos. Por exemplo, com apenas 20 linhagens extraídas de cada um dos dois grupos heteróticos, o número de híbridos triplos é de 3.800 de cada tipo totalizando 7.600 híbridos, e o número de híbridos duplos é de 36.100. Esse exemplo, mostra a inexequibilidade de serem obtidos e avaliados em experimentos com repetições os híbridos que podem ser obtidos com um número pequeno de linhagens.

Entretanto, é possível de se predizer as *performances* dos híbridos triplos e duplos a partir das *performances* dos híbridos simples a partir das seguintes expressões (Vencovsky & Barriga,1992):

$$HT_{(ij)(k)} = (1/2)[\ HS_{(ik)} + HS_{(jk)}] \text{ e}$$

$$HD_{(ij)(kl)} = (1/4)[HS_{(ik)} + HS_{(il)} + HS_{(jk)} + HS_{(jl)}],$$

onde $HT_{(ij)(k)}$ refere-se à média predita do híbrido triplo formado pelo cruzamento do híbrido simples, oriundo do cruzamento das linhagens i e j, com a linhagem k; $HD_{(ij)(kl)}$ refere-se à média predita do híbrido duplo formado pelo cruzamento dos híbridos simples (ij) com (kl), $HS_{(ik)}$, $HS_{(il)}$, $HS_{(jk)}$ e $HS_{(jl)}$ referem-se às médias dos híbridos simples avaliados.

Verifica-se por essas expressões, que as médias preditas dos híbridos triplos e duplos referem-se às médias dos híbridos simples não parentais, isto é, dos híbridos simples que não participam na formação dos híbridos a serem preditos. Com essas expressões, portanto, pode-se prever as *performances* de todos os híbridos triplos e duplos possíveis para todos os caracteres sob seleção. A partir das médias preditas, pratica-se elevada intensidade de seleção e apenas aqueles selecionados serão avaliados em experimentos com repetições em diversos locais e anos para se proceder a seleção final dos híbridos triplos e duplos superiores que poderão ser liberados como cultivares comerciais.

Ressalte-se que quando se dispõe de linhagens elites de um determinado grupo heterótico, estas podem ser utilizadas como testadoras das linhagens obtidas. Assim, se o objetivo do programa de melhoramento é a produção de híbridos simples, o número de cruzamentos a serem avaliados refere-se ao número de linhagens elites testadoras multiplicado pelo número de linhagens. Mas, com diversas linhagens testadoras, o número de híbridos simples a ser avaliado pode ainda ser alto. Assim, normalmente, as linhagens obtidas são cruzadas com uma ou duas linhagens elites, e esses cruzamentos são avaliados em experimentos com repetições. Com as médias desses híbridos simples pratica-se dois tipos de seleção: a) uma seleção visando a produção de híbridos simples com estas linhagens elites testadoras e, neste caso, uma alta intensidade de seleção é aplicada, e b) uma seleção para capacidade de combinação onde é aplicada uma intensidade de seleção mediana. As linhagens selecionadas em (b) são novamente cruzadas com outras linhagens elites e serão submetidas novamente aos esquemas seletivos (a) e (b) até se esgotarem as linhagens elites. O esquema (b) de seleção é utilizado devido ao fato de as correlações entre as capacidades de combinação das linhagens com diversos tipos de testadores serem muito baixas para se ter algum valor preditivo e, portanto, uma alta intensidade de seleção só pode ser aplicada para um testador específico pois a probabilidade de selecionar linhagens com alta capacidade de combinação para testadores distintos é muito baixa. Entretanto, com uma intensidade de seleção mediana é possível selecionar as linhagens que possuem concentrações de alelos favoráveis mais elevados. Assim, o descarte das linhagens inferiores é feito por etapas. Evidentemente, o mesmo procedimento pode ser adotado quando o objetivo do programa de melhoramento é a produção de híbridos triplos. Neste caso, os testadores de um grupo de linhagens serão híbridos simples obtidos do cruzamentos de linhagens de um grupo heterótico diferente das linhagens a serem avaliadas.

5.6 SELEÇÃO PRECOCE

A seleção para capacidade de combinação das linhagens quando realizada em gerações precoces de endogamia, isto é, antes de atingir a geração S_6 ou S_7 de endogamia, aumenta a eficiência do processo. Isto porque o número de linhagens seria reduzido substancialmente antes de atingir a homozigose completa o que reduziria a quantidade de recursos e esforços envolvidos nas atividades de autofecundação. Além disso, o programa iria se concentrar em um número menor de linhagens e, também, ampliar o programa pois com a redução do número de linhagens precocemente pode-se aumentar o número de populações que serão submetidas à autofecundação.

A seleção precoce só será possível de ser aplicada se a correlação dos *testcrosses* das linhagens parcialmente endogâmicas e os *testcrosses* dessas mesmas linhagens quando atingirem a homozigose, isto é, nas gerações S_6 ou S_7, apresentar valor elevado. Nestas condições as posições relativas desses *testcrosses* não se altera e, portanto, as linhagens selecionadas precocemente seriam as mesmas selecionadas no final do processo quando as linhagens já estariam totalmente homozigotas. Entretanto, se esta correlação for baixa, a seleção precoce não é possível de ser aplicada uma vez que as linhagens parcialmente endogâmicas selecionadas seriam diferentes das linhagens homozigotas ou puras selecionadas.

Considere, então, um grupo de linhagens que serão avaliadas na geração n de endogamia, linhagens parcialmente endogâmicas, e essas mesmas linhagens quando atingirem a homozigose após seis ou sete gerações de autofecundação na geração n', sendo que ambos os grupos de linhagens serão avaliados em *testcrosses* para capacidade de combinação. A correlação genética entre as médias dos *testcrosses* nas gerações n e n' é (Bernardo, 1991):

$$r_G(n,n') = \sqrt{(1+F_n)/(1+F_{n'})}$$

onde F_n e $F_{n'}$ correspondem aos coeficientes de endogamia das gerações n e n' de endogamia das linhagens.

Assim, a correlação genética das médias de *testcrosses* das mesmas linhagens avaliadas em duas gerações de endogamia (n'> n) depende apenas dos coeficientes de endogamia das linhagens. Evidentemente, a correlação entre *testcrosses* de linhagens com endogamia parcial e de linhagens homozigóticas onde $F_{n'} = 1,0$ é:

$$r_G(n,n') = \sqrt{(1+Fn)/2}$$

Os valores das correlações genéticas entre os *testcrosses* das linhagens em diversas gerações de endogamia, apresentados na Tabela 2, mostram que esta aumenta com o aumento do nível de endogamia da geração n. O valor mínimo da correlação é de 0,71 envolvendo linhagens S_1 da geração n e linhagens homozigóticas da geração n'. Como os valores das correlações aumentam a partir daí, pode-se verificar que a capacidade de combinação das linhagens são determinadas em gerações precoces e permanecem relativamente estáveis com o decorrer das gerações de autofecundação. A partir de linhagens S_3 da geração n, a correlação com S∞ já pode ser considerada muito elevada ($r_G(n,n')$=0,93), e os acréscimos para as demais gerações são muito pequenos. Portanto, a geração S_3 deve ser considerada ideal para se praticar a seleção precoce, isto é, não existem argumentos técnicos para se postergar a avaliação e seleção das linhagens para capacidade de combinação além dessa geração.

TABELA 2. Correlações genéticas entre médias de *testcrosses* de linhagens em duas gerações de endogamia n e n' (n' > n).

Geração n			Geração n'						
Planta	Linhagem	Fn*	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S∞
S_0	S_1	0	0,82	0,76	0,73	0,72	0,71	0,71	0,71
S_1	S_2	1/2		0,92	0,89	0,88	0,87	0,87	0,87
S_2	S_0	3/4			0,97	0,95	0,94	0,94	0,93
S_3	S_4	7/8				0,98	0,97	0,97	0,97
S_4	S_5	15/16					0,99	0,99	0,98
S_5	S_6	31/32						1,00	1,00

* F_n e $F_{n'}$ correspondem aos coeficientes de endogamia das plantas que geram as linhagens.

5.7 RESPOSTAS À SELEÇÃO E COMPARAÇÕES DOS TIPOS DE HÍBRIDOS

Diversos tipos de híbridos podem ser produzidos, como visto anteriormente. A escolha do tipo de híbrido depende de uma série de fatores como as peculiaridades de cada espécie e as condições sócio-econômicas de cada região. Dessa forma, é preciso conhecer as respostas à seleção de cada tipo de híbrido para que se possa compará-los, uma vez que quanto maior a resposta à seleção melhor será a *performance* do híbrido. Com isso, pode-se selecionar o tipo de híbrido que melhor preencha os requisitos de melhor *performance* para uma dada situação.

A resposta à seleção de híbridos é: $Rs = i\sigma^2_H / \sigma_{FH}$, onde i é o diferencial de seleção estandardizado, σ^2_H é a variância genética de híbridos e σ_{FH} é o desvio padrão fenotípico de médias de híbridos. A variância fenotípica de médias de híbridos é: $\sigma^2_{FH} = \sigma^2_H + \sigma^2_{HL}/L + \sigma^2/RL$, onde σ^2_H é a variância genética de híbridos, σ^2_{HL} é a variância da interação híbridos por locais, σ^2 é a variância residual (erro), R é o número de repetições e L o número de locais de avaliação. Evidentemente, σ_{FH} refere-se à raiz quadrada da variância fenotípica. Dessa forma, deduzindo-se as variâncias genéticas dos diferentes tipos de híbridos têm-se as respostas à seleção correspondentes.

Para a dedução das variâncias genéticas de híbridos, utilizam-se de conceitos de covariâncias genéticas entre parentes (Souza Jr., 1989) que não serão apresentadas por não serem do escopo desse livro. Também, como os híbridos são produzidos via cruzamentos de linhagens de populações alocadas em diferentes grupos heteróticos, as variâncias genéticas de híbridos são ao nível interpopulacional. Denominando as populações de onde foram extraídas as linhagens de 1 e 2, a variância genética interpopulacional, isto é, a variância genética da geração F_1 do cruzamento dessas populações é (Souza Jr., 1988; 1997): $\sigma^2_{G(12)} = (1/2)[\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}] + \sigma^2_{D(12)}$, ou definindo $\sigma^2_{A(12)} = (1/2)[\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}]$, a variância genética interpopulacional é: $\sigma^2_{G(12)} = \sigma^2_{A(12)} + \sigma^2_{D(12)}$. Nessas expressões, σ^2_{A12} é a variância genética aditiva interpopulacional com a população 1 de referência, σ^2_{A21} é a variância genética aditiva interpopulacional com a população 2 de referência e $\sigma^2_{D(12)}$ é a variância genética dominante interpopulacional.

A variância genética interpopulacional de híbridos é: $\sigma^2_H = c_1\sigma^2_{A12} + c_2\sigma^2_{A21} + c_{12}\sigma^2_{D(12)}$, onde c_1, c_2 e c_{12} são funções de parâmetros relacionados ao parentesco dos diferentes tipos de híbridos (Souza Jr., 1988; 1997). Para qualquer nível de endogamia das linhagens, as variâncias genéticas dos diferentes tipos híbridos são (Souza Jr., 1992):

$$\sigma^2_{HS} = (1/4)(1+F)\sigma^2_{A12} + (1/4)(1+F)\sigma^2_{A21} + (1/4)(1+F)^2\sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HTI} = (1/8)(1+F)\sigma^2_{A12} + (1/4)(1+F)\sigma^2_{A21} + (1/8)(1+F)^2\sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HTII} = (1/4)(1+F)\sigma^2_{A12} + (1/8)(1+F)\sigma^2_{A21} + (1/8)(1+F)^2\sigma^2_{D(12)} \text{ e}$$

$$\sigma^2_{HD} = (1/8)(1+F)\sigma^2_{A12} + (1/8)(1+F)\sigma^2_{A21} + (1/16)(1+F)^2\sigma^2_{D(12)},$$

onde σ^2_{HS}, σ^2_{HTI}, σ^2_{HTII} e σ^2_{HD} referem-se às variâncias genéticas de híbridos simples, híbridos triplos tipo I e tipo II e de híbridos duplos, respectivamente. Tem-se dois tipos de híbridos triplos, onde no tipo I o híbrido simples é oriundo da população 1 e a linhagem é oriunda da população 2, e no tipo II o híbrido simples e a linhagem são oriundos das populações 2 e 1, respectivamente. Nestas expressões, o coeficiente de endogamia (F) refere-se à planta que deu origem à linhagem e não ao da linhagem. Por exemplo, para linhagens S_1 o coeficiente de endogamia a ser utilizado nessas expressões não é ½, que é o F de linhagens S_1, mas sim 0,0 que é o coeficiente de endogamia da planta que a originou. Estas expressões foram deduzidas de forma geral, isto é, para qualquer nível de endogamia das linhagens e, portanto, substituindo-se os valores apropriados de F nelas tem-se as variâncias genéticas de qualquer tipo de híbrido para qualquer nível de endogamia das linhagens.

A situação mais comum é ter-se estes tipos de híbridos produzidos a partir de linhagens completamente homozigotas (F=1,0). Neste caso, as variâncias genéticas desses híbridos são:

$$\sigma^2_{HS} = (1/2)\sigma^2_{A12} + (1/2)\sigma^2_{A21} + \sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HTI} = (1/4)\sigma^2_{A12} + (1/2)\sigma^2_{A21} + (1/2)\sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HTII} = (1/2)\sigma^2_{A12} + (1/4)\sigma^2_{A21} + (1/2)\sigma^2_{D(12)} \text{ e}$$

$$\sigma^2_{HD} = (1/4)\sigma^2_{A12} + (1/4)\sigma^2_{A21} + (1/4)\sigma^2_{D(12)}.$$

Esses resultados mostram que a variância genética de híbridos simples é superior às dos híbridos triplos e, este último, é superior ao dos híbridos duplos, isto é: $\sigma^2_{HS} > \sigma^2_{HT} > \sigma^2_{HD}$. Para um caráter complexo como a produção de grãos que é muito afetado pelas condições ambientais, a variância fenotípica, como visto anteriormente, é, obviamente, também, muito afetada pelas variações ambientais e pelas interações genótipo-ambiente. Nesse caso, as variâncias fenotípicas dos diferentes tipos de híbridos apresentarão valores muito próximos. Portanto, as respostas à seleção para os diferentes tipos de híbridos serão funções de suas variâncias genéticas. Conseqüentemente, as respostas à seleção seguem a mesma ordem de grandeza e seqüência que as variâncias genéticas e, então, $Rs_{HS} > Rs_{HT} > Rs_{HD}$. Note-se que σ^2_{HS} contém toda a variância genética e, portanto, na seleção de híbridos simples explora-se toda a variabilidade genética disponível; a σ^2_{HT} contém parte da variância genética total, mas muito maior que a σ^2_{HD}. Assim, de uma mesma fonte, os híbridos simples selecionados serão sempre superiores aos híbridos triplos selecionados e, estes, serão sempre superiores aos híbridos duplos selecionados. Dessa forma, sempre que possível, deve-se optar pelo uso de híbridos simples, seguidos dos híbridos triplos e duplos.

Quando não for possível de serem obtidas linhagens endogâmicas devido à depressão endogâmica ser muito elevada, uma forma de contornar esse problema seria a utilização de linhagens parcialmente endogâmicas. Linhagens S_1 ou S_2 ainda

apresentam muita variabilidade genética dentro, o que poderia dificultar sobremaneira a sua manutenção, mas linhagens S_3 em que o coeficiente de endogamia é F = 0,875, o que significa que em média 87,50% dos locos estão em homozigose, a variabilidade genética dentro de linhagens é muito baixa o que pode viabilizar o uso deste tipo de linhagem para se produzir híbridos simples. A variância genética de híbridos simples obtidos a partir de linhagens S_3 é:

$$\sigma^2_{HS(S3)} = (0{,}438)\sigma^2_{A12} + (0.438)\sigma^2_{A21} + (0{,}766)\sigma^2_{D(12)}.$$

Note que a variância de híbridos simples obtidos de linhagens S_3 é próxima da de híbridos simples de linhagens completamente endogâmicas; é superior à variância genética de híbridos triplos e, também, superior à de híbridos duplos. Dessa forma, híbridos simples de linhagens S_3 selecionados devem apresentar *performances* próximas as de híbridos simples e superiores as de híbridos triplos e de duplos de linhagens homozigóticas. Evidentemente, a superioridade de híbridos simples de linhagens S_3 é maior em relação aos híbridos duplos que em relação aos híbridos triplos. A produtividade de linhagens S_3 é superior à de linhagens completamente endogâmicas o que deve acarretar redução dos custos de produção de sementes desse tipo de híbrido.

As variâncias genéticas de híbridos simples modificados são (Souza Jr., 1992):

$$\sigma^2_{HSMI} = (1/4)(1+F_{LM})\sigma^2_{A12} + (1/4)(1+F_{LM})\sigma^2_{A21} + (1/4)(1+F_{LM})^2\sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HSMII} = (1/4)(1+F_{LM})\sigma^2_{A12} + (1/2)\sigma^2_{A21} + (1/2)(1+F_{LM})\sigma^2_{D(12)},$$

$$\sigma^2_{HSMIII} = (1/2)\sigma^2_{A12} + (1/4)(1+F_{LM})\sigma^2_{A21} + (1/2)(1+F_{LM})\sigma^2_{D(12)},$$

onde σ^2_{HSMI}, σ^2_{HSMII} e σ^2_{HSMIII} referem-se às variâncias genéticas dos híbridos simples modificados tipo I, tipo II e tipo III, respectivamente. No tipo I as duas linhagens que formam o híbrido simples são modificadas, isto é, são formadas pelo cruzamento de linhagens aparentadas; no tipo II uma linhagem modificada oriunda da população 1 é cruzada com uma linhagem pura oriunda da população 2, e no tipo III a linhagem pura da população 1 é cruzada com uma linhagem modificada da população 2. O coeficiente de endogamia (F_{LM}) das linhagens modificadas, isto é, do cruzamento das linhagens irmãs, é expresso por: $F_{LM} = (1/2)(1+F_p)$, onde F_p é o coeficiente de endogamia da planta que gera a progênie em que as linhagens irmãs foram isoladas. Por exemplo, se as linhagens irmãs foram isoladas na geração S_2 de endogamia, tem-se F_p = ½ e, portanto, F_{LM} = ¾. Note que as linhagens utilizadas são endogâmicas, os cruzamentos de linhagens irmãs geram linhagens com níveis de endogamia inferiores a 1,0 e, portanto, são mais produtivas que as linhagens puras. Também, o nível de endogamia das linhagens modificadas dependem da geração em que foram isoladas. Evidentemente, quanto menor o parentesco das linhagens, maior a produtividade das linhagens modificadas.

O híbrido simples modificado tipo I é produzido a partir do cruzamento de duas linhagens modificadas, enquanto os tipos II e III são produzidos à partir do cruzamento de uma linhagem modificada com uma linhagem pura. Devido a isso, as variâncias genéticas dos tipos II e III são superiores às do tipo I e, portanto, a resposta à seleção dos tipos II e III são superiores aos do tipo I, para qualquer nível de endogamia das linhagens modificadas. A variância genética do tipo I é superior à do híbrido duplo de linhagens endogâmicas para qualquer nível de endogamia das linhagens modificadas, e a partir da geração S_2 de parentesco das linhagens modificadas a variância genética deste tipo de híbrido é superior à do híbrido triplo de linhagens endogâmicas. Como a resposta à seleção segue a ordem das variâncias genéticas, a partir da geração S_2 de parentesco das linhagens irmãs, os híbridos simples tipo I selecionados apresentarão *performance* superiores aos dos híbridos triplos normais. Os tipos II e III apresentam variância genética superior à do híbrido triplo em qualquer geração de parentesco das linhagens irmãs e, desse modo, os híbridos simples modificados selecionados apresentarão *performances* superiores aos híbridos triplos normais selecionados.

A partir da geração S_2 de parentesco das linhagens irmãs, as variâncias genéticas dos híbridos simples modificados tipos II e III aproximam-se bastante da variância genética de híbridos simples normais, isto é:

$$\sigma^2_{HSMII} = (0{,}438)\sigma^2_{A12} + (0{,}500)\sigma^2_{A21} + (0{,}875)\sigma^2_{D(12)} \quad \text{e}$$

$$\sigma^2_{HSN} = (0{,}500)\sigma^2_{A12} + (0{,}500)\sigma^2_{A21} + (1{,}000)\sigma^2_{D(12)}$$

e, assim, podem ser selecionados híbridos simples modificados tipos II ou III cujas *performances* se aproximam bastante das dos híbridos simples normais. Neste caso, o vigor das linhagens modificadas, onde serão colhidas as sementes, será igual a de linhagens S_2 e, conseqüentemente, muito mais produtivas que linhagens completamente endogâmicas.

Deve-se notar, que à medida que o nível de parentesco das linhagens modificadas aumenta, as variâncias genéticas desses híbridos modificados se aproximam das dos híbridos simples normais. Entretanto, o vigor das linhagens modificadas diminui o que reduz a vantagem desses tipos de híbridos em relação aos híbridos simples normais. Devido a isso, as linhagens irmãs devem ser isoladas nas gerações mais precoces possível e, como mostra a comparação acima, a geração S_2 parece ser a mais apropriada para esse objetivo, isto é, obter híbridos cujas *performances* se aproximem das dos híbridos simples normais e com redução dos custos de produção de sementes.

Para tentar resolver o problema da depressão por endogamia, Mota (1984) sugeriu o uso de híbridos produzidos a partir de progênies de meios-irmãos, e Cordova (1986) sugeriu o uso de híbridos produzidos a partir de progênies de irmãos germanos. Dessa forma, progênies, ao invés de linhagens, seriam produzidas, selecionadas e utilizadas para a obtenção de híbridos. As variâncias genéticas destes tipos de híbridos são (Souza Jr., 1992):

$$\sigma^2_{HMI} = (1/16)(\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}) + (1/64)\sigma^2_{D(12)} \text{ e}$$

$$\sigma^2_{HIG} = (1/8)(\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}) + (1/16)\sigma^2_{D(12)},$$

onde σ^2_{HMI} e σ^2_{HIG} referem-se às variâncias de híbridos de meios-irmãos e de irmãos germanos, repectivamente.

Nota-se, portanto, que a seleção destes tipos de híbridos exploram muito pouco a variância genética total e, conseqüentemente, estes tipos de híbridos selecionados deverão apresentar *performances* muito inferiores aos dos híbridos de linhagens endogâmicas. Além disso, devido ao tempo necessário para se obter, avaliar e selecionar estes tipos de progênies e das dificuldades em se manter a integridade genética dessas progênies, o uso desses tipos de híbridos não seria recomendável.

5.8 MELHORAMENTO DE LINHAGENS ELITES

As linhagens elites, isto é, aquelas que são utilizadas para a produção de híbridos comerciais, possuem uma série de características desejáveis já selecionadas devido a alta concentração de alelos favoráveis. Entretanto, estas linhagens não contêm todos os alelos favoráveis que se encontram espalhados nas diversas linhagens e, com isso, procura-se concentrar os alelos favoráveis que se encontram nas diversas linhagens em poucos genótipos, isto é, nas novas linhagens. Esse processo é geralmente denominado de reciclagem de linhagens. Desse modo, essas linhagens são os materiais mais apropriados para a formação de novas populações base como sintéticos, F_2's e retrocruzamentos. Com isso, procura-se aproveitar dos efeitos da seleção praticados para a obtenção dessas (Bauman, 1977; Hallauer, 1990).

As populações são obtidas a partir de cruzamentos de linhagens pertencentes ao mesmo grupo heterótico. Os cruzamentos são feitos, seja para obter populações F_2's, sintéticos ou retrocruzamentos, e a partir desses, obtêm-se as novas linhagens através de autofecundações sucessivas seguindo o método genealógico. Os retrocruzamentos são utilizados quando uma linhagem elite possui algumas características desfavoráveis que se encontram em linhagens consideradas não elites, denominadas de doadoras. Nesse processo a linhagem elite é cruzada com a doadora e, a seguir, diversos retrocruzamentos são feitos para a linhagem elite acompanhado de intensa seleção para incorporar os caracteres desejáveis e para a recuperação, pelo menos parcial, da *performance* da linhagem elite. Normalmente, podem ser feitos dois ou três retrocruzamentos para a linhagem elite, que recuperam de 75,0% a 87,5% do genoma desta, respectivamente, e na seqüência esses materiais são submetidos de três a quatro gerações de autofecundações sucessivas selecionando-se intensamente para os caracteres que se desejam transferir e tentando-se obter novas linhagens com fenótipos similares às da linhagem elite. O número de retrocruzamentos depende da divergência genética das linhagens parentais e quanto mais diferentes em *performance* forem essas linhagens maior deve ser o número de retrocruzamentos e vice-versa.

A transferência de caracteres qualitativos ou quantitativos de alta herdabilidade pode ser feita utilizando-se o processo do retrocruzamento. Mas esse processo difere do anterior devido ao fato que nesse caso procura-se recuperar a quase totalidade do

genoma da linhagem elite parental. Por exemplo, para a transferência de apenas um alelo, no final do processo deve-se obter a linhagem original com apenas esse alelo transferido. Nestes programas, portanto, o número de retrocruzamentos é maior que o anterior. Geralmente são feitos seis a sete gerações de retrocruzamentos para a linhagem elite para garantir a sua recuperação. Para os caracteres de alta herdabilidade, o processo é similar, mas o número de plantas a serem manipuladas deve ser maior para que a seleção possa ser efetiva. Também, dificilmente a linhagem elite parental será totalmente recuperada.

O melhoramento de linhagens utilizando-se desses processos faz parte da rotina dos programas de desenvolvimento de híbridos. Assim, dentro de cada grupo heterótico, procura-se incorporar em poucas linhagens a maior quantidade possível de alelos favoráveis de todos os caracteres de importância econômica e/ou agronômica. Visa-se, com esse procedimento, liberar híbridos comerciais com regularidade e com economia de tempo. Dessa forma, esse processo é cíclico, levando ao melhoramento de linhagens e híbridos de uma forma contínua. Entretanto, com o decorrer do tempo a base genética do germoplasma dos programas de melhoramento será reduzida e, conseqüentemente, o ganho genético ficará comprometido, isto é, as taxas de melhoramento irão reduzir. Para evitar isso, é necessário incorporar novas linhagens obtidas de populações que não tenham sido produzidas a partir de cruzamentos das linhagens elites disponíveis. Para isso, populações de ampla base genética, ou mesmo de base genética restrita, são submetidas a um processo denominado de seleção recorrente que visa prepará-las para que possam ser utilizadas para os programas de desenvolvimento de híbridos.

6. SELEÇÃO RECORRENTE

A seleção de clones superiores em espécies de propagação assexuada e de híbridos em espécies que não têm propagação assexuada permitem a extração dos genótipos superiores de uma população, que são liberados como cultivares comerciais. Neste tipo de programa as populações, normalmente, tem base genética restrita e não há nenhuma preocupação na manutenção da variabilidade genética destas, isto é, a variabilidade genética destas populações é esgotada no final do processo e novas populações são formadas via reciclagem dos clones superiores ou de linhagens elites. Assim, com o decorrer dos programas de melhoramento ocorre uma inevitável redução da variabilidade genética que limita as taxas de melhoramento. Outro aspecto, é que destas populações são extraídos os genótipos superiores e, portanto, novas amostragens nas mesmas populações não serão capazes de permitir a seleção de genótipos superiores àqueles já extraídos (Souza Jr. & Zinsly, 1985).

Para contornar esse problema, foi sugerido o uso de uma tecnologia denominada de Seleção Recorrente, que designa todo processo cíclico de melhoramento. O objetivo desta tecnologia é melhorar a *performance* de populações, sejam estas de base genética restrita ou ampla, de forma que possam ser utilizadas como fontes de novos híbridos ou de clones.

Na seleção recorrente, melhora-se a *performance* das populações de forma contínua e progressiva através do aumento das freqüências dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção. Este processo difere fundamentalmente da reciclagem de

linhagens ou clones devido ao fato de que a variabilidade genética deve ser mantida em níveis adequados para permitir o melhoramento nos ciclos subseqüentes. Portanto, este esquema seletivo é utilizado para programas de melhoramento delineados para médio e longo prazos. Assim, com o decorrer dos ciclos de seleção recorrente, a *performance* média da população melhora, permitindo que cada ciclo possa ser utilizado como fonte de novas linhagens ou clones. Essas linhagens ou clones podem, então, ser empregadas para a produção de novos híbridos ou clones comerciais e, também, irão participar do processo de reciclagem de materiais elites o que permite manter a base genética desses programas de desenvolvimento de cultivares em níveis adequados e, conseqüentemente, impedir a redução das taxas de melhoramento. Portanto, os programas de desenvolvimento de cultivares, sejam de híbridos ou clones, devem ter programas de seleção recorrente para manter as taxas de melhoramento em níveis adequados. Assim, programas de seleção recorrente e de desenvolvimento de cultivares são considerados complementares.

Os esquemas de seleção recorrente são classificados em duas categorias: Seleção Recorrente Intrapopulacional (SR_{Intra}) e Seleção Recorrente Interpopulacional (SR_{Inter}), também denominada de Seleção Recorrente Recíproca. Na seleção recorrente intrapopulacional o objetivo é melhorar as *performances per se* das populações, enquanto na seleção recorrente interpopulacional o objetivo é o melhoramento do cruzamento de duas populações, ou seja, do híbrido interpopulacional (Hallauer, 1985; Souza Jr., 1993; 1998).

6.1 FASES DA SELEÇÃO RECORRENTE

Com exceção da seleção fenotípica individual, também denominada de seleção massal, cada ciclo de seleção recorrente é constituído de quatro etapas: obtenção de progênies, avaliação destas em experimentos com repetições, seleção das progênies superiores e recombinação destas ou de outros tipos de progênies ou genótipos relacionados àqueles selecionados. Cada ciclo, portanto, só termina com a recombinação das progênies ou genótipos que originam a nova população. Destas etapas, apenas a avaliação das progênies em experimentos com repetições em espécies anuais deve ser realizada no ano agrícola, enquanto as demais fases como a obtenção de progênies e a recombinação podem ser realizadas fora do período agrícola normal. Este procedimento deve ser adotado para reduzir o número de anos necessários para se completar cada ciclo seletivo.

6.2 OBTENÇÃO DE PROGÊNIES

A primeira etapa da seleção recorrente consiste na obtenção de progênies que serão utilizadas para a avaliação em experimentos com repetições e/ou utilizadas para a recombinação. Em alguns processos utilizam-se do mesmo tipo de progênie para a avaliação e recombinação, enquanto em outros utilizam-se de diferentes tipos de progênies para a avaliação e recombinação. Em espécies que podem ser propagadas vegetativamente pode-se utilizar clones das plantas que deram origem às progênies para a recombinação, e em espécies perenes ou semi-perenes, em que se têm superposição de gerações, as próprias plantas que deram origem as progênies podem ser utilizadas para a recombinação.

O uso de progênies permite avaliar o valor genotípico das plantas através da *performance* fenotípica média de seus descendentes. Como esta avaliação é realizada em experimentos com repetições, as estimativas dos valores genotípicos das plantas são mais precisas do que aquelas obtidas apenas com a avaliação individual destas, uma vez que com este procedimento as contribuições dos efeitos ambientais, residuais e das interações genótipos-ambientes são reduzidas, o que aumenta a precisão das médias das progênies. Dessa forma, os caracteres cujos coeficientes de herdabilidades ao nível de planta são baixos, o que dificulta sobremaneira a seleção baseada na avaliação individual, tornam-se passíveis de seleção com alto grau de precisão, uma vez que os coeficientes de herdabilidades das médias das progênies destes caracteres têm valores muito mais elevados. Os caracteres cujos coeficientes de herdabilidades são altos ao nível de plantas devem ser selecionados por ocasião da obtenção das progênies. Assim, deve-se utilizar um número de plantas cerca de dez vezes superior ao número de progênies que se pretende obter e praticar elevadas intensidades de seleção fenotípica para os caracteres de alta e mediana herdabilidades e somente nas plantas selecionadas produzir as progênies a serem avaliadas.

O número de progênies a ser obtido deve ser decidido considerando que este deve representar a variabilidade genética da população e a intensidade de seleção a ser utilizada. Assim, o número de progênies deve ser tal que a variabilidade genética que se expresse entre e dentro de progênies represente a variabilidade genética da população de onde foram obtidas. Em milho, diversos estudos com diversos tipos de progênies têm apontado para um tamanho genético, ou tamanho efetivo populacional (N_e) mínimo de 200. Assim, como cada progênie de meios-irmãos, irmãos germanos, S_1's e S_2's tem tamanhos efetivos de 4, 2, 1 e 0,67, deve-se ter um mínimo de 50 progênies de meios-irmãos, 100 progênies de irmãos germanos, 200 progênies S_1's e de 300 progênies S_2's, respectivamente, para amostrar adequadamente a variabilidade genética da população (Omolo & Russell, 1971; Lima Neto, 1994; Pinto, 1996).

Os tipos de progênies usualmente utilizados são aqueles acima citados, isto é: progênies de meios-irmãos, irmãos germanos ou completos e progênies endogâmicas S_1 e S_2. Estes tipos de progênies podem ser utilizados simultaneamente para avaliação e recombinação ou utiliza-se um dos tipos para a avaliação (unidade de seleção) e outro tipo para a recombinação (unidade de recombinação). Por exemplo, pode-se utilizar progênies de meios-irmãos para a avaliação e S_1's para recombinação. Como será visto posteriormente, os diferentes tipos de progênies a serem recombinados permitem manipular a resposta à seleção e, também, o tamanho efetivo populacional das populações melhoradas.

6.3 AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES

As progênies obtidas são avaliadas em experimentos com repetições. Esses experimentos devem ser instalados em locais representativos do ambiente em que o material deverá ser cultivado. Usualmente, tem-se utilizado de 2 a 3 repetições por local e dois a três locais. Esta é uma fase de experimentação agrícola e, portanto, os seus princípios básicos como repetições, casualização e controle local devem ser considerados para que os experimentos forneçam dados confiáveis. Isto envolve a escolha do delineamento adequado, escolha cuidadosa dos locais onde os experimentos

são alocados, preparo uniforme das áreas experimentais, cuidados fitotécnicos aplicados uniformemente em todas as parcelas, plantio em excesso com posterior desbaste, uso de bordaduras etc.

O número de progênies a serem avaliadas é usualmente grande e, por isso, utilizam-se delineamentos experimentais como blocos incompletos, látices ou blocos casualizados com tratamentos comuns. O tamanho da parcela a ser utilizada é determinado pelo caráter mais complexo, isto é, pelo caráter de menor herdabilidade. Para outros caracteres menos complexos, usualmente, tomam-se dados em apenas parte da parcela. O número de repetições, do tamanho da parcela e o número de locais de avaliação dependem da disponibilidade de sementes por progênie, da magnitude da interação genótipo-ambiente em relação ao erro experimental e, obviamente, da disponibilidade de facilidades e recursos para o programa de melhoramento. Portanto, apesar da recomendação geral para programas de seleção recorrente é a de utilizar 2 a 3 repetições por local e dois a três locais, esses valores podem mudar com a espécie que está sendo submetida à seleção.

A avaliação das progênies é a fase mais crítica do processo de seleção recorrente por depender muito das condições climáticas e por requerer maior quantidade de recursos e tempo. O objetivo dessa fase é obter as médias de cada progênie de forma que tenham a maior precisão possível. Com essas médias tem-se os valores genotípicos médios de cada progênie e, assim, essas podem ser classificadas para serem selecionadas. Portanto, se esta fase não for bem conduzida, isto é, se a precisão experimental não for adequada, não será possível classificar de forma correta os valores genotípicos das progênies e, conseqüentemente, a seleção não será efetiva.

6.4 SELEÇÃO

A seleção das progênies superiores é baseada nas médias de seus caracteres, que são, portanto as unidades de seleção. Estas médias representam os valores genotípicos médios de cada caráter, e são obtidas dividindo-se o valor total fenotípico de cada parcela pelo número de plantas, número de repetições e de locais em que foram avaliadas. Estas médias são, então, comparadas com a média da população ou com as médias das testemunhas alocadas nos ensaios, que podem ser outras populações, híbridos ou clones comerciais, e as progênies superiores são selecionadas. O objetivo da seleção recorrente é melhorar as populações para os diversos caracteres de importância agronômica e/ou econômica. Assim, deve-se selecionar para aumentar a produtividade, diminuir o acamamento, diminuir os dias do plantio a colheita, aumentar o teor de sacarose, diminuir o teor de lignina, aumentar o teor de celulose, aumentar a resistência ou tolerância a fatores bióticos como pragas e doenças, aumentar, também, a tolerância a fatores abióticos como alumínio tóxico no solo, veranicos, etc. Evidentemente, os caracteres variam com a espécie considerada.

Para praticar seleção para todos os caracteres de forma simultânea, é preciso considerar que estes caracteres podem ser correlacionados e, portanto, a seleção em um deles pode acarretar alterações desejáveis ou indesejáveis em outros. Para contornar essa situação utilizam-se de índices de seleção. Este índice de seleção fornece um valor denominado de valor genotípico agregado de cada progênie em que são

considerados todos os caracteres sob seleção. Este índice pode ser expresso da seguinte forma (Baker, 1986; Falconer & Mackay, 1996):

$$Y_j = b_1X_{1j} + b_2X_{2j} + \ldots + b_nX_{nj},$$

onde Y_j é o índice da progênie j, $b_1, b_2, \ldots, b_n$ são valores de ponderação dos caracteres 1, 2, ..., n, e $X_1, X_2, \ldots X_n$ são os valores fenotípicos médios dos caracteres 1, 2, ..., n, respectivamente. Os valores de ponderação são obtidos considerando-se os pesos relativos de cada caráter atribuídos conforme a sua importância e as correlações genéticas entre os caracteres envolvidos. Neste índice, os valores de ponderação ou pesos (b_i) devem ser estimados uma vez que os valores de ponderação econômicos(a_i) são atribuídos aos valores genotípicos de cada caráter, isto é:

$$W_j = a_1G_{1j} + a_2G_{2j} + \ldots + a_nG_{nj},$$

que se refere ao índice genotípico (W_j) sobre o qual a seleção deveria ser praticada. Como não se dispõe de valores genotípicos mas dos valores fenotípicos médios de cada caráter, os valores de b devem ser estimados de forma que a correlação entre os índices genotípico(W_j) e fenotípico (Y_j) seja maximizada. Sendo P a matriz de variâncias e covariâncias fenotípicas, G a matriz de variâncias e covariâncias genéticas envolvendo os caracteres que compõem o índice, b o vetor dos pesos a serem estimados e a o vetor dos valores econômicos atribuídos a cada caráter, as estimativas de b que maximizam a correlação entre Y_j e W_j são obtidas por: $\hat{b} = \hat{P}^{-1}\hat{G}a$ onde os acentos circunflexos indicam que nas matrizes P e G os seus componentes referem-se a estimativas dos parâmetros (Wricke & Weber, 1986; Baker, 1986). Inúmeros índices de seleção podem ser obtidos e utilizados, inclusive impondo-se restrições para que alguns dos caracteres não sejam alterados com a seleção. Esses diferentes índices de seleção podem ser comparados quanto às suas respostas à seleção e, então, pode-se utilizar o índice que acarretar resposta superior para o melhoramento da população.

A intensidade de seleção a ser aplicada é uma decisão importante uma vez que se for muito elevada pode ocorrer deriva genética devido ao tamanho efetivo reduzido das populações geradas da recombinação das progênies selecionadas. O coeficiente de endogamia em uma geração t em função do tamanho efetivo (N_e) é (Falconer & Mackay, 1996):

$$F_t = (1/2Ne) + [1-(1/2Ne)]F_{t-1}$$

e, portanto, a endogamia pode ser introduzida nas populações sob seleção devido ao tamanho restrito da amostra, isto é, devido a alta intensidade de seleção aplicada. Esta endogamia é cumulativa com o decorrer das gerações e afeta, além das médias das populações, a variabilidade genética destas.

O tamanho efetivo populacional depende, também, do tipo de progênie utilizada para a recombinação, uma vez que cada tipo de progênie tem um tamanho efetivo particular. Assim, uma progênie de meios-irmãos, irmãos germanos, S_1 e S_2 tem N_e de 4, 2, 1 e 0,67, respectivamente. Por exemplo, se forem recombinadas apenas 10 progênies, os tamanhos efetivos das populações geradas serão de 40, 20,

10 e 6,7 se as progênies utilizadas forem de meios-irmãos, irmãos germanos, S_1 e S_2, respectivamente. Como as espécies alógamas normalmente apresentam elevada depressão por endogamia, principalmente para os caracteres mais complexos, tamanhos efetivos reduzidos podem acarretar a introdução e o acúmulo da endogamia nas populações e reduzir de forma drástica os ganhos com seleção. Além disso, a deriva genética pode levar a perda de alelos favoráveis ou fixação dos alelos desfavoráveis. Como conseqüência, pode ocorrer redução acentuada da variabilidade genética comprometendo as taxas de melhoramento genético via seleção recorrente (Smith, 1983; Hallauer *et al.*, 1988).

A intensidade de seleção também é afetada pela precisão experimental. Isso ocorre porque com alta precisão experimental, isto é, com baixos valores para os coeficientes de variação experimental, as diferenças entre as médias das progênies podem ser detectadas com elevado nível de precisão, permitindo aplicar alta intensidade de seleção. Quando a precisão experimental é baixa (altos valores para os coeficientes de variação experimental) as diferenças entre as médias das progênies podem tornar-se difíceis de serem detectadas, o que impediria de se reconhecer as progênies que deveriam ser selecionadas. Outro fator que afeta a intensidade de seleção é a ocorrência de anos agrícolas atípicos. Nestes casos, deve-se aplicar intensidades de seleção não muito elevadas para não selecionar as progênies que apresentarem uma interação muito forte com esta situação atípica, o que pode, evidentemente, acarretar problemas para o programa. Além disso, o número de progênies a serem avaliadas também afeta a intensidade de seleção a ser utilizada. Quanto maior o número de progênies avaliadas, maior pode ser a intensidade de seleção a ser utilizada, embora ultrapassar a amostra necessária para representar a variabilidade genética da população pode acarretar gastos desnecessários.

A intensidade de seleção a ser utilizada em programas de seleção recorrente depende, então, do número de progênies avaliadas, do tipo de progênie utilizada para a recombinação, da precisão experimental, da normalidade climática do ano agrícola em que as progênies foram avaliadas e, também, se os programas são delineados para serem conduzidos a curto, médio ou longo prazos. O tamanho efetivo populacional adequado para se reduzir os efeitos da endogamia nas populações deve ser de aproximadamente 40, 20 e 10 para programas de longo, médio e curto prazos, cujo objetivo é a utilização das populações como fontes de linhagens e híbridos. Se as populações forem utilizadas para o desenvolvimento de clones em espécies de propagação assexuada ou de variedades de polinização livre nas demais espécies, deve-se reduzir a possibilidade de ocorrência de endogamia nelas e, nesses casos, tamanhos efetivos entre 30 e 40 seriam mais adequados. Devido a esses fatores, a intensidade de seleção em programas de seleção recorrente é um parâmetro que pode ser estabelecido *a priori* apenas parcialmente, isto é, pode-se estabelecer apenas o tamanho efetivo mínimo adequado que se deseja manter no decorrer do programa.

6.5 RECOMBINAÇÃO

A recombinação das progênies selecionadas, ou de genótipos relacionados a elas, é a última fase de um ciclo de seleção recorrente. Esta fase tem como objetivo gerar variabilidade genética para o próximo ciclo seletivo. A recombinação é feita

intercruzando-se as plantas das progênies selecionadas, evitando-se cruzamentos entre plantas dentro das progênies. Visa-se com isso, evitar cruzamentos de plantas aparentadas e ter-se os gametas das progênies selecionadas representados da forma mais eqüitativa possível na população gerada após a recombinação. Nas espécies de reprodução assexuada pode-se utilizar clones das plantas que geraram as progênies selecionadas, e nas espécies perenes ou semi-perenes, onde ocorre superposição de gerações, podem ser utilizadas para a recombinação as próprias plantas que geraram as progênies selecionadas.

O esquema mais comum para se fazer a recombinação é denominado de cruzamentos dialélicos, onde cada progênie, planta ou clone deve ser cruzada com todas as demais gerando n(n-1)/2 cruzamentos. Retira-se uma amostra eqüitativa de sementes de cada cruzamento e a mistura destes cruzamentos geram as populações melhoradas. Se o número de progênies for muito alto esse processo torna-se inviável nas espécies propagadas por sementes, uma vez que as progênies devem ser representadas por um número adequado de plantas. Assim, outros esquemas como os cruzamentos utilizando-se linhas de machos e fêmeas podem ser utilizados. Neste esquema, uma mistura eqüitativa de sementes das progênies que serão recombinadas são misturadas e utilizadas como macho, enquanto as progênies selecionadas são utilizadas como fêmeas. Assim, em cada grupo de 4 a 6 linhas de fêmeas é intercalada uma linha de macho. As linhas de fêmeas são emasculadas e as sementes colhidas nestas linhas correspondem ao produto do cruzamento e são, portanto, colhidas; a seguir, de cada linha fêmea é retirada uma amostra eqüitativa de sementes cuja mistura origina a população recombinada que refere-se à população melhorada.

Evidentemente, existem outros esquemas de recombinação uma vez que estes dependem da biologia reprodutiva de cada espécie. Entretanto, se bem conduzidos, todos os esquemas têm a mesma eficiência. Normalmente, utiliza-se apenas uma geração de recombinação que apesar de não ser suficiente para que a população melhorada entre em equilíbrio de ligação, é eficiente para gerar quantidades suficientes de variabilidade genética para novos ciclos seletivos (Guimarães & Fehr, 1989; Lima Neto, 1998).

6.6 RESPOSTAS ESPERADAS À SELEÇÃO

A seleção recorrente aumenta de forma gradativa e contínua as freqüências dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção, melhorando de forma gradativa as *performances* das populações na seleção intrapopulacional e as *performances* dos híbridos interpopulacionais na seleção recorrente interpopulacional ou recíproca. Como visto, diversos tipos de progênies podem ser utilizadas para a avaliação (unidades de seleção) e/ou para a recombinação (unidade de recombinação). Dessa forma, existem diversos esquemas de seleção recorrente os quais têm eficiências diferentes. Para que se possa decidir o esquema apropriado para as condições e facilidades disponíveis é preciso saber *a priori* o esquema que proporciona maior retorno, isto é, aquele que proporciona maior taxa de melhoramento das populações ou do híbrido interpopulacional. Assim, deve-se conhecer as expressões que quantifiquem as respostas esperadas à seleção de cada esquema seletivo para que se possa compará-las.

A média da população após um ciclo seletivo de seleção intrapopulacional é: $\mu_{C1}=\mu_O+R_S$, onde μ_{C1}, μ_O e R_S referem-se à média da população após um ciclo seletivo, média original da população e a resposta à seleção, respectivamente. A média do híbrido interpopulacional após um ciclo de seleção interpopulacional é: $\mu_{C(12)}=\mu_{O(12)}+R_{SH(12)}$, onde $\mu_{C(12)}$, $\mu_{O(12)}$ e $R_{SH(12)}$ referem-se à média do híbrido interpopulacional após um ciclo seletivo, média original do híbrido interpopulacional e a resposta à seleção no híbrido interpopulacional. Assim, o melhoramento das populações ou dos híbridos interpopulacionais são diretamente proporcionais às respostas à seleção.

6.7 SELEÇÃO RECORRENTE INTRAPOPULACIONAL

A expressão geral da resposta à seleção recorrente intrapopulacional (Souza Jr. *et al.*, 2000) é:

$$R_S = [ic(\sigma_A^2 + FD_1)/\sigma_F] - DE/2N_e ,$$

onde i é o diferencial de seleção estandardizado, c é um valor que depende do esquema seletivo, σ_A^2 é a variância genética aditiva, F é o coeficiente de endogamia, D_1 é a covariância entre os efeitos aditivos e de dominância dos homozigotos (um dos componentes da variância genética de populações endogâmicas), σ_F é o desvio padrão fenotípico da unidade de seleção, DE é a depressão por endogamia e N_e o tamanho efetivo populacional.

Esta expressão mostra que a taxa de ganho ou de melhoramento é função da intensidade de seleção, das unidades de seleção e recombinação utilizadas e que define o esquema seletivo empregado, das magnitudes da variância genética aditiva e do D_1, do desvio padrão fenotípico, da depressão por endogamia e do tamanho efetivo populacional da população melhorada que, por sua vez, é função do tipo e do número de progênies recombinadas. O componente D_1, por ser uma covariância, pode ser negativo, zero ou positivo (Souza Jr., 1989) e sua permanência na expressão depende do coeficiente de endogamia da população melhorada que é: $F=1/2N_e$. Para tamanhos efetivos (N_e) elevados, a expressão da resposta à seleção reduz-se a $R_S = ic\sigma_A^2/\sigma_F$ que é a fórmula mais conhecida (Falconer & Mackay, 1996).

Estas expressões das respostas esperadas à seleção são inversamente proporcionais ao desvio padrão fenotípico da unidade de seleção, ou seja, é a raiz quadrada da variância fenotípica das médias. Esta variância fenotípica das médias é $\sigma_F^2 = \sigma_p^2 + \sigma_{pl}^2/L + \sigma^2/RL$, onde σ_p^2, σ_{pl}^2 e σ^2 correspondem às variâncias de progênies, da interação progênies com locais e do resíduo; L e R são os números de locais e repetições, respectivamente. Esta variância fenotípica deve ser a menor possível para aumentar a resposta à seleção. Para diminui-la deve-se utilizar o delineamento apropriado, e aumentar sempre que possível o número de repetições e locais. Esta variância fenotípica é específica para o tipo de progênie que é utilizada para avaliação, isto é, é específica para cada unidade de seleção.

Na Tabela 3 estão apresentados os diversos esquemas de seleção recorrente intrapopulacional, com os coeficientes que multiplicam a σ_A^2 e o $D1$, assim como os tamanhos efetivos populacionais de cada tipo de progênie. Com esta tabela, é possível

comparar os diversos esquemas seletivos quanto as suas eficiências relativas. Por exemplo, o esquema com progênies de meios-irmãos como unidade de seleção e recombinação de S_1's acarreta o dobro da resposta à seleção em relação ao esquema em que se utiliza do mesmo tipo de unidade de seleção mas recombina-se progênies de meios-irmãos, uma vez que a variância fenotípica da unidade de seleção são iguais. Entretanto, o tamanho efetivo de uma progênie de meios-irmãos é 4 enquanto a de S_1 é 1. Assim, apesar de a resposta à seleção com recombinação de S_1's ser superior, o tamanho efetivo desse esquema é ¼ daquele em que se recombina progênies de meios-irmãos. Situação diferente tem-se ao analisar o esquema em que a unidade de seleção é de irmãos germanos. Nesse caso, as repostas à seleção são iguais, mas o tamanho efetivo do esquema em que se recombina progênies de irmãos germanos é o dobro daquele em que se utiliza progênies S_1's. Comparando-se os esquemas de meios-irmãos com irmãos germanos, verifica-se que o esquema onde a unidade de seleção é composta por progênies de meios-irmãos e recombinação de S_1's é superior aos esquemas em que a unidade de seleção é composta de irmãos germanos e a recombinação é feita por irmãos germanos ou S_1's, uma vez que, embora, todos esses esquemas explorem a mesma quantidade de variância genética aditiva, o desvio padrão fenotípico de irmãos germanos é maior que aquele de meios-irmãos. Isso se deve ao fato de que $\sigma^2_{pMI} = (1/4)\sigma^2_A$ e $\sigma^2_{pIG} = (1/2)\sigma^2_A + (1/4)\sigma^2_D$ e, portanto, a variância de progênies de meios-irmãos é muito menor que a de progênies de irmãos germanos e, como estas variâncias são componentes da variância fenotípica como acima mostrado, tem-se $\sigma^2_{FIG} > \sigma^2_{FMI}$.

O uso de progênies endogâmicas pode parecer muito atrativo uma vez que as quantidades de variâncias genéticas aditivas exploradas por esses métodos são muito altas quando comparadas às progênies de meios-irmãos e de irmãos germanos. Entretanto, na expressão da resposta à seleção tem-se o componente D_1 que pode ser negativo (Souza Jr., 1989) e, portanto, pode reduzir substancialmente o ganho com seleção. Também, em espécies onde a depressão por endogamia é muito elevada, a avaliação desses tipos de progênies pode acarretar problemas experimentais graves devido a deficiências de germinação. Além disso, devido a exposição da carga genética pela endogamia, progênies que tenham elevada concentração de alelos favoráveis podem ser descartadas devido à presença de locos heterozigóticos cujos alelos recessivos deletérios ou letais são expostos. Todos estes aspectos negativos aliados ao fato do N_e de cada progênie ser baixo, podem resultar em insucesso dos programas e, portanto, o uso desses tipos de progênies devem ser vistos com reservas. Resultados com milho têm mostrado que o uso de progênies endogâmicas em programas de seleção recorrente não tem tido sucesso no melhoramento de populações (Lamkey,1992).

A seleção massal só deve ser utilizada para caracteres cujos coeficientes de herdabilidades tenham magnitudes elevadas. Exemplos desses caracteres são altura das plantas, precocidade, resistência ou tolerância à pragas e doenças. Esses caracteres, em programas de melhoramento aplicados, devem ser selecionados por ocasião da obtenção das progênies. Da Tabela 3, nota-se que quando é possível se praticar seleção nos dois sexos, isto é, faz-se intercruzamento apenas de plantas selecionadas, a resposta à seleção é o dobro daquela em que o intercruzamento é

realizado com plantas selecionadas e não selecionadas. No primeiro caso, normalmente, o caráter pode ser avaliado e selecionado antes do florescimento, enquanto no segundo caso o caráter só pode ser avaliado após o florescimento. Em espécies perenes, semi-perenes e de reprodução assexuada, a seleção massal pode ser praticada nos dois sexos para qualquer caráter uma vez que pode se utilizar da superposição de gerações ou de clones das plantas selecionadas para se praticar a recombinação.

O efeito da endogamia causada pela redução do tamanho efetivo populacional (N_e) deve ser considerada com cuidado, uma vez que deve ser manipulada para ou impedir a sua ocorrência ou introduzi-la de forma intencional. Note que na expressão da resposta à seleção o termo $DE/2N_e$ é subtraído da mesma, onde DE refere-se à depressão por endogamia total. Dessa forma DE é ponderado por $2N_e$ e, portanto, pode-se manipular o tamanho efetivo populacional para reduzir ou impedir a ocorrência de endogamia nas populações sob seleção, uma vez que a mesma pode diminuir ou até anular o ganho com seleção. A única forma de impedir que isso ocorra é manter N_e alto, seja pelo tipo de progênie a ser utilizada para recombinação como pela intensidade de seleção a ser aplicada. Nos programas de seleção recorrente onde o objetivo é melhorar as populações para serem utilizadas como variedades ou para servirem de fontes para o desenvolvimento de clones, N_e deve ser mantido em níveis altos para impedir a ocorrência da depressão por endogamia. Entretanto, nos programas onde se visa a utilização das populações como fontes de linhagens para o desenvolvimento de híbridos, deve-se utilizar progênies endogâmicas para a recombinação para submeter as populações à endogamia com o intuito de se reduzir as suas cargas genéticas e, conseqüentemente, facilitar a obtenção de linhagens endogâmicas. Neste caso, a endogamia é introduzida gradativamente nas populações, utilizando-se N_e's relativamente baixos em cada ciclo seletivo. Deve-se lembrar que o tamanho efetivo populacional reduz, também, as magnitudes dos componentes da variância genética e, portanto, se reduzi-las de forma drástica o melhoramento de populações pode ficar comprometido pela redução da variância genética aditiva (Souza Jr., 1995b).

TABELA 3. Unidades de seleção (*US*) e recombinação (*UR*), quantidades de variâncias e covariâncias exploradas (σ^2_A e D_1) e tamanhos efetivos (N_e) de uma unidade de recombinação de diversos esquemas de seleção recorrente intrapopulacional.

Esquema	*US*[1]	*UR*[1]	σ^2_A	D_1	N_e
Meios irmãos	MI	MI	1/4	0	4
	MI	S_1	1/2	0	1
Irmãos germanos	IG	IG	1/2	0	2
	IG	S_1	1/2	0	1
Endogâmicas	S_1	S_1	1	1/2	1
	S_2	S_2	3/2	5/4	0,67
Massal					
Um sexo	PI	PI	1/2	0	4
Dois sexos	PI	PI	1	0	2
Dois sexos	PI	S_1	1	0	1

[1], [1] -PI refere-se à planta individual. Para plantas perenes, semi-perenes e de reprodução vegetativa, S_1 refere-se às plantas ou clones destas que deram origem às progênies.

6.8 SELEÇÃO RECORRENTE INTERPOPULACIONAL

A seleção recorrente interpopulacional ou recíproca tem como objetivo o melhoramento da geração F_1 do cruzamento de duas populações, ou seja, do híbrido interpopulacional (Comstock *et al.* 1949). Na implementação desse processo seletivo, genótipos de duas populações, denominadas de 1 e 2, são avaliadas em cruzamentos recíprocos, onde cada população é utilizada como testadora da outra. As progênies de cada população, em cruzamentos com a recíproca, que apresentarem capacidades de combinação superiores são selecionadas e os genótipos relacionados a estas progênies selecionadas são recombinados para gerar as populações melhoradas. Assim, a avaliação e seleção é feita ao nível interpopulacional, mas a recombinação é feita dentro de cada população mantendo as suas identidades. Neste processo seletivo são necessários, então, dois tipos de progênies ou genótipos de cada planta, isto é: progênies interpopulacionais para a avaliação e genótipos intrapopulacionais para a recombinação. Para espécies que se reproduzem apenas sexuadamente utilizam-se dois tipos de progênies; para espécies perenes e semi-perenes utilizam-se das próprias plantas que deram origem as progênies interpopulacionais para a recombinação; e para espécies que se reproduzem assexuadamente utilizam-se clones das plantas que deram origem as progênies para a recombinação.

Esse processo seletivo é dirigido para programas de obtenção de híbridos de linhagens, híbridos interpopulacionais e híbridos de cruzamentos de clones. Isso porque enfatiza-se o melhoramento do híbrido interpopulacional e não o melhoramento das populações *per se*. Dessa forma, procura-se melhorar a heterose do cruzamento de duas populações. O melhoramento do híbrido interpopulacional depende do melhoramento das populações *per se* e da heterose de seu cruzamento (Souza Jr., 1992; 1993). Como na seleção recorrente recíproca enfatiza-se o melhoramento do cruzamento de populações, a heterose aumenta com o decorrer das gerações de seleção. Assim, o efeito direto da seleção interpopulacional se dá no híbrido interpopulacional, enquanto as alterações nas populações *per se* são consideradas como efeitos indiretos.

Os esquemas mais utilizados de seleção recorrente recíproca são aqueles envolvendo progênies de meios-irmãos ou de irmãos germanos interpopulacionais para a avaliação e progênies S_1's para a recombinação (Hallauer,1984; 1985). Outros esquemas envolvendo a avaliação de progênies de meios-irmãos ou de *testcrosses* de meios-irmãos e recombinação de progênies de meios-irmãos foram sugeridos (Paterniani & Vencovsky, 1977; 1978) mas não têm sido utilizados por motivos que se verá a seguir. A expressão geral da resposta esperada à seleção recorrente interpopulacional é (Souza Jr, 1992):

$$R_S = (i_1 c\sigma^2_{A12} / \sigma_{F12}) + (i_2 c\sigma^2_{A21} / \sigma_{F21})$$

em que i_1 e i_2 são os diferenciais de seleção estandardizados (intensidades de seleção) aplicados nas populações 1 e 2; σ^2_{A12} e σ^2_{A21} são as variâncias genéticas aditivas interpopulacionais relacionadas às populações 1 e 2; σ_{F12} e σ_{F21} são os desvios-padrão fenotípicos das unidades de seleção associados às populações 1 e 2, respectivamente, e c é o coeficiente que multiplica as variâncias aditivas e que dependem

do esquema seletivo utilizado. Evidentemente, os desvios-padrão fenotípicos das unidades de seleção dependem do tipo de progênie que é utilizada para a avaliação, como já visto. Note, que nesta expressão não faz parte os efeitos da depressão por endogamia causada pela redução do tamanho efetivo populacional. Isto ocorre porque este efeito se manifesta nas populações *per se* e não em seus cruzamentos.

Os esquemas de seleção recorrente interpopulacional sugeridos estão discriminados na Tabela 4, com as quantidades de variâncias genéticas aditivas interpopulacionais exploradas por cada método e os tamanhos efetivos populacionais de uma unidade de recombinação. Esta tabela mostra que os esquemas em que se utilizam progênies de meios-irmãos e de irmãos germanos como unidades de seleção exploram as mesmas quantidades de variâncias aditivas e, também, o tamanho efetivo de cada unidade de recombinação são iguais. O desvio padrão fenotípico de médias de progênies de irmãos germanos é superior àquele de meios-irmãos (Souza Jr., 1998) e, portanto, a resposta à seleção com o esquema de meios-irmãos é superior ao de irmãos germanos. Entretanto, com progênies de irmãos germanos utiliza-se metade da área para a avaliação que aquele requerido com progênies de meios-irmãos e, assim, no esquema com progênies de irmãos germanos pode-se avaliar o dobro de progênies do que seria possível com o esquema de meios-irmãos, considerando a mesma área experimental. Conseqüentemente, a intensidade de seleção pode ser duplicada e, então, o esquema seletivo com progênies de irmãos germanos pode ser superior ao de progênies de meios-irmãos. Contudo, como já visto, uma vez amostrada a população corretamente, o aumento no número de progênies não aumenta de forma proporcional o número de progênies superiores (Souza Jr. & Vencovsky, 1978).

Os esquemas com progênies de meios-irmãos interpopulacionais e *testcrosses* de progênies de meios-irmãos como unidades de seleção e progênies de meios-irmãos intrapopulacionais como unidades de recombinação (Paterniani & Vencovsky, 1977; 1978), exploram quantidades muito baixas das variâncias genéticas aditivas interpopulacionais e, portanto, apresentam baixas eficiências quando comparados aos demais esquemas acima citados (Tabela 4). Outra modificação de seleção recorrente interpopulacional utiliza-se de progênies de meios-irmãos interpopulacionais para a avaliação obtidas alternadamente de plantas S_0 e S_1, e a recombinação é feita de forma alternada com progênies S_1's e de meios-irmãos. Esse esquema seletivo permite que a recombinação e a obtenção de progênies se faça de forma simultânea, diminuindo, portanto, uma fase e, com isso, um ciclo seletivo pode ser completado em um ano com a utilização de geração de inverno (Souza Jr., 1987). Resultados desse esquema seletivo em milho, mostraram que ele é muito mais eficiente que os esquemas de meios-irmãos e de irmãos germanos, uma vez que apresentou respostas à seleção para diversos caracteres comparáveis às desses esquemas, mas cada ciclo completa-se em um menor número de anos (Souza Jr. & Pinto, 2000).

É preciso ressaltar, que para as espécies perenes, semi-perenes e de reprodução assexuada, a recombinação pode ser feita com as próprias plantas que deram origem às progênies selecionadas ou clones destas. Isso pode facilitar sobremaneira o esquema seletivo, uma vez que nestes casos não há necessidade de se produzir dois tipos de progênies. Assim, na Tabela 4, a unidade de recombinação S_1 deve ser substituída para PI (planta individual) para estas espécies.

TABELA 4. Unidades de seleção (*US*) e de recombinação (*UR*), quantidades de variâncias aditivas interpopulacionais exploradas (σ^2_{A12} e σ^2_{A21}) e tamanhos efetivos (N_e) de uma unidade de recombinação de quatro esquemas de seleção interpopulacional.

Esquema	*US*	*UR*[a]	σ^2_{A12}	σ^2_{A21}	N_e
Meios irmãos	MI	S_1	1/4	1/4	1
Irmãos germanos	IG	S_1	1/4	1/4	1
Meios irmãos Mod.	MI	MI	1/8	1/8	4
Testecrosses MI	TMI	MI	1/16	1/16	4

[a]Para plantas perenes, semi-perenes e de reprodução vegetativa, S_1 refere-se às plantas ou clones destas que deram origem às progênies.

6.9 SELEÇÃO RECORRENTE INTRA VERSUS INTERPOPULACIONAL

Como visto, a seleção recorrente intrapopulacional melhora as *performances* das populações *per se*, enquanto a seleção interpopulacional melhora as *performances* dos híbridos interpopulacionais. Assim, para o desenvolvimento de variedades ou populações em espécies onde a heterose não é importante, a escolha óbvia recai sobre a seleção intrapopulacional. Por outro lado, se a heterose é importante a escolha, também óbvia, recai sobre a seleção recorrente interpopulacional. Isto, porque com a seleção intrapopulacional a heterose dos cruzamentos tende a diminuir e com a seleção interpopulacional a aumentar (Souza Jr. & Miranda Filho, 1985). Entretanto, devido a própria biologia reprodutiva e história evolutiva, as espécies alógamas normalmente apresentam heteroses com elevadas magnitudes e que são exploradas comercialmente.

Nos programas de seleção recorrente é preciso que tanto as *performances* das populações *per se* quanto as dos seus híbridos sejam melhoradas a taxas adequadas. Assim, tanto a seleção recorrente intrapopulacional quanto a interpopulacional não preenchem esses requisitos simultaneamente. Isso ocorre, porque na seleção intrapopulacional o melhoramento das populações *per se* é superior aos dos seus híbridos e, portanto, a heterose de seus cruzamentos diminui; na seleção interpopulacional ocorre o contrário, ou seja, o melhoramento dos híbridos interpopulacionais é superior às das populações e, portanto, a heterose dos seus cruzamentos aumenta. Além disso, na seleção interpopulacional uma das populações apresenta taxas adequadas de melhoramento, enquanto a outra apresenta taxas muito baixas ou mesmo negativas (Souza Jr., 1993, 1999).

O melhoramento dos híbridos interpopulacionais ($R_{SH(12)}$) é função do melhoramento das populações *per se* ($R_{SP1} + R_{SP2}$) e da heterose (R_{Sh}), isto é (Souza Jr, 1983; Souza Jr. & Miranda Filho, 1989):

$$R_{SH(12)} = [(R_{SP1} + R_{SP2})/ 2] + R_{Sh}.$$

Com a seleção intrapopulacional, R_{SP1} e R_{SP2} apresentam valores altos mas R_{Sh} diminui; com a seleção interpopulacional uma das populações é melhorada a taxas altas (exemplo R_{SP1}), a outra apresenta taxas muito baixas e até negativas (exemplo R_{SP2}) e R_{Sh} aumenta. Portanto, nenhum dos dois processos seletivos são capazes de melhorar as populações e seus híbridos interpopulacionais simultaneamente. Este fato pode ser compreendido da seguinte forma: para populações divergentes de grupos

heteróticos distintos, normalmente, tem-se uma das populações superior (exemplo-população 1) à outra (população 2) em *performance* e, neste caso, a população 1 tem em média freqüências dos alelos favoráveis superiores às da população 2. Desse modo, a população 2 é uma excelente testadora para a população 1, mas esta é uma péssima testadora para a população 2, ocasionando os problemas citados com a seleção interpopulacional (Souza Jr., 1993).

Como há necessidade do melhoramento das populações *per se*, principalmente em programas de híbridos em que as *performances* das linhagens dependem das *performances* das populações de onde foram extraídas (Souza Jr., 1985), e dos híbridos interpopulacionais, é preciso introduzir uma alternativa para contornar o problema (Souza Jr., 1993). Assim, essa alternativa seria um esquema intermediário entre a seleção intra e interpopulacional. Nesse esquema, a população com *performance* inferior (por exemplo – população 2) seria utilizada como testadora da população 1 e dela mesma (população 2), acarretando dessa forma o melhoramento a níveis adequados das *performances* das populações *per se* e também da heterose, uma vez que a população 1 será melhorada para capacidade de combinação com a população 2. Evidentemente, a taxa de melhoramento da heterose ocorrerá em um nível inferior que com a seleção interpopulacional, mas as duas populações serão melhoradas a taxas adequadas. Como o híbrido interpopulacional é função do melhoramento das populações *per se* e da heterose, este esquema é tão eficiente quanto a seleção interpopulacional no melhoramento do híbrido interpopulacional, uma vez que o melhoramento da população 2 compensaria a redução da taxa de melhoramento da heterose (Souza Jr., 1993; 1999).

7. SELEÇÃO RECORRENTE E PRODUÇÃO DE CULTIVARES

No desenvolvimento de cultivares usualmente utilizam-se de reciclagem de materiais genéticos elites para se formar populações. Assim, linhagens elites são cruzadas e a população resultante desses cruzamentos são utilizadas para a extração de linhagens que serão utilizadas para a produção de híbridos; da mesma forma clones elites são cruzados para formar populações de onde novos clones são selecionados. Nestes processos a variabilidade genética é esgotada no final de cada programa, de forma que a população formada é utilizada apenas uma vez. Com este tipo de programa, a base genética disponível das espécies reduz-se drasticamente com o decorrer dos anos e com isso aumenta a vulnerabilidade genética diante de novas pragas e doenças.

Com a seleção recorrente, o objetivo é melhorar as populações e manter a variabilidade genética no decorrer dos ciclos seletivos de tal forma que pode-se praticar seleção por longos períodos. Assim, as populações sob seleção recorrente são utilizadas como fontes de linhagens ou clones com o decorrer dos ciclos seletivos e, portanto, novos materiais genéticos elites podem ser desenvolvidos e serem introduzidos nos programas de reciclagem de materiais elites. Dessa forma, pode-se evitar a redução da base genética dos materiais disponíveis para reciclagem e, conseqüentemente, o risco de vulnerabilidade genética é atenuado.

Melhorando-se as populações via seleção recorrente, aumenta-se a probabilidade de obter-se novos híbridos ou clones, aumentando-se, portanto, as

taxas de melhoramento genético dos programas de desenvolvimento de cultivares. Para visualizar os efeitos benéficos da seleção recorrente na produção de cultivares, considere uma população sob seleção recorrente e que são extraídas cultivares (híbridos ou clones) dessa população original (C_0) e após n ciclos de seleção recorrente (C_n). A média de um caráter qualquer após n ciclos de seleção recorrente é:

$$\mu_n = \mu_0 + nR_{SP}$$

em que μ_n é a média da população após n ciclos de seleção, μ_0 é a média da população original, n refere-se ao número de ciclos de seleção e R_{SP} à resposta média à seleção por ciclo dos n ciclos seletivos.

As médias esperadas de cultivares (híbridos ou clones) selecionadas da população original (μ_{CU0}) e após n ciclos de seleção recorrente (μ_{CUn}) são, respectivamente:

$$\mu_{CU0} = \mu_0 + R_{SCU0} \quad e$$

$$\mu_{CUn} = \mu_n + R_{SCUn} \ ,$$

onde R_{SCU0} e R_{SCUn} são as respostas à seleção de cultivares derivadas da população original e dessa mesma população após n ciclos seletivos, respectivamente.

Substituindo-se a expressão de μ_n na ultima expressão, obtém-se:

$$\mu_{CUn} = \mu_0 + nR_{SP} + R_{SCUn}$$

e, portanto, a média das cultivares selecionadas da população após n ciclos de seleção recorrente é função da resposta à seleção das cultivares e, também, do melhoramento da população via seleção recorrente.

Comparando-se as médias das cultivares selecionadas da população original e após n ciclos de seleção recorrente, têm-se que:

$$\Delta\mu = \mu_{CUn} - \mu_{CU0} = nR_{SP} + (R_{SCUn} - R_{SCU0})$$

cuja expressão pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\Delta\mu = nR_{SP} + [(i\sigma^2_{Gn} / \sigma_{Fn}) - (i\sigma^2_{G0} / \sigma_{F0})$$

onde i é o diferencial de seleção estandardizado, σ^2_{Gn} e σ^2_{G0} são as variâncias genéticas de cultivares (híbridos ou clones) nos ciclos n e zero de seleção recorrente, e σ_{Fn} e σ_{F0} são os desvios-padrão fenotípicos das unidades de seleção dos ciclos n e zero de seleção recorrente, respectivamente. Supondo-se que as intensidades de seleção são iguais, isto é, $i_n = i_o$ e os desvios-padrão são similares $\sigma_{Fn} \approx \sigma_{F0} = \sigma_F$, têm-se:

$$\Delta\mu = nR_{SP} + (i / \sigma_F)(\sigma^2_{Gn} - \sigma^2_{G0}) \ .$$

Portanto, a diferença das *performances* das cultivares selecionadas da população original e da população melhorada com n ciclos de seleção recorrente é função do número de ciclos (n), da resposta média da população à seleção recorrente (R_{SP}) e das diferenças das variabilidades genéticas das cultivares que estão sendo desenvolvidas nos ciclos original e n ($\sigma^2_{Gn} - \sigma^2_{G0}$). Se as variâncias genéticas não se alterarem de forma substancial esta diferença se aproxima de zero; como isto é esperado porque na seleção recorrente as variâncias genéticas devem ser mantidas em níveis adequados, a expressão anterior reduz-se a:

$$\Delta\mu = nR_{SP}$$

e a diferença das *performances* das cultivares selecionadas antes e após o melhoramento da população é diretamente proporcional aos efeitos da seleção recorrente. Com isso, demonstra-se a importância da seleção recorrente para a obtenção de cultivares superiores àqueles em uso e as taxas de melhoramento de cultivares podem se manter em níveis adequados. Essas deduções mostram também a importância de se manter a variabilidade genética das populações em níveis adequados para a obtenção de cultivares melhoradas (Souza Jr.,1999).

Dessa forma, a reciclagem de materiais elites para o desenvolvimento de novas cultivares deve ser complementada com programas de seleção recorrente. Enquanto a reciclagem de materiais elites é muito importante para a liberação de cultivares a curto prazo, ela acarreta a redução da variabilidade genética expondo essas cultivares aos riscos da vulnerabilidade genética. Os programas de seleção recorrente reduzem substancialmente esses riscos liberando novos materiais elites, não relacionados àqueles oriundos da reciclagem de linhagens ou cultivares elites, para serem utilizados diretamente na produção de híbridos de linhagens ou novos clones e, também, incorporando esses novos materiais elites para os programas de reciclagem de linhagens e clones.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, R.J. **Selection indices in plant breeding**. Florida: CRC Press, 1986. 218p.

BAUMAN, L.F. Improvement of established maize inbreds. **Maydica**, v.22, p.213-222, 1977.

BERNARDO, R. Correlation between testcross *performance* of lines at early and late selfing generations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.17-21, 1991.

COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H.F.; HARVEY, P.H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. **Agronomy Journal**, v.41, p.360-367, 1949.

CORDOVA, H.S. Formacion de hybridos de maiz en base a familias de hermanos completos y sus implicaciones en la producion de semilla comercial. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 15., Maceió, 1984. **Anais**. Brasília: Embrapa, 1986. p.377-404.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. London: Longman, 1996. 464p.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**: theory and technique. New York: Macmillan, 1987. v.1, 536p.

GUIMARÃES, E.P.; FEHR, W.R. Alternative strategies of recurrent selection for seed yield of soybean. **Euphytica**, v.40, p.111-120, 1989.

HALLAUER, A.R. Reciprocal full-sib selection in maize. **Crop Science**, v.24, p.755-757, 1984.

HALLAUER, A.R. Compedium of recurrent selection methods and their application. **CRC Review in Plant Science**, v.3, p.1-34, 1985.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, v.35, p.1-16, 1990.

HALLAUER, A.R.; RUSSELL, W.A.; LAMKEY, K.R. Corn breeding. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (Ed.) **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. 986p.

HOOPES, R.W.; PLAISTED, R.L. Potato. In: FEHR, W.R. (Ed.) **Principles of cultivar development**: crop species. New York: Macmillan, 1987. v.2, 761p.

LAMKEY, K.R. Fifty years of recurrent selection in the Iowa Stiff Stalk Synthetic maize population. **Maydica**, v.37, p.19-28, 1992.

LIMA NETO, F.P. Tamanhos de amostras para estimação de parâmetros genéticos em milho. Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 81p. Dissertação, Mestrado.

LIMA NETO, F.P. Efeito de uma geração adicional de recombinação sobre a resposta à seleção recorrente em milho. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. 150p. Tese, Doutorado.

MOTA, M.G.C. Potencialidade de um novo sistema de cruzamento a nível interpopulacional com progênies de meios-irmãos de milho. Piracicaba:ESALQ/USP, 1984. 156p. Tese, Doutorado.

OMOLO, E.; RUSSELL, W.A. Genetic effects of population size in the reproduction of two heterogeneous maize populations. **Iowa State Journal of Science**, v.45, p.499-512, 1971.

PATERNIANI, E.; VENCOVSKY, R. Reciprocal recurrent selection in maize based on testcrosses of half-sib families. **Maydica**, v.22, p.141-152, 1977.

PATERNIANI, E.; VENCOVSKY, R. Reciprocal recurrent selection in maize based on half-sib progenies and prolific plants in maize. **Maydica**, v.23, p.209-219, 1978.

PINTO, R.M.C. Tamanho da amostra para seleção recorrente com progênies S1 em milho. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 92p. Dissertação, Mestrado.

SHULL, G.H. The composition of a field of maize. **American Breeders' Association Report**, v.4, p.296-301, 1908.

SHULL, G.H. A pure-line method in corn breeding. **American Breeders' Association Report**, v.5, p.51-59, 1909.

SHULL, G.H. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders' Magazine**, v.1, p.98-107, 1910.

SMITH, O.S. Evaluation of recurrent selection in BSSS, BSCB1, and BS13 maize populations. **Crop Science**, v.23, p.35-40, 1983.

SOUZA JR., C.L. Variabilidade genética em milho e relações com a seleção recorrente intra e interpopulacional. Piracicaba:ESALQ/USP, 1983. 148p. Tese, Doutorado.

SOUZA JR., C.L. Procedures for estimating expected genetic progress in inbred lines via recurrent intrapopulational selection. **Revista Brasileira de Genética**, v.8, p.329-342, 1985.

SOUZA JR., C.L. Reciprocal recurrent selection with half-sib progenies obtained alternately from non-inbred (S_0) and inbred (S_2) plants in maize. **Maydica**, v.32, p.19-31, 1987.

SOUZA JR., C.L. Variâncias genéticas interpopulacionais e suas relações com a obtenção e seleção de híbridos. Piracicaba. ESALQ/USP. 1988. 141p. Tese, Livre-docência.

SOUZA JR., C.L. **Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 139p.

SOUZA JR., C.L. Interpopulation genetic variances and hybrid breeding programs. **Revista Brasileira de Genética**, v.15, p.643-656, 1992.

SOUZA JR., C.L. Comparisons of intra-, interpopulation, and modified recurrent selection methods. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.91-105, 1993.

SOUZA JR., C.L. **Melhoramento de espécies de reprodução vegetativa**. Piracicaba: USP, ESALQ, Depto de Genética, 1995a. 41p. (Série Didática)

SOUZA JR., C.L. **Manutenção de coleções de bancos de germoplasmas**. USP, ESALQ, Depto. de Genética, 1995b. 25p. (Série Didática)

SOUZA JR., C.L. **Variâncias e covariâncias genéticas em híbridos interpopulacionais**. Piracicaba: Depto. de Genética, ESALQ/USP, 1997. 45p. (Publicação Didática)

SOUZA JR., C.L. Seleção recorrente e desenvolvimento de híbridos. In: REUNIÓN LATINO-AMERICANA, 4.; REUNIÓN DE LA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EN MAÍZ, 17., Cartagena de Indias, 1997. **Memorias**. Cali: Corpoica; CIMMYT, 1998. p.37-58.

SOUZA JR., C.L. Recurrent selection and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (Ed.) **Genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. 524p.

SOUZA JR., C.L.; VENCOSCKY, R. Influência do aumento da amostra na avaliação de progênies de milho. **Relatório Científico do Departamento de Genética**, Piracicaba, v.13, p.280-287, 1978.

SOUZA JR., C.L.; ZINSLY, J.R. Relative genetic potential of brachytic maize varieties as breeding populations. **Revista Brasileira de Genética**, v.8, p.523-533, 1985.

SOUZA JR., C.L.; MIRANDA FILHO, J.B. Alterações na heterose via seleção intra e interpopulacional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.1197-1201, 1985.

SOUZA JR., C.L.; MIRANDA FILHO, J.B. Genetic variability in two maize populations and its relationship with intra- and interpopulation recurrent selection. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.271-285, 1989.

SOUZA JR., C.L.; PINTO, R.M.C. Responses to a short-term reciprocal recurrent selection procedure in maize. **Maydica**, v.45, p.21-28, 2000.

SOUZA JR., C.L.; GERALDI, I.O.; VENCOVSKY, R. Response to selection under small effective population size. **Genetics and Molecular Biology**, 2000. /No Prelo/

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

WRICKE, G.; WEBER, W.E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. New York: Walter de Gruyter, 1986. 406p.

9

MELHORAMENTO DE ESPÉCIES AUTÓGAMAS

MAGNO ANTONIO PATTO RAMALHO[1]
ÂNGELA DE FÁTIMA BARBOSA ABREU[2]
JOÃO BOSCO DOS SANTOS[1]

[1]Depto. de Biologia, UFLA, C.P. 37 - CEP: 37200-000 - Lavras, MG.
[2]Embrapa/EPAMIG, C.P. 176 - CEP: 37200-000 - Lavras, MG.

1. INTRODUÇÃO

As plantas autógamas incluem as espécies que possuem flores hermafroditas e que se reproduzem predominantemente por meio da autopolinização. Esse sistema de polinização ocorre principalmente devido à morfologia floral que força a liberação do pólen dentro da própria flor, ou o amadurecimento e liberação do pólen antes da abertura da flor, cleistogamia. Assim, ocorre a autofecundação, pois os grãos de pólen de uma flor unem-se aos óvulos da mesma flor. Na verdade, entre as espécies autógamas, há uma taxa variável de cruzamentos, principalmente promovidos por insetos que visitam as flores. Entretanto, a reprodução é, como já mencionado, predominantemente por autofecundação e aceita-se um máximo de 5% para que a espécie seja considerada autógama.

Entre as espécies autógamas anuais mais importantes e utilizadas no Brasil estão o alface, o amendoim, o arroz, a aveia, a berinjela, o caupi, a ervilha, o feijão, o feijão-fava, a soja, o sorgo, o tomate e o trigo. As perenes autógamas ocorrem em número reduzido, porém algumas importantes são o pêssego e a nectarina.

A autofecundação sucessiva leva à homozigose. Assim, nas espécies autógamas, uma cultivar é representada por um genótipo homozigótico – linhagem –, ou uma mistura de linhagens fenotipicamente semelhantes. Essa linhagem ou linhagens podem ter a sua constituição genotípica mantida indefinidamente, a menos que ocorra mistura mecânica de sementes ou algum cruzamento com outras cultivares. Do exposto, qualquer agricultor poderá utilizar como sementes, os grãos colhidos na geração anterior. Esse fato tem desestimulado muitas empresas de pesquisa, especialmente privadas, a investirem em programas de melhoramento destas espécies. Contudo, com a recente aprovação da lei de proteção de cultivares no Brasil, espera-se que empresas de sementes façam maior investimento no melhoramento de espécies autógamas.

Nesse capítulo serão discutidas as propriedades genéticas das populações segregantes de plantas autógamas e os métodos de melhoramento aplicáveis a esse tipo de planta.

2. SIMBOLOGIA UTILIZADA NA DESCRIÇÃO DE INDIVÍDUOS, POPULAÇÕES E FAMÍLIAS

Entre os melhoristas pode ocorrer confusão na simbologia que é adotada para representar o material que se está trabalhando. Essa confusão, evidentemente, dificulta a comunicação entre os mesmos. Por essa razão, nesse tópico será apresentada a simbologia utilizada nessa publicação.

O símbolo F, derivado de planta filial, é amplamente utilizado pelos melhoristas. Seu emprego, entretanto, é restrito aos casos de hibridação entre duas linhagens, ou seja, quando a freqüência alélica nas gerações segregantes é igual a ½. Poderá ser também utilizado em situações em que a freqüência alélica for diferente

de ½, mas que os cruzamentos são direcionados, como ocorre nos retrocruzamentos ou em certos casos de cruzamentos múltiplos.

As plantas da geração F_1, derivadas de cruzamentos simples ou biparentais, são homogêneas geneticamente, isto é, são heterozigóticas para todos os locos em que os pais diferem. A população derivada do intercruzamento dos F_1's ou da autofecundação dos mesmos é a geração F_2. A partir daí, a população derivada por autofecundações sucessivas estará na geração F_x (F_3, F_4,..., F_∞). Vale salientar que o índice do F sempre indica a geração da semente – embrião – e não da planta.

O símbolo S será usado quando há intercruzamento ao acaso de vários indivíduos, como ocorre na seleção recorrente, ou quando a população segregante é proveniente do cruzamento de vários pais em proporções não definidas. Nesse caso, não é possível saber a freqüência alélica dos locos segregantes. O índice do S é semelhante ao comentado para o símbolo F. A diferença básica é que será adotado S_0 para a população de referência ou população em equilíbrio e, portanto, equivale à geração F_2. Se a população S_0 é autofecundada tem-se o S_1, que corresponde a F_3, e assim por diante.

Dependendo do modo como a população segregante será conduzida, há notações especiais que possibilitam aos melhoristas, apenas pela simbologia, inferir qual procedimento foi adotado nas gerações anteriores sem a necessidade de outras explicações.

Se as plantas da população F_2 ou S_0 forem colhidas individualmente, as famílias derivadas serão simbolizadas por $F_{2:3}$ ou $S_{0:1}$, isto é, o primeiro número do índice refere-se à geração da planta que originou a família e o segundo índice à geração utilizada para a sua avaliação. De modo análogo, pode-se inferir que $F_{2:x}$ corresponderá a avaliação de famílias derivadas de plantas F_2 na geração x. Por analogia, $F_{3:x}$, $F_{4:x}$, etc irão corresponder às famílias derivadas de uma população segregante que foi mantida misturada até as gerações F_3 ou F_4, quando as plantas foram colhidas individualmente. Maiores detalhes a esse respeito serão fornecidos quando forem discutidos os métodos de condução das populações segregantes.

A simbologia a ser adotada no retrocruzamento é análoga ao que foi apresentado anteriormente. Nesse caso, a geração F_1 é novamente cruzada com um dos genitores. Se for o genitor 1 (P_1) a denominação é RC_{11} e com o genitor 2 (P_2) será RC_{21}. Isto é, o primeiro número do índice indica qual pai foi utilizado como recorrente e o segundo quantos retrocruzamentos foram efetuados. Nesse caso também é necessário proceder a notação quanto à geração da população do retrocruzamento. Como já mencionado, como a freqüência alélica é previsível, será adotado o símbolo F e os mesmos critérios enfatizados. Seja por exemplo:

F_1RC_{11}: refere-se às sementes F_1 obtidas no primeiro retrocruzamento com o pai 1.

F_2RC_{21}: corresponde às sementes F_2 obtidas no primeiro retrocruzamento com o pai 2.

$F_{3:4}RC_{21}$: corresponde às famílias F_4 derivadas de plantas da população F_3 do primeiro retrocruzamento com o pai 2.

3. EFEITO DA ENDOGAMIA NA CONSTITUIÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES SEGREGANTES

Antes de qualquer comentário a respeito dos métodos de melhoramento aplicáveis às plantas autógamas é necessário discutir o que ocorre com a constituição genotípica das populações com o decorrer das gerações de autofecundação.

Do cruzamento entre duas linhagens é obtida uma geração F_1, heterozigótica para todos os locos em que as duas linhagens diferem. Na geração F_2, 50% dos locos estarão em heterozigose e 50% em homozigose. Na geração seguinte, F_3, a freqüência de heterozigotos será reduzida à metade e assim sucessivamente. Desse modo, em uma geração F_x qualquer, a freqüência de heterozigotos será fornecida por $(1/2)^{x-1}$ e a freqüência de homozigotos $1-(1/2)^{x-1}$. Assim, no decorrer das autofecundações há incremento na freqüência de locos em homozigose e diminuição dos locos em heterozigose. Na geração F_∞, a população será constituída apenas por uma mistura de indivíduos totalmente homozigóticos.

Se forem considerados n genes pode-se inferir sobre a freqüência de homozigotos e heterozigotos numa geração F_x qualquer. Neste caso ocorre uma situação típica de distribuição binomial, isto é, locos em homozigose ou heterozigose. Pode-se então prever a probabilidade de cada um dos eventos por meio da expansão do binômio $(a + b)^n$, em que **a** é a freqüência dos locos em homozigose e **b** a freqüência em heterozigose, que como já comentado correspondem, respectivamente, a $1-(1/2)^{x-1}$ e $(1/2)^{x-1}$. Substituindo **a** e **b** na expressão do binômio tem-se: $[1-(1/2)^{x-1}+(1/2)^{x-1}]^n$. Após algumas operações matemáticas chega-se a expressão apresentada por Allard (1971), ou seja, $[(2^{x-1}-1)+1]^n$.

Assim, por exemplo, se o interesse for o de verificar o que é esperado quando se tem quatro genes segregando (n=4) na geração F_5, isto é, após quatro gerações de autofecundação (x-1=4), tem-se: $[(2^4-1)+1)]^4=[15+1]^4=(15)^4+4x(15)^3x1+6x(15)^2x1^2+4x(15)x1^3+1^4$, o que resulta 65536 indivíduos dos quais:

50625 indivíduos com todos os 4 locos em homozigose
13500 indivíduos com 3 locos em homozigose e 1 loco em heterozigose
1350 indivíduos com 2 locos em homozigose e 2 locos em heterozigose
60 indivíduos com 1 loco em homozigose e 3 locos em heterozigose
01 indivíduo com todos os 4 locos em heterozigose

Depreende-se que de um total de 65536 indivíduos, 50625 serão completamente homozigóticos, correspondendo a 77,2 %, ao passo que apenas 1 em 65536 ainda é esperado ser totalmente heterozigótico. Infere-se ainda, por exemplo, que 22,8 % ainda terão pelo menos um dos locos em heterozigose. Observe também que, considerando todos os locos, a freqüência média de heterozigotos será de $0,0625=[(1x4+60x3+1350x2+13500x1+50625x0)/4x65536)]$, isto é, $(1/2)^{x-1} = (1/2)^4$.

É interessante constatar que após algumas autofecundações a maioria dos locos estará em homozigose. Contudo, é esperado que ocorram indivíduos na população, embora em freqüência baixa, que serão heterozigóticos para a grande parte dos locos que estão segregando. Desse modo pode ser esperado que famílias derivadas de indivíduos após cinco ou mais gerações de autofecundação poderão ainda segregar.

Outro aspecto a ser considerado durante as gerações de autofecundação refere-se ao número de plantas a ser utilizado em cada geração para que se tenha probabilidade de sucesso com a seleção. Para ilustrar esse fato, considere por exemplo 11 genes segregando independentemente. Nessa situação, o número mínimo de plantas nas diferentes gerações segregantes para se ter pelo menos um indivíduo com todos os alelos favoráveis, com 95% de probabilidade, é apresentado na Tabela 1.

Observa-se que a probabilidade de ocorrência de um indivíduo com todos os alelos favoráveis em homozigose na F_2 é muito pequena; seria necessário avaliar uma população superior a 12,5 milhões de plantas para garantir a sua ocorrência. Considerando 250 mil plantas por hectare, seriam necessários 50 ha semeados com a população F_2, para ocorrer apenas uma planta com o genótipo desejado. Deve ainda ser considerada a dificuldade adicional para identificar a referida planta com todos os 11 alelos favoráveis. Quando se considera homozigotos e heterozigotos, esse número de plantas é drasticamente reduzido, pois com apenas 69 plantas é possível manter uma com todos os alelos.

Com o decorrer das autofecundações, conforme já mencionado, a freqüência de homozigotos aumenta e a de heterozigotos diminui. Em função desse fato o número de plantas necessário para manter todos os alelos em homozigose diminui, ao passo que o número necessário de plantas com alelos favoráveis em homozigose ou heterozigose aumenta. Na F_∞ esse número se iguala, pois não mais ocorrerão heterozigotos e a freqüência de indivíduos com todos os alelos favoráveis será fornecida por $(1/2)^{11}$. Considerando 95% de probabilidade do evento ocorrer, seria necessário uma população na F_∞ com 6134 indivíduos para se ter todas as linhagens possíveis.

Esses resultados mostram que o número de indivíduos na geração F_2 não necessita ser grande, contudo ele deve ser aumentado com o avanço das gerações. A opção seria a seleção em gerações precoces. Entretanto, a eficiência dessa seleção é questionável especialmente para caracteres de baixa herdabilidade (Silva *et al.*, 1994; Cutrim *et al.*, 1997). A expressão apresentada por Bernardo (1991), para estimar a correlação entre o fenótipo do indivíduo e ou família na geração de seleção e o desempenho genotípico dessas famílias na geração F_∞ ($r_{FxG\infty}$), evidencia esse fato,

TABELA 1. Número de plantas necessário nas diferentes gerações segregantes para se ter 11 alelos favoráveis, com 95% de probabilidade.

	Homozigose		Homozigose e/ou heterozigose	
Gerações	Freq. do evento	N° de plantas[1/]	Freq. do evento	N° de plantas[1/]
F_2	$(1/4)^{11}$	12564988	$(3/4)^{11}$	69
F_3	$(3/8)^{11}$	145263	$(5/8)^{11}$	525
F_4	$(7/16)^{11}$	26651	$(9/16)^{11}$	1678
F_5	$(15/32)^{11}$	12477	$(17/32)^{11}$	3148
F_6	$(31/64)^{11}$	8698	$(33/64)^{11}$	4372
F_∞	$(1/2)^{11}$	6134	$(1/2)^{11}$	6134

Adaptado de Ramalho *et al.*, (1993).
[1/]Número de plantas estimado pela expressão:[log (1 - 0,95)]/[log(1 - freq. do evento)].

pois $r_{FxG\infty} = r_{GxG\infty}.h$. Isto é, esse valor depende da raiz quadrada da herdabilidade (h) e da correlação genética entre famílias na geração de seleção e na F_∞ ($r_{GxG\infty}$), que por sua vez é função do coeficiente de endogamia (I), ou seja, $r_{GxG\infty} = \sqrt{(1+I_x)/(1+I_-)}$. Como a correlação genética entre as famílias nas sucessivas gerações é normalmente alta (Tabela 2), o desempenho da seleção precoce é função, especialmente, da herdabilidade do caráter no momento em que é efetuada a seleção.

TABELA 2. Estimativas das correlações genotípicas entre as famílias nas sucessivas gerações de endogamia.

		Geração j			
Geração i	I [1]	$F_{2.4}$	$F_{2.5}$	$F_{2.6}$	$F_{2.\infty}$
$F_{2.3}$	0,5	0,93	0,89	0,88	0,87
$F_{2.4}$	0,75		0,97	0,95	0,93
$F_{2.5}$	0,875			0,98	0,97
$F_{2.6}$	0,9375				0,98

[1] *I*: Coeficiente de endogamia. Adaptado de Bernardo (1991).

4. MÉTODOS DE MELHORAMENTO

Existem várias opções de métodos de melhoramento aplicáveis às plantas autógamas. Contudo, eles podem ser incluídos em três categorias: introdução de linhagens; seleção de linhas puras; e hibridação.

4.1 INTRODUÇÃO DE LINHAGENS

A introdução de linhagens é considerado um método de melhoramento, pois contribui efetivamente para a melhoria do potencial genético em uma dada região. A introdução pode ser visualizada sob dois enfoques: o primeiro é a introdução de germoplasma para ser utilizado como fonte de variabilidade em hibridações. Essa é uma atividade rotineira realizada em qualquer programa de melhoramento. O melhorista, especialmente por meio da literatura, identifica as linhagens de interesse e solicita ao detentor das referidas linhagens ou aos bancos de germoplasma. Essa introdução pode ser feita de germoplasma nacional ou de outros países. Nesse último caso, há procedimentos legais a serem seguidos na introdução e que não serão comentados aqui. Informações a esse respeito podem ser solicitadas a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Mesmo com a atual lei de proteção de cultivares, sob o ponto de vista legal, não há nenhuma restrição na utilização de linhagens provenientes de outros programas para fins de utilização em hibridação. É esperado que o intercâmbio de linhagens entre instituições, que ocorria no passado, continue mesmo estando em vigor a lei de proteção.

O segundo enfoque da introdução de linhagens refere-se ao uso direto em uma dada região. Nesse caso, as linhagens são introduzidas e submetidas a avaliações em experimentos com repetições em vários locais representativos da região, antes de sua recomendação. É evidente que o trabalho do melhorista, também nesse caso, é fundamental, pois embora ele não tenha criado as linhagens, deve utilizar de suas habilidades para identificar aquelas que deverão ser recomendadas aos agricultores. Esse procedimento foi muito comum no passado em várias espécies autógamas e

ainda persiste em regiões cujas instituições não possuem um programa próprio de hibridação. Atualmente, com a lei de proteção de cultivares, para que ocorra a introdução de linhagens de outros programas nacionais há necessidade de um acordo formal entre as instituições envolvidas, para que o material recomendado possa ser comercializado como semente.

4.2 SELEÇÃO DE LINHAS PURAS

Em algumas espécies autógamas, especialmente aquelas utilizadas por agricultores de subsistência, tais como arroz e feijão, os agricultores não possuem o hábito de adquirir sementes anualmente, e reutilizam os grãos colhidos como sementes por várias gerações. Nessa condição, é esperado que ocorra variabilidade dentro da "cultivar" em uso. Essa variabilidade é decorrente de mistura mecânica de linhagens diferentes, seguida muitas vezes de fecundação cruzada entre elas no campo, e da ocorrência de mutação.

Assim, é esperado que o germoplasma usado por vários anos pelos agricultores seja uma mistura de linhas puras. Considerando o número de gerações de cultivo sucessivo e a área semeada anualmente, o número de linhagens genotipicamente diferente dentro da população é enorme. Além do mais, com a atuação da seleção natural, é esperado que persistam apenas aquelas combinações gênicas que sejam mais adaptadas, ou seja, mais favoráveis às condições de cultivo prevalecentes na região.

Do exposto, é esperado para essas espécies, que a seleção dentro do germoplasma em uso pelos agricultores, seja um método eficiente. O método é denominado seleção de linhas puras pelas razões já expostas.

O emprego desse método já foi relatado em algumas situações em arroz (Love, 1955) e em feijão (Ramalho *et al.*, 1982). O procedimento básico é apresentado na Figura 1. Observe que a população básica onde será iniciada a seleção pode ser proveniente de um ou vários agricultores, de preferência envolvendo vários para se ter uma melhor representatividade da variabilidade disponível.

O material colhido dos agricultores é semeado misturado na área experimental. Durante o cultivo, o melhorista acompanha o desenvolvimento das plantas, identificando as mais promissoras com relação à arquitetura e ocorrência de pragas e doenças. Na colheita são observados caracteres dos grãos. As plantas são colhidas individualmente obtendo-se as famílias – linhas puras – que serão avaliadas na safra seguinte.

Na avaliação, como o número de linhas puras é normalmente grande, é semeada uma linha com 2 a 3 m de comprimento de cada, colocando a espaços regulares uma testemunha, cultivar já recomendada. De modo análogo é realizada a seleção das melhores linhas puras, que pode ser visual, ou utilizar-se de alguma medida na tomada de decisão. As linhas selecionadas são novamente colhidas individualmente e mais extensivamente avaliadas nas gerações seguintes, utilizando experimentos com repetições.

No final do processo seletivo, o melhorista irá identificar uma ou algumas linhas puras. Nesse último caso, as linhas poderão ser mantidas isoladas ou misturadas para originar uma nova cultivar.

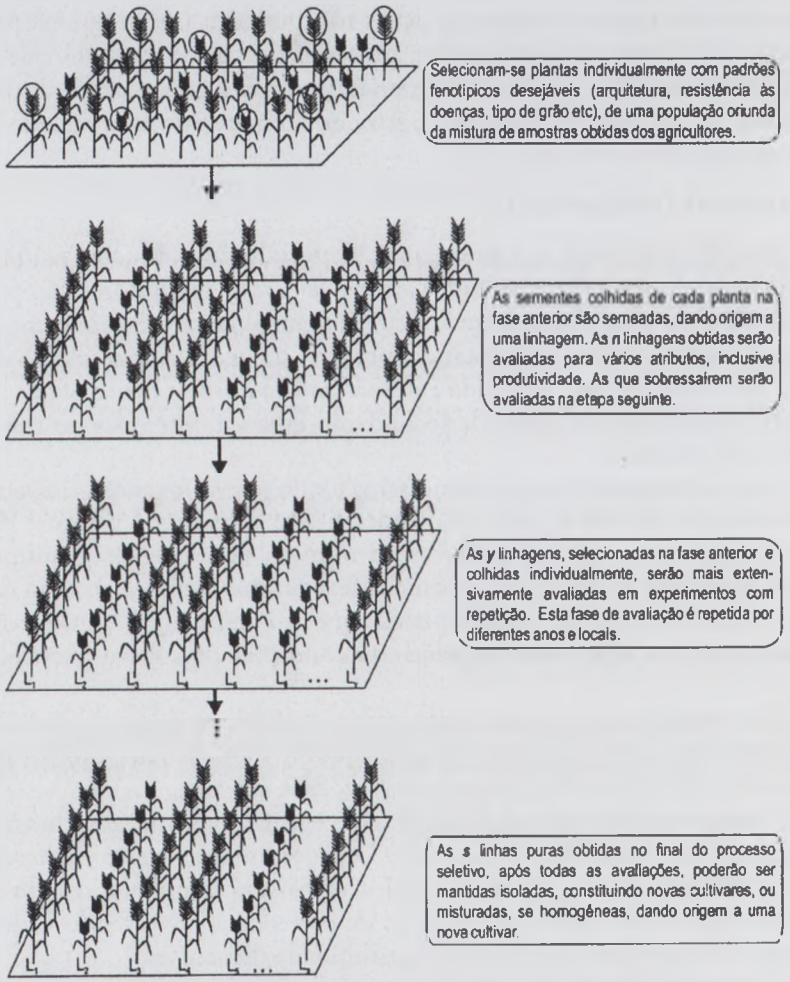


FIGURA 1. Esquema de condução de populações pelo Método de Seleção de Linhas Puras.

4.3 MELHORAMENTO POR HIBRIDAÇÃO

A hibridação deve ser utilizada quando o objetivo do programa de melhoramento é reunir em um único indivíduo – linhagem – os alelos desejáveis que se encontram em linhagens distintas (Fehr, 1987; Ramalho, 1997). Para aplicação desse método existem três etapas fundamentais: a escolha de genitores a serem cruzados; a obtenção da população segregante; e a escolha do método de condução da população segregante.

4.3.1 ESCOLHA DOS GENITORES

Em qualquer espécie há infinito número de combinações possíveis entre os genitores. Entretanto é impossível obter todas as combinações e a alternativa é proceder uma escolha criteriosa dos genitores e concentrar os esforços de seleção apenas dentro das combinações mais promissoras. Para se ter sucesso na escolha dos genitores para

um programa de melhoramento, os objetivos devem ser bem claros, pois a decisão depende dos caracteres a serem melhorados, do tipo de controle genético dos caracteres e da fonte de germoplasma disponível (Fehr, 1987).

Se o caráter a ser melhorado for de herança qualitativa, isto é, controlado por poucos genes e pouco influenciado pelo ambiente, a decisão sobre os genitores é mais fácil. Nesse caso, normalmente é realizada a hibridação de uma linhagem portadora do alelo de interesse com outra que apresente boas características agronômicas.

Em se tratando de caracteres quantitativos, ou seja, controlados por muitos genes e muito influenciados pelo ambiente, como é o caso da produtividade de grãos, a escolha dos genitores já não é tão simples. Estes devem ser tais que possibilitem a obtenção de populações segregantes com média alta, associada à grande variabilidade para o caráter sob seleção.

Um argumento interessante para mostrar a importância de gerar uma população com grande variabilidade foi apresentado por Fouilloux & Bannerot (1988). Supondo que se deseja obter uma linhagem que acumule 16 alelos favoráveis e for utilizada uma população heterozigótica para os 16 locos, a probabilidade de se obter tal linhagem será $P=(1/2)^n=(1/2)^{16}=1/65536$. Admitindo-se a semeadura em parcela de 1 m^2 para avaliar cada família, serão gastos cerca de 6,6 ha para identificar tal linha. Considerando agora que se disponha de uma população segregando para 20 locos, a probabilidade de obter a linhagem desejada, ou seja, com pelo menos 16 alelos favoráveis, será $P(16)+P(17)+P(18)+P(19)+P(20)=1/167$. Usando o mesmo argumento anterior, com 167 m^2 é esperada pelo menos uma linhagem com o número de alelos desejados. Adicionalmente, se estiverem segregando mais dois genes, isto é, 22 locos, a probabilidade passará a ser 1/38. Nesse caso, o aumento de 10% na variabilidade da população, reduz o recurso necessário para se atingir o objetivo em $77\%=[1-(38/167)x100]$.

Os métodos de escolha de genitores, visando ao melhoramento de um caráter quantitativo, foram classificados em duas categorias por Baenziger & Peterson (1991): a primeira delas envolve os procedimentos que utilizam apenas informações dos pais e a segunda utiliza o desempenho de suas progênies. Entre as alternativas de escolha dos genitores utilizando o seu próprio desempenho, o mais empregado é a média do caráter em questão. Esse procedimento, apesar de importante e ser o mais utilizado, tem como desvantagem a impossibilidade de antever a variabilidade genética no cruzamento. O fato de dois pais apresentarem média alta não implica que o híbrido entre eles irá gerar uma população segregante com variabilidade suficiente para obter sucesso com a seleção.

Uma medida que pode ser associada à média e que fornece indicação da divergência entre os genitores é o coeficiente de parentesco. Ele é obtido por meio da genealogia dos genitores, e tem como princípio que quanto mais aparentados, maior deve ser o número de locos em comum e menor a divergência. Assim, é esperado que se os pais não forem aparentados, a população segregante oriunda de seu cruzamento apresente uma grande variabilidade genética. Um inconveniente desse procedimento é que pode acontecer dos indivíduos serem aparentados, mas se complementarem para a característica de interesse ou não aparentados, mas pouco divergentes. Assim, esse método pode não ser muito eficiente para a escolha de genitores.

Uma outra opção é a utilização das técnicas de análise multivariada. Elas possibilitam aos melhoristas escolherem os genitores tendo como referência um conjunto de caracteres. Informações a esse respeito são freqüentes na literatura (Cruz,1990; Ferreira *et al.*, 1995; Abreu, 1997).

A divergência genética também pode ser obtida por meio de marcadores moleculares. A vantagem dessa técnica é a de detectar divergência genética diretamente no DNA ou em seus produtos diretos. Comentários a respeito desse procedimento podem ser encontrados em Lee (1995) e não serão tratados aqui. É importante, contudo, salientar que essas técnicas consideram toda a informação e não apenas aquela envolvida com o caráter em apreço. Assim, dois genitores em potencial podem apresentar enorme divergência em termos moleculares, contudo para o caráter sob seleção as diferenças não serem expressivas.

Dentre os procedimentos disponíveis de escolha de pais, utilizando o desempenho de suas progênies, os cruzamentos dialélicos têm sido os mais utilizados. Eles correspondem ao intercruzamento de n linhagens, duas a duas. Os dialelos podem ser completos, quando todas as linhagens são cruzadas duas a duas, ou então parcial, quando um grupo de linhagens é cruzado com outro. A literatura a esse respeito é extensa fornecendo detalhes sobre as análises e interpretações dos resultados e não serão tratados aqui (Ramalho *et al.*, 1993; Cruz & Regazzi, 1994).

É necessário enfatizar que embora os dialelos sejam muito úteis, têm como principal limitação a impossibilidade de envolver um grande número de linhagens em função do trabalho nas hibridações e, sobretudo, na obtenção de todas as combinações híbridas geradas. Uma alternativa já disponível há algum tempo, mas pouco explorada, são os dialelos circulantes. Nesse caso os g genitores envolvidos estarão presentes em um número de combinações híbridas variando de 2 a g-1. Assim, os dialelos circulantes podem eliminar a principal restrição dos dialelos completos ou parciais. Por exemplo, utilizando 100 genitores em que cada um está envolvido em três cruzamentos (s=3), o número de combinações híbridas a serem obtidas e avaliadas passa para 150, ao invés das 4950 do dialelo completo, tornando-se uma condição muito mais factível.

Utilizando técnica de simulação de dados foi realizado estudo para verificar o grau de confiabilidade das informações obtidas no dialelo circulante em relação ao completo (Veiga, 1998). Os resultados obtidos possibilitaram inferir que os dialelos circulantes permitem classificar adequadamente os pais com relação à capacidade geral de combinação (CGC), mesmo quando o caráter considerado tem baixa herdabilidade.

Outra metodologia, que foi proposta por Jinks & Pooni (1976), possibilita predizer o potencial da população segregante em gerações iniciais, F_2 ou F_3, em produzir linhagens na geração F_∞ que superem o desempenho de uma cultivar testemunha. Esse procedimento tem sido utilizado e no Brasil o seu emprego já foi relatado nas culturas de soja (Triller, 1994) e feijão (Otubo *et al.*, 1996; Abreu, 1997). O princípio do método, como já mencionado, constitui em obter a estimativa da probabilidade da população segregante originar linhagens que superem um determinado padrão. Essa probabilidade é estimada utilizando-se das propriedades de uma distribuição normal padronizada, ou seja, $Z=(\overline{C} - m)/s$, em que $\overline{C}$ é a média da cultivar

considerada padrão; m é a média das linhagens na geração F_∞ que, em um modelo sem dominância, corresponde a média da geração F_2, isto é, $m = \overline{F}_2$; s é o desvio padrão fenotípico entre as linhagens (σ_L). A variância genética entre as linhagens (σ^2_G) corresponde a duas vezes a variância genética aditiva (σ^2_A) presente na geração F_2. Pressupondo um modelo sem dominância, a variância fenotípica de F_2 (σ^2_{F2}) contém $\sigma^2_A + \sigma^2_E$. Assim, $2\sigma^2_A = 2\sigma^2_{F2} - 2\sigma^2_E$. Considerando que a variância ambiental entre as linhagens seja semelhante à variância ambiental na geração F_2, tem-se que: $s = \sqrt{\sigma^2_L} = \sqrt{2\sigma^2_A + \sigma^2_E} = \sqrt{2\sigma^2_{F2} - \sigma^2_E}$. Portanto, para uma dada população i qualquer, pode-se estimar a probabilidade de obter linhagens em F_∞, que superem uma testemunha, com informações da geração F_2, pela expressão: $Z_i = (\overline{C} - \overline{F}_{2i}) / \sqrt{2\sigma^2_{F2i} - \sigma^2_{Ei}}$. Nessa expressão, o σ^2_{Ei} pode ser estimado por meio da variância presente dentro dos dois genitores, que é toda ambiental.

Uma outra metodologia que pode ser utilizada para a escolha dos genitores envolve a estimativa de m+a', onde m é a média fenotípica de todas as linhagens possíveis, na geração F_∞, do cruzamento de pais completamente contrastantes; a' é o somatório dos efeitos dos locos fixados nos genitores, ou seja, dos locos em que eles não são contrastantes. Esse método foi originalmente proposto para as plantas alógamas, visando identificar populações com maior potencial de extração de linhagens na geração F_∞ (Vencovsky, 1987). Para o emprego dessa metodologia basta avaliar as populações segregantes simultaneamente em duas gerações consecutivas, podendo ser, por exemplo, F_1 e F_2 ou F_2 e F_3. O ideal é que a avaliação seja realizada o mais precoce possível, para que os melhoristas concentrem os seus esforços apenas nas populações mais promissoras. Seja, por exemplo, a avaliação das gerações F_1 e F_2. A média da geração F_1 é $\overline{F}_1 = m + a' + d$ e da geração $\overline{F}_2 = m + a' + \frac{1}{2}d$; sendo que m e a' já foram definidos e d é a soma algébrica dos efeitos dos locos em heterozigose. Assim, m+ a' é estimado pelo contraste $2\overline{F}_2 - \overline{F}_1$. De modo análogo, se estiverem envolvidas as gerações F_2 e F_3, tem-se que $m + a' = 2\overline{F}_3 - \overline{F}_2$.

Todos os trabalhos que utilizaram essa metodologia em plantas autógamas salientam a sua contribuição mas enfatizam a necessidade de se obter informações adicionais sobre a variância liberada no cruzamento. Isto porque, como já salientado várias vezes, o importante é identificar as populações com média alta e com a maior variância possível, pois assim aumenta-se a probabilidade de selecionar linhagens que superem o desempenho dos genitores.

4.3.2 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO SEGREGANTE

Considerando que todos os programas de melhoramento têm limitação no número total de famílias que podem ser avaliadas anualmente, um questionamento que surge é: deve-se realizar muitos cruzamentos e avaliar poucas famílias de cada ou poucos cruzamentos com a avaliação de muitas famílias? Fouilloux & Bannerot (1988) utilizaram simulação para obter informações a esse respeito. Consideraram o avanço das gerações utilizando uma semente por planta (método do descendente de uma semente - SSD), herdabilidade do caráter igual a 100%, n locos segregando e Q o número total de famílias sendo avaliadas. Argumentaram que a partir de uma planta F_1, com distribuição independente dos genes e freqüência dos alelos favoráveis e desfavoráveis igual a 0,5, nas gerações segregantes têm-se uma distribuição binominal

para esses alelos. Nessa condição, a média da distribuição binominal é fornecida por $\mu = n/2$ e a variância por $\sigma^2 = n/4$. Quando n é grande, a distribuição binominal tende para a normal. Assim, utilizando as propriedades da distribuição normal, o número de alelos favoráveis esperado em uma dada linhagem (l_i) será $l_i = \mu + Z\sigma$, uma vez que em uma distribuição normal padronizada $Z=(l_i - \mu)/\sigma$. Dessa forma $l_i = n/2 + Z\sqrt{n/4}$.

A partir dessa expressão Fouilloux & Bannerot (1988) fizeram a predição do número de alelos favoráveis que a melhor linhagem irá conter, considerando diferentes números de locos segregando pela expressão $l_i = n/2 + Z\, l_Q \sqrt{n/4}$ em que l_Q é referente a distribuição de máximo e corresponde ao desvio esperado do melhor indivíduo em relação à média de uma amostra de tamanho q com distribuição normal (Tabela 3).

Nota-se que para n=10 a fixação de todos os alelos favoráveis por seleção seria conseguida com populações acima de 800 famílias. Contudo, a diferença entre utilizar 50 famílias ou 400, é relativamente pequena. Com outros valores de n, o mesmo fato é constatado. Veja que com n = 40, a avaliação de 200 famílias ou 50 contribuiu para um ganho extra, em média, de apenas um alelo favorável. Depreende-se, então, que dobrar o número de famílias avaliadas não compensa o esforço adicional gasto na avaliação. Os autores comentam que na maioria das situações é preferível utilizar menor número de famílias, criando condições de se avaliar maior número de cruzamentos. Resultados semelhantes são relatados por Baker (1984).

Apesar de fornecer informações importantes, o trabalho de Fouilloux & Bannerot (1988), pressupõe que o caráter tenha herdabilidade (h^2) igual a 100%, o que na maioria dos casos não acontece. Procurando verificar o efeito do número de famílias, quando se tem diferentes h^2, Ferreira (1998) utilizou vários experimentos com a cultura do feijoeiro, com o número de famílias variando de 169 a 295, e com estimativa de h^2 para a produção de grãos no intervalo de 5,3 a 82,0%. Os resultados obtidos evidenciaram que quando se utiliza um número pequeno de famílias, inferior a 100, a chance de se ter herdabilidade nula, portanto, ausência de ganho com a seleção, pode atingir valores expressivos.

TABELA 3. Número de alelos presente na melhor linhagem com diferentes números de famílias avaliadas (Q) e de locos segregando (n) na população.

Q	n=10	n=20	n=40	n=100
25	8,1	14,4	26,3	59,9
50	8,6	15,9	27,1	61,3
100	9,0	15,6	27,9	62,6
200	9,4	16,1	28,7	63,8
400	9,7	16,6	29,4	64,9
800	10,0	17,1	30,1	65,9
1000	10,0	17,2	30,2	66,2
5000	10,0	18,2	31,6	68,4
10000	10,0	18,6	32,2	69,2

Adaptado de Fouilloux & Bannerot (1988)

Em síntese, se o melhorista utilizar alguns procedimentos salientados anteriormente para identificar as combinações mais promissoras, ele deve utilizar um maior número de famílias para explorar melhor a variabilidade gerada. Quando não houver informações precisas sobre os genitores a opção é obter o maior número de combinações possíveis. Contudo, o número de famílias a serem avaliadas de cada combinação, não deve ser muito pequeno, especialmente se o caráter sob seleção tem h^2 baixa, pois a chance de identificar linhagens superiores é reduzida.

Há inúmeras opções de como obter as populações segregantes a partir de um certo número de genitores previamente escolhidos. Uma das opções é realizar apenas cruzamentos simples – biparentais. Nesse caso são geradas várias populações, cuja freqüência dos alelos nos locos segregantes será sempre 1/2 de cada genitor. Pode-se também optar pelos cruzamentos envolvendo três pais (P_1, P_2 e P_3). Nesse caso tem-se algumas opções. Uma delas é $(P_1 \times P_2) \times P_3$. A população resultante possuirá 25% dos alelos de P_1, e P_2 e 50% de P_3. É fácil entender que o P_3 deve ser o pai em que o melhorista tenha maior interesse, pois seus alelos estarão em maior proporção.

Com quatro genitores (P_1, P_2, P_3 e P_4), tem-se várias alternativas: uma delas é obter o híbrido duplo $(P_1 \times P_2) \times (P_3 \times P_4)$, onde cada um dos pais contribuirá com 25% dos alelos da população. Outra opção é realizar o cruzamento $[(P_1 \times P_2) \times P_3] \times P_4$. Nesse caso, P_1 e P_2 terão uma contribuição igual de 12,5%, o P_3 contribuirá com 25% dos alelos e o P_4 com 50%.

Quando são empregados mais de quatro pais obtém-se uma população denominada de complexa (Fehr, 1987). Nesse caso entre as inúmeras opções duas merecem destaque. Na primeira, que é a mais freqüente, são obtidos inicialmente os híbridos simples, em seguida os duplos e assim sucessivamente até envolver todos os pais. Nesse caso, o melhorista deve ter em mente que, a cada etapa, o número de cruzamentos a serem realizados visando manter os alelos de todos os pais envolvidos aumenta. Suponha, por exemplo, oito pais (P_1, P_2, P_3, ... , P_8) e um loco com um alelo favorável em cada pai. Na primeira etapa, a obtenção dos cruzamentos biparentais, $P_1 \times P_2$, $P_3 \times P_4$, $P_5 \times P_6$, $P_7 \times P_8$, um descendente de cada cruzamento é suficiente. Então serão necessárias no mínimo quatro hibridações. Na segunda etapa serão obtidos os híbridos duplos, $(P_1 \times P_2)$ $(P_3 \times P_4)$ e $(P_5 \times P_6)$ $(P_7 \times P_8)$, e a freqüência de gametas em cada cruzamento que contém o alelo favorável de cada pai é de ¼. Assim, a freqüência da combinação contendo todos os alelos favoráveis no híbrido duplo $(P_1 \times P_2)$ $(P_3 \times P_4)$ será de 1/16 (¼ x ¼), indicando serem necessários no mínimo 16 descendentes para se ter o indivíduo desejado. O mesmo é válido para o outro híbrido. Assim, o número de combinações necessárias será de 32. Na última etapa tem-se o híbrido múltiplo, $(P_1 \times P_2)(P_3 \times P_4)(P_5 \times P_6)(P_7 \times P_8)$, e a freqüência esperada do indivíduo com todos os alelos favoráveis será de 1/256 (1/16 x 1/16). Se for considerada a probabilidade de 95% desse último evento ocorrer, seriam necessários 765 descendentes, ou seja, 765 sementes híbridas para se ter pelo menos um indivíduo contendo todos os alelos favoráveis (Ramalho *et al.*, 1993). Veja que essa estimativa foi efetuada considerando apenas um loco em cada pai. Com o aumento do número de locos segregando esses números atingem uma magnitude tal que são praticamente impossíveis de serem obtidos.

Outra opção de cruzamento múltiplo que pode ser empregado é o cônico, proposto por Fouilloux & Bannerot (1998). Como exemplo seja o mesmo caso anterior com oito pais (P_1, P_2, ... ,P_8). Inicialmente cada um deles é cruzado com outros dois ($P_1 \times P_2$; $P_2 \times P_3$; $P_3 \times P_4$; ...; $P_7 \times P_8$; $P_8 \times P_1$), gerando oito híbridos simples. Esses são então cruzados dois a dois [($P_1 \times P_2$) ($P_3 \times P_4$); ($P_2 \times P_3$) ($P_4 \times P_5$); ... ;($P_7 \times P_8$) ($P_1 \times P_2$)], obtendo-se oito híbridos duplos, de maneira que em cada cruzamento não ocorram genitores comuns. Esses são novamente cruzados dois a dois obtendo-se oito híbridos envolvendo os oito pais. Desse modo são geradas oito populações contendo todos os pais, na mesma freqüência.

4.3.3 MÉTODOS DE CONDUÇÃO DA POPULAÇÃO SEGREGANTE

O objetivo do melhoramento de plantas autógamas, como já enfocado, é obter na geração F_∞ linhagens – genótipos homozigóticos – com alelos favoráveis no maior número de locos. Como já mencionado também, após a hibridação são obtidas sementes F_1 que são heterozigóticas para todos os locos em que os genitores diferem. Com o decorrer das gerações de endogamia a freqüência de heterozigotos diminui e de homozigotos aumenta até a geração F_∞, quando todos os locos estarão em homozigose.

Do exposto, os métodos de condução das populações segregantes podem ser incluídos em duas categorias: a primeira é aquela que não separa as fases de endogamia da de seleção; na segunda estão incluídos os métodos que separam essas duas fases, isto é, a seleção só é iniciada após a maioria dos locos estarem em homozigose.

4.3.3.1 MÉTODOS QUE NÃO SEPARAM AS FASES DE ENDOGAMIA E SELEÇÃO

Nessa categoria estão incluídos principalmente os métodos massal e o genealógico, nos quais já a partir da geração F_2, quando já existe variabilidade, inicia-se a seleção que continua no decorrer das sucessivas gerações de endogamia.

4.3.3.1.1 MÉTODO MASSAL

Por esse procedimento é efetuada a seleção fenotípica de indivíduos superiores a partir da geração F_2 e continua, como mencionado, nas sucessivas gerações. Detalhes da condução desse método são apresentados na Figura 2. O emprego desse método é relativamente pequeno. Ele utiliza basicamente a habilidade dos melhoristas em, visualmente, identificar os indivíduos genotipicamente superiores. Assim é fácil entender que ele só será eficiente para caracteres de alta herdabilidade, onde há uma boa correspondência entre o fenótipo e o genótipo, ou seja, quando é pequena a influência do ambiente na manifestação do caráter. Depreende-se então, que ele só será apropriado para caracteres, tais como, cor de grãos, ciclo e resistência a alguns patógenos.

Para melhorar a eficiência do método, o melhorista pode ajustar a intensidade de seleção à herdabilidade (h^2) do caráter. Isto é, só se deve aplicar alta intensidade de seleção se a h^2 do caráter for próxima de 1,0. Em caso contrário a intensidade de seleção deve ser reduzida evitando a perda de alelos favoráveis já nas gerações iniciais de seleção. O método só é aconselhável também para aqueles caracteres que são pouco influenciados pela densidade de semeadura, pois há necessidade que as plantas sejam mais espaçadas para facilitar a seleção visual.

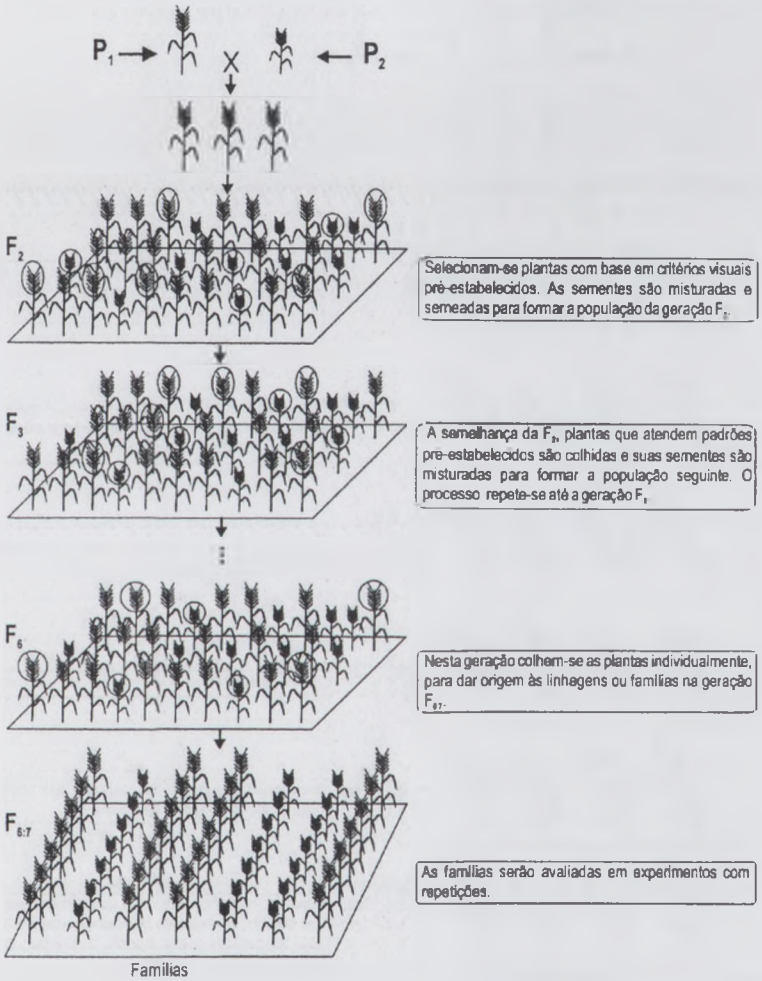


FIGURA 2. Esquema de condução de populações segregantes pelo Método Massal.

4.3.3.1.2 MÉTODO GENEALÓGICO – PEDIGREE

O método genealógico foi proposto no final do século XIX na Suécia e França e, sem dúvida tem sido o mais empregado no melhoramento de plantas autógamas. Tem como princípio a seleção de plantas individuais a partir da geração F_2, as quais são colhidas isoladas e semeadas em linha na geração F_3, quando então é realizada a seleção das melhores famílias e dos melhores indivíduos dentro destas famílias. O processo se repete até que a maioria dos locos esteja em homozigose, quando as melhores linhagens identificadas irão participar de experimentos regionais de competição de cultivares (Figura 3).

Para entender melhor esse método é importante conhecer o que ocorre com a variância genética com o decorrer das gerações de endogamia. Numa população segregante F_2, proveniente do cruzamento de duas linhagens, onde a freqüência dos alelos nos locos segregantes é igual a 0,5 e na ausência de efeitos epistáticos, tem-se

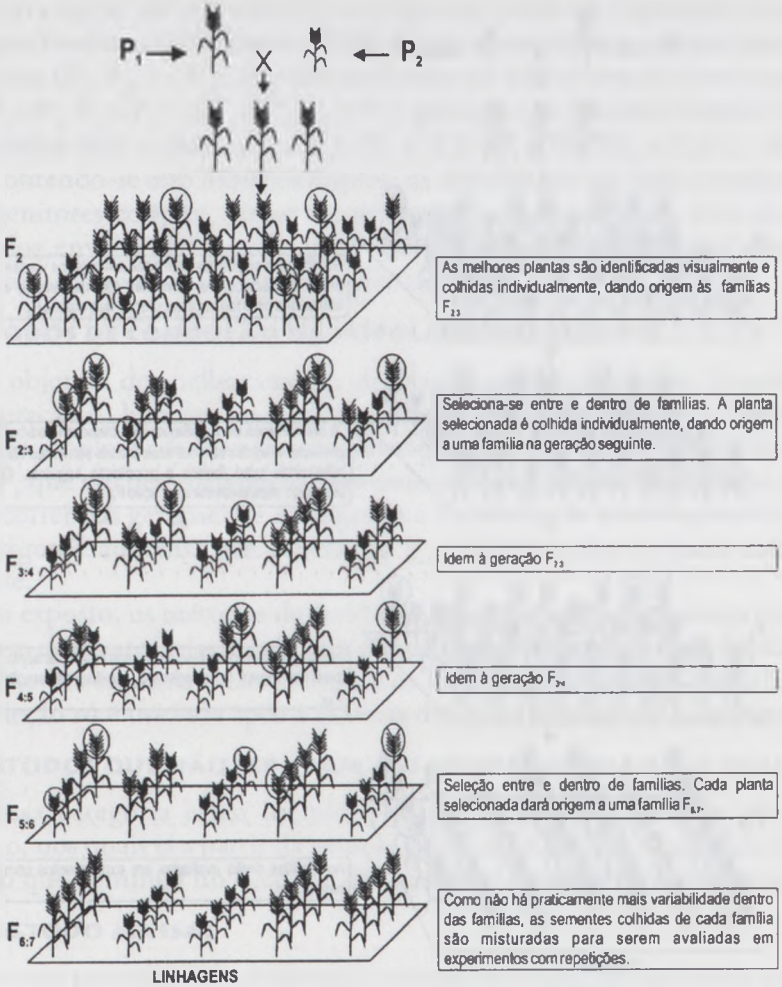


FIGURA 3. Esquema de condução de populações segregantes pelo Método da Genealógico ou Pedrigree.

que a variância genética (σ^2_G), contém a variância genética aditiva (σ^2_A) e a de dominância (σ^2_D) ou seja: $\sigma^2_G = \sigma^2_A + \sigma^2_D$. Com a endogamia a participação da variância de dominância diminui e a da variância aditiva aumenta (Tabela 4).

Tomando como referência a variância aditiva, observa-se que ocorre 1 σ^2_A entre e 0,5 σ^2_A dentro de famílias F_3. Já entre famílias F_4 tem-se 1,5 σ^2_A e 0,25 σ^2_A dentro. Na F_5 esses valores passam a ser 1,75 σ^2_A entre e 0,125 σ^2_A dentro. Depreende-se então que a variância genética aditiva dentro é dissipada com a endogamia. Assim, no método genealógico só se justifica a seleção dentro de famílias até a geração F_5. Maiores detalhes, sobre o que ocorre com a variância genética, com a endogamia, inclusive para populações com qualquer freqüência alélica, são apresentados por Ramalho *et al.* (1993) e Souza Jr. (1989).

Esse método é trabalhoso, entre outras razões, porque alguns melhoristas anotam toda a genealogia dos indivíduos selecionados. É importante salientar que o argumento para se anotar a genealogia é que ela possibilita ao melhorista, uma vez

TABELA 4. Coeficientes da variância genética aditiva (σ^2_A) e de dominância (σ^2_D) total, entre e dentro das famílias nas sucessivas gerações de endogamia.

Gerações		σ^2_A	σ^2_D
F_2		1	1
$F_{2:3}$	Total	1,5	0,75
	Entre	1,0	0,25
	Dentro	0,5	0,50
$F_{3:4}$	Total	1,75	0,4375
	Entre	1,50	0,0625
	Dentro	0,25	0,3750
$F_{4:5}$	Total	1,875	0,2344
	Entre	1,750	0,0156
	Dentro	0,125	0,2188
$F_{5:6}$	Total	1,9375	0,1211
	Entre	1,8750	0,0039
	Dentro	0,0625	0,4172
$F_{6:7}$	Total	1,96875	0,0615
	Entre	1,93750	0,0009
	Dentro	0,03125	0,0605
F_∞	Total	2,0000	0,0000
	Entre	2,0000	0,0000
	Dentro	0,0000	0,0000

identificadas as melhores linhagens, voltar nas famílias que deram origem a elas e efetuar nova seleção. Esse argumento contudo, deve ser questionado. O fato de uma família ter fornecido uma linhagem superior, por si só, não é indicação que se possa novamente selecionar, na mesma família, uma linhagem igual ou superior.

A característica básica do método genealógico é que a seleção em todas etapas é realizada visualmente, sendo essa uma limitação séria. A eficiência dessa seleção visual para caracteres com herdabilidade reduzida é quase sempre muito baixa (Silva *et al.*, 1994; Cutrim *et al.*, 1997). Isso é agravado pelo fato que atualmente as diferenças a serem detectadas para os caracteres quantitativos como produção de grãos, são cada vez menores e visualmente é praticamente impossível observá-las.

4.3.3.2 MÉTODOS QUE SEPARAM AS FASES DE ENDOGAMIA E SELEÇÃO

4.3.3.2.1 MÉTODO DA POPULAÇÃO – *BULK*

Esse método foi proposto também no início do século XX, sendo de fácil aplicação e tem sido utilizado em várias espécies autógamas. O esquema básico de condução é mostrado na Figura 4. Observe que a partir da geração F_2, as plantas são

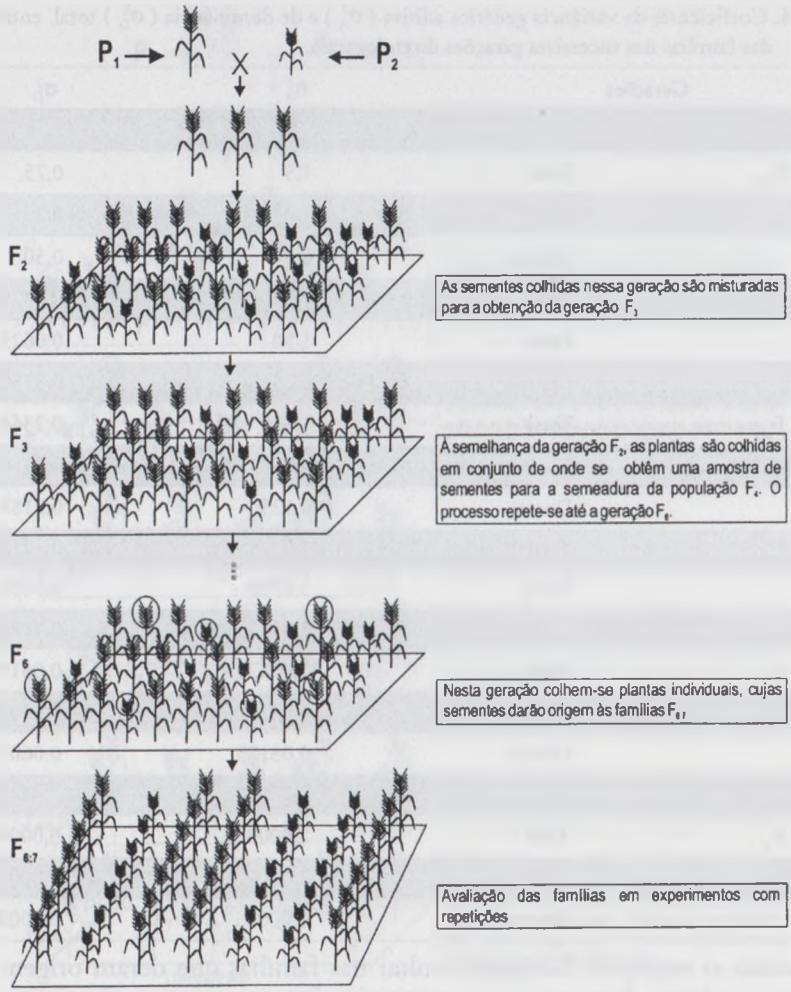


FIGURA 4. Esquema de condução de populações segregantes pelo Método da População ou *Bulk*.

colhidas em conjunto - massalmente - e tomada uma amostra de sementes para a obtenção da população F_3. O processo se repete por algumas gerações, quando o *bulk* é "aberto", ou seja, são colhidas plantas individuais, que darão origem às famílias para serem avaliadas em experimentos com repetição, até serem identificadas as melhores linhas puras. Essas deverão, então, comprovar a sua superioridade nos experimentos regionais de competição de linhagens.

Na utilização desse método há alguns questionamentos. O primeiro deles é qual o número de indivíduos que deve estar presente em cada geração. Na prática, tem sido utilizado um número mais ou menos constante de indivíduos que está entre 1000 e 2000. Esse aspecto deve ser bem considerado pois a principal desvantagem atribuída a esse método é a perda de alelos favoráveis por amostragem. Considerando a facilidade de condução do método, pois envolve basicamente a semeadura e colheita de uma área com o material da geração anterior, o problema de amostragem pode ser sensivelmente reduzido utilizando um número de indivíduos apropriado e crescente a cada geração,

pois, como comentado, a freqüência de indivíduos com os alelos favoráveis, em homozigose e heterozigose diminui com as sucessivas gerações de endogamia (Tabela 1). Assim, em princípio, a população F_2 não necessita ser grande, porém, o número de indivíduos nas populações deve ser crescente com o decorrer das gerações.

A segunda questão é quando abrir o *bulk*. Esse método tem como princípio avançar a população, sem nenhuma seleção artificial, até que a maioria dos locos esteja em homozigose, para só então iniciar o processo seletivo propriamente dito. Assim, para responder a essa indagação é necessário novamente comentar sobre o que ocorre com a população segregante de plantas autógamas com a endogamia. Como já enfatizado, a freqüência de heterozigotos reduz-se a metade à cada geração e a homozigose completa irá sendo atingida rapidamente. Na geração F_5, por exemplo, é esperado que 93,75 % de todos locos segregantes já estejam em homozigose. A partir de então o acréscimo na proporção de homozigotos é menor e não há vantagem em se protelar mais a abertura do *bulk*.

Para realçar esse fato é mostrado na Tabela 4 o que ocorre com a variância genética aditiva (σ^2_A) com o decorrer das gerações. Observe que seu incremento com a endogamia, é expressivo até F_4 ou F_5. A partir daí os acréscimos que ocorrem não compensam protelar a abertura do *bulk*.

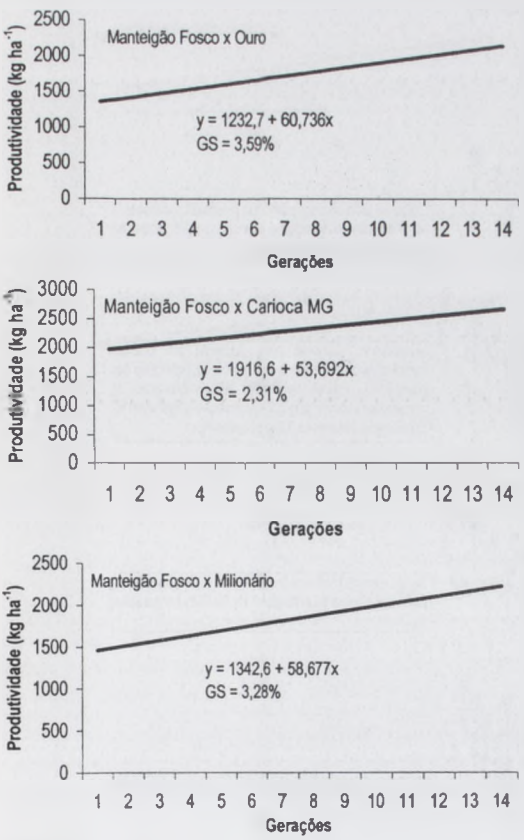


FIGURA 5. Ganho com a seleção natural (GS) por geração em três populações de feijão conduzidas pelo método da população *bulk* após 15 gerações.

Durante o decorrer das gerações a população é submetida a ação da seleção natural. Um outro questionamento é se essa seleção será benéfica ou não para o melhorista. O experimento de maior duração a esse respeito está sendo conduzido com cevada nos EUA (Allard, 1988). Esse trabalho iniciou-se em 1929, com uma população de cruzamento múltiplo envolvendo 28 pais. Após 50 gerações constataram-se alterações em vários caracteres inclusive com um incremento na produtividade de grãos de 1 a 2% ao ano, que é comparável ao obtido pela seleção artificial. Em trabalho semelhante conduzido com a cultura do feijoeiro no Brasil (Corte *et al.*, 1998), envolvendo três populações segregantes oriundas do cruzamento de duas linhagens, observou-se um incremento na produtividade de grãos, em média, superior a 3% por geração, após 15 gerações conduzidas em *bulk* (Figura 5).

4.3.3.2.2 DESCENDÊNCIA DE UMA ÚNICA SEMENTE - SSD

O método descendência de uma única semente é conhecido como SSD (*Single Seed Descent*). Foi proposto com o intuito de reduzir o tempo requerido para se atingir uma alta proporção de locos em homozigose, por meio do avanço das gerações fora da época normal de semeadura da cultura. Consiste em avançar as gerações segregantes, tomando uma única semente de cada indivíduo, já a partir da geração F_2, para obter a geração seguinte. Tal procedimento é repetido até que o nível de homozigose desejado seja atingido (Figura 6). Dessa forma, cada linhagem corresponde a uma planta F_2 diferente e, portanto, reduz-se a perda devido à amostragem deficiente.

Entre as vantagens do método está a redução no espaço necessário para o avanço das gerações. Isto porque apenas uma semente por planta é utilizada para constituir a geração seguinte. Desse modo o avanço das gerações pode ser realizado até mesmo em casa de vegetação. Uma segunda vantagem é que não há perda por amostragem dos indivíduos F_2, haja vista que todos eles estarão representados em todas as gerações. Além do mais, não ocorre a ação da seleção natural, que poderia eliminar alguns fenótipos desejáveis.

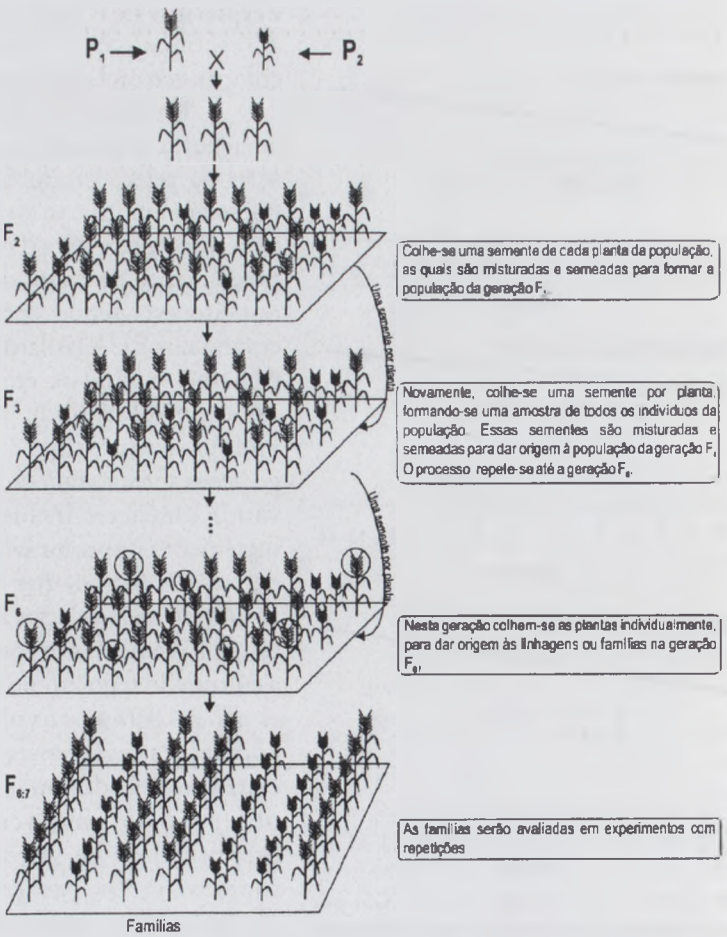


FIGURA 6. Esquema de condução de populações segregantes pelo Método SSD (*Single Seed Descent*).

Como a seleção só é efetuada após obtida uma grande proporção de locos em homozigose, a condução das gerações pode ser realizada fora das épocas normais de semeadura e em condições bem diferentes daquelas de cultivo. Uma desvantagem, que normalmente não é realçada, é a perda da variabilidade dentro das famílias. Como já foi mencionado, a variabilidade liberada dentro das famílias, com o aumento da endogamia, é equivalente a existente entre plantas na geração F_2. Para reduzir a perda de variabilidade dentro das famílias é necessário partir de uma população F_2 a maior possível.

Uma outra desvantagem é que com a perda de um indivíduo, perde-se toda a representatividade da planta F_2. Para atenuar esse problema, tem-se proposto, no caso de leguminosa, utilizar-se os descendentes de uma vagem, ao invés de uma única semente.

Merece ser enfatizado também que em condições tropicais, para algumas espécies autógamas, é possível o cultivo sob condições de campo durante praticamente todo o ano, não havendo necessidade de recorrer ao uso de casa de vegetação. Nesse caso, o SSD pode não ser tão vantajoso.

4.3.3.2.3 MÉTODO DO *BULK* DENTRO DE FAMÍLIAS

O *bulk* dentro de famílias F_2 ou dentro de famílias F_3, foi proposto inicialmente por Frey (1954). Como originalmente proposto a seleção intensiva só seria realizada após algumas gerações de endogamia. Por essa razão esse método foi incluído entre aqueles em que a seleção só é efetuada após atingir a homozigose.

O princípio do método consiste na colheita de plantas individuais nas gerações F_2 ou F_3, onde cada planta originará uma família, sendo que as sementes provenientes de cada família são misturadas e utilizadas para a obtenção da geração seguinte (Figura 7).

Em alguns programas de melhoramento no Brasil, esse método vem sendo utilizado. A partir da geração $F_{2,3}$ ou $F_{3,4}$, as famílias são avaliadas em experimentos com repetição. Esse processo é repetido por duas a três gerações, sendo, então, identificadas as melhores famílias, tendo como referência a *performance* média das famílias nessas gerações.

Quando a obtenção das famílias é realizada na geração F_2, como proposto originalmente, é explorada 1 σ^2_A entre as famílias (Tabela 4). Já, quando realizada em F_3, explora-se 1,5 σ^2_A , o que evidentemente é muito mais vantajoso e deveria ser a estratégia preferida; neste caso o número de famílias deveria ser maior.

Com o decorrer das sucessivas autofecundações a variabilidade dentro vai sendo liberada, e por isso é necessário que o número de indivíduos por família seja acrescido a cada geração. Desse modo, reduz-se também as perdas por amos-tragem dentro das famílias.

Esse método tem como principal vantagem a redução nas perdas por amostragem que ocorre no método do *Bulk*, pois os descendentes das plantas F_2 ou F_3, são mantidos individualizados. Também tem uma vantagem em relação ao genealógico, pois a seleção não é efetuada visualmente e dispensa as anotações da genealogia. Além do mais, como a seleção das famílias é efetuada utilizando experimentos conduzidos por mais de uma geração e em mais locais, é atenuado o efeito da interação no processo seletivo.

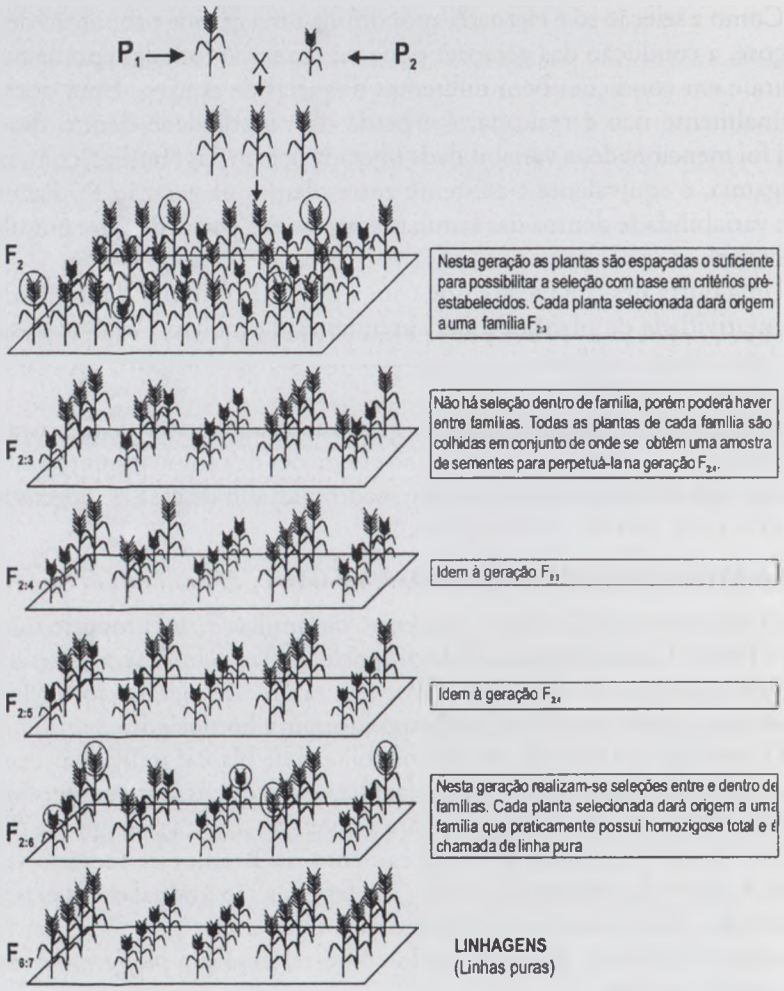


FIGURA 7. Esquema de condução de populações segregantes pelo Método de *Bulk* dentro de Famílias F_2.

A principal desvantagem é o grande trabalho envolvido na avaliação das famílias em experimentos com repetição. Em função do trabalho fica difícil avaliar um maior número de famílias $F_{2:3}$ ou $F_{3:4}$ e, em conseqüência, pode-se não se ter uma boa representatividade da variabilidade gerada no cruzamento.

4.3.3.3 RETROCRUZAMENTO

O retrocruzamento não é propriamente método de condução das populações segregantes. Ele é usado especialmente para melhorar a expressão fenotípica de uma característica de um dado cultivar para a qual ele é deficiente. O termo retrocruzamento refere-se aos repetidos cruzamentos dos indivíduos da população segregante com uma das linhagens genitoras. O pai que contém o alelo que confere o fenótipo desejado é denominado de não recorrente, isto é, é utilizado apenas uma vez nos cruzamentos. O pai que é submetido aos sucessivos cruzamentos com os indivíduos da população

segregante é denominado de recorrente. Essa cultivar deve ser cuidadosamente escolhida, pois deve apresentar bons atributos para todas as características, exceto aquela que será doada pelo não recorrente (Fehr, 1987).

O procedimento a ser utilizado no retrocruzamento depende do controle genético do caráter a ser transferido e da necessidade de realizar ou não testes da descendência para determinar seu genótipo. Se o alelo a ser transferido for dominante e o fenótipo puder ser avaliado facilmente, o processo é bem simples, conforme ilustrado na Figura 8. Seja a transferência do alelo B dominante, presente no pai não recorrente. Observa-se que após o cruzamento entre os dois genitores e a obtenção dos híbridos F_1, estes são retrocruzados com o pai recorrente, gerando indivíduos RC_{11}. Estes indivíduos segregarão para os tipos Bb, desejáveis e bb, indesejáveis, os quais serão eliminados. Os indivíduos remanescentes, Bb, são novamente retrocruzados com o pai recorrente. Esse procedimento é repetido até que o nível desejado de recuperação do fenótipo do pai recorrente seja atingido. Posteriormente, submete-se a descendência de Bb do último retrocruzamento à autofecundação e faz-se a avaliação das famílias para identificar os indivíduos homozigotos BB.

Seja agora um caso em que o alelo desejável presente no pai não recorrente, é recessivo, isto é, b (Figura 9). Constata-se que após o cruzamento entre os dois genitores, o híbrido F_1 é retrocruzado com o genitor recorrente, gerando indivíduos RC_{11}, que possuem os genótipos BB e Bb e que não apresentam o fenótipo desejado. Assim, eles devem ser autofecundados para identificar os portadores do alelo b. Após a autofecundação os indivíduos BB e Bb são descartados por não apresentarem o fenótipo desejado. Os indivíduos bb são novamente retrocruzados com o pai recorrente, gerando indivíduos RC_{12} com o genótipo Bb. Esses são outra vez retrocruzados com o pai recorrente, gerando indivíduos RC_{13}, BB e Bb. Repete-se o procedimento do RC_{11}, isto é, é efetuada a autofecundação da descendência e identificados os indivíduos bb para dar continuidade ao processo. Como se constata, quando é feita a transferência de alelo recessivo, deve ser efetuada a autofecundação em todos os cruzamentos de ordem ímpar. Tal procedimento é repetido até que o nível desejado de recuperação do pai recorrente seja atingido. No último retrocruzamento as famílias são submetidas à autofecundação para a identificação dos indivíduos bb.

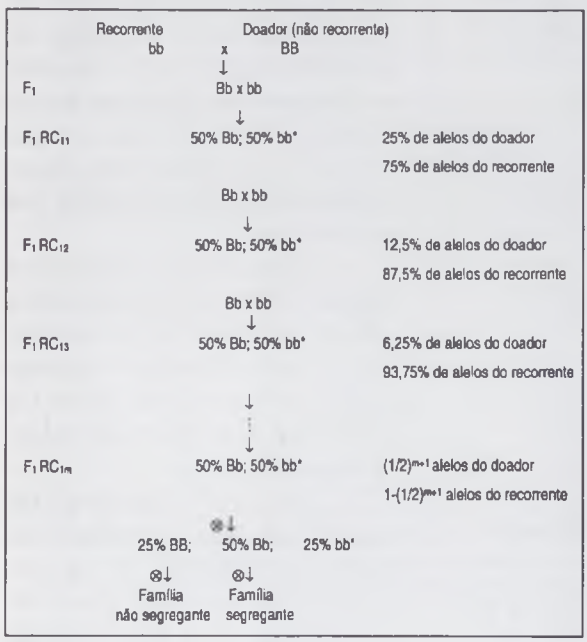


FIGURA 8. Transferência de um alelo dominante utilizando o método do retrocruzamento. Indivíduos marcados com asterisco são eliminados; m = número de retrocruzamentos.

O método do retrocruzamento é especialmente recomendado quando se deseja a transferência de um caráter de herança qualitativa, conforme ilustrado. Entretanto, ele pode ser utilizado também no caso de caráter quantitativo (Ramalho *et al.*, 1993). Segundo esses autores, o problema é o maior número de genes envolvidos e o efeito mais acentuado do ambiente, tornando o processo menos eficiente. Com o aumento do número de genes, a proporção de indivíduos com o genótipo desejado decresce. Conseqüentemente, o número de plantas necessário para recuperar o referido genótipo aumenta. Além disso, é difícil identificar pelo fenótipo, os indivíduos que possuem os alelos desejáveis, quando a influência do ambiente é grande.

O retrocruzamento é provavelmente o método mais utilizado no melhoramento de plantas autógamas. Especialmente quando o caráter é de fácil seleção a sua eficiência é de quase 100%. Só complica quando o alelo do gene que está sendo transferido é ligado a outro gene que é responsável por algum fenótipo indesejável. Nesse caso, o processo é mais demorado.

Um questionamento que se faz é qual o número de retrocruzamentos é necessário para recuperar o pai recorrente. Na primeira geração, F_1, há 50% dos alelos de cada pai. No RC_{11} esse número passa a ser de 75% dos alelos do pai recorrente. No RC_{12} é de 87,5%, no RC_{13} é de 93,75%, ou seja, no RC_{1m} espera-se $(2^{m+1}-1)/2^{m+1}$, em que m refere-se ao número de retrocruzamentos com o pai recorrente.

Sob o ponto de vista prático três a quatro retrocruzamentos são suficientes, especialmente quando em cada retrocruzamento é realizada a seleção visando eliminar indivíduos com fenótipos indesejáveis de outros caracteres além daquele que está sendo transferido do pai não recorrente. Um outro procedimento que pode ser utilizado visando acelerar a recuperação do pai recorrente é o emprego de marcadores moleculares a cada retrocruzamento. Nesse caso, só são mantidos os indivíduos cujas marcas moleculares têm maior correspondência com as do pai recorrente.

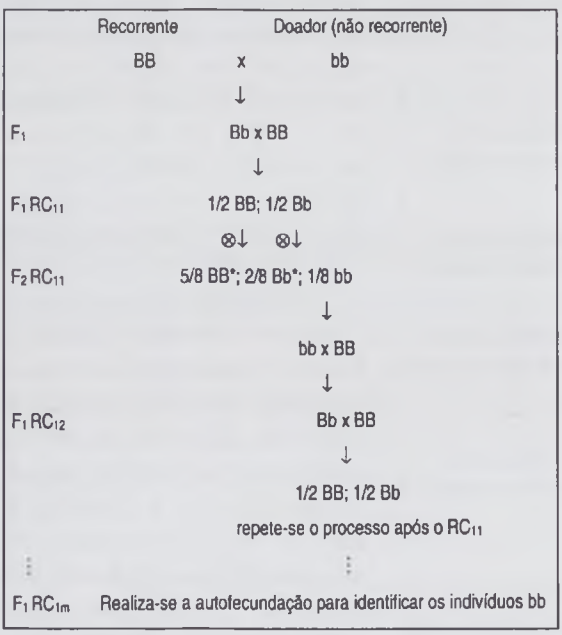


FIGURA 9. Transferência de um alelo recessivo pelo método do retrocruzamento. Indivíduos marcados com asterisco são descartados; m = número de retrocruzamentos.

Um fator que influencia o número de retrocruzamentos é a adaptação do pai não recorrente. Se ele é não adaptado, o número de retrocruzamentos deve ser maior. Em caso contrário, reduz-se acentuadamente.

Alguns melhoristas questionam que o método do retrocruzamento é muito conservador, pois há tendência de permanecer com uma cultivar apenas. Entretanto, é fácil visualizar que se durante o

processo for identificada uma linhagem superior ao pai recorrente, esse pode ser substituído nos futuros retrocruzamentos. Assim procedendo, o processo torna-se muito mais dinâmico.

5. SELEÇÃO RECORRENTE

Seleção recorrente é qualquer processo cíclico de melhoramento que envolve a obtenção de famílias, avaliação e o intercruzamento das melhores. Espera-se, desse modo, aumentar a freqüência de alelos favoráveis e por conseqüência melhorar a expressão fenotípica do caráter sob seleção.

Ela tem sido mais extensivamente utilizada em plantas alógamas (Hallauer, 1986), contudo o seu emprego tem sido ampliado nas últimas décadas com sucesso, em inúmeros países, em várias espécies autógamas, como soja (Werner & Wicox, 1990; Uphoft *et al.*, 1997), trigo (Wang *et al.*, 1996), arroz (Rangel *et al.*, 1998), aveia (De Koeyer *et al.*, 1993) e feijão (Beaver & Kelly, 1994; Ranalli, 1996).

5.1 ARGUMENTOS PARA SE UTILIZAR A SELEÇÃO RECORRENTE EM PLANTAS AUTÓGAMAS

A maioria dos caracteres que os melhoristas trabalham são controlados por vários genes e praticamente não existe nenhuma linhagem que concentre todos os alelos favoráveis. O modo mais eficiente de concentrar o maior número de alelos favoráveis em uma linhagem é por meio de ciclos sucessivos de seleção e recombinação das melhores famílias, que é a seleção recorrente. Detalhes que justificam essa observação são encontrados em Fouilloux & Bannerot (1988), Geraldi (1997) e Ramalho (1997).

Um argumento bem convincente para o emprego da seleção recorrente em plantas autógamas foi apresentado por Fouilloux & Bannerot (1988). Eles utilizaram a expressão $l_i = n/2 + Z\, l_Q \sqrt{n/4}$ apresentada anteriormente (item 2). Por meio dessa expressão pode-se predizer o número de alelos favoráveis (r_1 e r_2) na melhor linhagem (L_1) e na segunda melhor linhagem (L_2) resultantes do primeiro ciclo seletivo, com n locos segregando e diferentes números de famílias sendo avaliadas.

Se as duas melhores linhagens (L_1 e L_2), com r_1 e r_2 alelos favoráveis resultantes do primeiro ciclo seletivo forem cruzadas para a condução do segundo ciclo seletivo, tem-se três situações:

a) locos homozigóticos para os alelos favoráveis nas duas linhagens. Eles não mais segregam e representam os alelos favoráveis fixados com a seleção. A freqüência esperada deles é: $a=(r_1 \times r_2)/n$

b) locos homozigóticos para alelos desfavoráveis nas duas linhagens. Nesse caso a fixação ocorreu em sentido contrário e não há possibilidade de se obter alelos favoráveis, para esses locos, no segundo ciclo de seleção. Sua freqüência é: $c=(n-r_1)(n-r_2)/n$

c) locos em que as duas linhagens se complementam. A freqüência será $b=r_1+ r_2-(2r_1r_2)/n$, onde r_1+r_2 é a freqüência dos homozigotos favoráveis e $(2r_1r_2)/n$ é a freqüência dos homozigotos desfavoráveis.

Usando o conhecimento anterior, pode-se ter o número de alelos favoráveis nas duas linhagens L_1 e L_2 e também após o segundo ciclo seletivo, considerando o mesmo número de famílias sendo avaliadas em ambos os casos (Tabela 5). Pode-se, agora, estimar o número de famílias a serem avaliadas em um ciclo seletivo para se ter o mesmo resultado de dois ciclos seletivos. Na Tabela 6 são apresentados esses números considerando n=40 locos segregando. Como é fácil visualizar, dois ciclos seletivos foram muito mais eficientes que um ciclo para acumular os alelos favoráveis. Veja que quando nos dois ciclos seletivos foram avaliadas 100 famílias de cada vez, a melhor linhagem deverá conter 32,6 alelos favoráveis. Para se ter essa mesma linhagem com um ciclo seletivo, é necessário avaliar 18800 famílias, isto é, um número 94 vezes superior.

TABELA 5. Número de alelos favoráveis presente nas duas melhores linhagens selecionadas ($L_1=r_1$, $L_2=r_2$) após um ciclo seletivo e na melhor linhagem (L) após o segundo ciclo seletivo, considerando diferentes números de locos segregando e de famílias avaliadas (Adaptado de Fouilloux & Bannerot, 1988).

Número de locos segregando (n)	Número de famílias avaliadas (Q=Q')[1/]	r_1[2/]	r_2[2/]	a	b	L
20	50	15,0	14,1	10,6	8,0	17,7
	100	15,6	14,8	11,5	7,3	18,6
	200	16,1	15,4	12,4	6,7	19,3
	400	16,6	15,9	13,2	6,1	19,9
40	50	27,1	25,9	17,5	17,9	31,3
	100	27,9	26,8	18,7	17,3	32,6
	200	28,7	27,6	19,8	16,7	33,8
	400	29,4	28,4	20,9	16,1	34,8

[1/]Q = Q' indica que o mesmo número de famílias foi considerado nos dois ciclos.
[2/]r_1 e r_2: número de locos com alelos favoráveis na melhor e na segunda melhor linhagem, respectivamente, após o 1° ciclo seletivo.
$a=(r_1 x r_2)/n$ e $b= r_1 + r_2-(2r_1r_2)/n$
L: Número de locos com alelos favoráveis na melhor linhagem após o segundo ciclo seletivo.

TABELA 6. Número de indíviduos a serem avaliados em um ciclo seletivo para se obter uma linhagem com o mesmo número de alelos favoráveis de dois ciclos seletivos, considerando 40 locos segregantes e diferentes números de famílias (Q) sendo avaliadas.

Número desejado de alelos favoráveis	Número de famílias a serem avaliadas		
	Dois ciclos seletivos	Um ciclo seletivo	
	Q=Q'	Q_1	$Q_1/2Q$
31,3	50	3500	35
32,6	100	18800	94
33,8	200	116400	291
34,8	400	543200	679

[1/]Q=Q indica que o mesmo número de famílias foi considerado nos dois ciclos.

5.2 CONDUÇÃO DO PROGRAMA DE SELEÇÃO RECORRENTE

A condução de um programa de seleção recorrente envolve três etapas: a formação da população base, a avaliação e seleção das famílias e o intercruzamento das melhores. Todas elas possuem inúmeras alternativas, cuja decisão é dependente de uma série de fatores.

Na formação da população base é necessário ter em mente que os genitores envolvidos devem ter o melhor desempenho possível para o(s) caráter(es) sob seleção. Além do mais devem apresentar a maior diversidade genética possível, pois assim a população base irá associar média alta e alto nível de variabilidade genética, que são condições indispensáveis para o sucesso com a seleção. Considerando que um programa de seleção recorrente é demorado, é necessário que na formação da população base os melhoristas dediquem grande atenção na escolha dos genitores.

A decisão sobre o número de genitores envolvidos também merece reflexão. Se for um número muito grande, a probabilidade de encontrar todos os genitores com boa expressão para o caráter é muito pequena. Mesmo que isso fosse possível a contribuição dos alelos de cada parental seria tão pequena, que a maioria seria perdida após os primeiros ciclos seletivos. Se o número for muito pequeno, a chance de associar a maioria dos alelos favoráveis, para o caráter em questão, é também pequena. Em princípio de 10 a 20 genitores é um número satisfatório.

Escolhidos os genitores, a próxima etapa é definir como eles serão cruzados. Há também várias opções. Uma delas é realização de cruzamentos múltiplos. Outra é promover o intercruzamento utilizando a macho-esterilidade. Uma terceira opção, que será mais tarde discutida aqui, é a combinação dos pais e das famílias recombinantes no esquema cônico, proposta por Bearzoti, citado por Ramalho (1997).

A seleção na população base pode ser fenotípica - massal - ou utilizando algum tipo de família. A primeira opção é aconselhável quando o caráter apresenta alta herdabilidade e pode ser selecionado visualmente com eficiência. Para os caracteres com menor h^2, a seleção deve ser efetuada a partir da avaliação de famílias em experimentos com repetição. Pode-se utilizar, à semelhança das plantas alógamas, famílias de meios-irmãos, irmãos germanos ou endógamas (S_1, S_2, etc.). Na maioria dos casos as famílias endógamas são as preferidas, sendo avaliadas principalmente, as famílias $S_{0:1}$ e $S_{0:2}$.

Quando se avaliam famílias $S_{0:1}$, a covariância (COV) entre famílias $S_{0:1}$ e S_∞ (COV ($S_{0:1}$, S_∞)),ou seja, a parte que é transmitida via seleção, contém σ^2_A +1,5D_1+0,25D_2. Já na $S_{0:2}$ a COV ($S_{0:2}$, S_∞) passa a ser 1,5 σ^2_A +2,75D_1+0,63D_2, em que σ^2_A é a variância genética aditiva; D_1 a covariância genética entre os efeitos aditivos dos alelos e os efeitos de dominância dos homozigotos e; D_2 é a variância de dominância dos homozigotos (Souza Jr., 1989). Como D_1 é uma covariância ela pode ser negativa. Isso ocorre quando a população base possui freqüência dos alelos favoráveis menor do que 0,5. Neste caso, é preciso ponderar a vantagem advinda do número de autofecundações no aumento de σ^2_A com o decorrente aumento também no coeficiente de D_1. Infelizmente, são poucas as estimativas de D_1 disponíveis para que a decisão possa ser melhor tomada. Se D_1 for maior do que σ^2_A , especialmente se estivermos trabalhando com uma população pouco melhorada, não é aconselhável

avaliar as famílias com mais de uma autofecundação. Em caso contrário, a eficiência da seleção aumenta com o número de autofecundações. Contudo, esse aumento é expressivo apenas até a geração $S_{0:4}$ ou $S_{0:5}$ (Ramalho *et al.*, 1993).

Escolhidas as melhores famílias (ou indivíduos) essas deverão ser intercruzadas visando obter a população do ciclo seguinte. Esse intercruzamento pode ser feito artificialmente ou utilizando macho-esterilidade. O emprego da macho-esterilidade na condução da seleção recorrente tem sido utilizado em algumas espécies como trigo (Wang *et al.*, 1996) e arroz (Rangel & Neves, 1997).

Um questionamento freqüente é quantos ciclos de recombinação seriam necessários. Hanson (1959) comentou que para uma perfeita liberação da variabilidade a recombinação deveria ser realizada por duas ou três vezes consecutivas. Entretanto, trabalhos realizados em algodão (Meredith & Bridge, 1971), trigo (Altman & Busch, 1984), soja (Piper & Fehr, 1987; Guimarães & Fehr, 1989) e arroz (Ospina *et al.*, 1997) apontam não haver necessidade de mais de um intercruzamento a cada ciclo de seleção recorrente.

Pelo que foi exposto há uma infinidade de opções de condução de um programa de seleção recorrente. Será apresentada uma proposta (Figura 10), considerando 20 genitores envolvidos na formação da população e intercruzamentos manuais. Para a obtenção do ciclo 0, os 20 genitores são cruzados em um esquema de dialelo circulante em que cada um deles é cruzado com dois outros. Esses cruzamentos

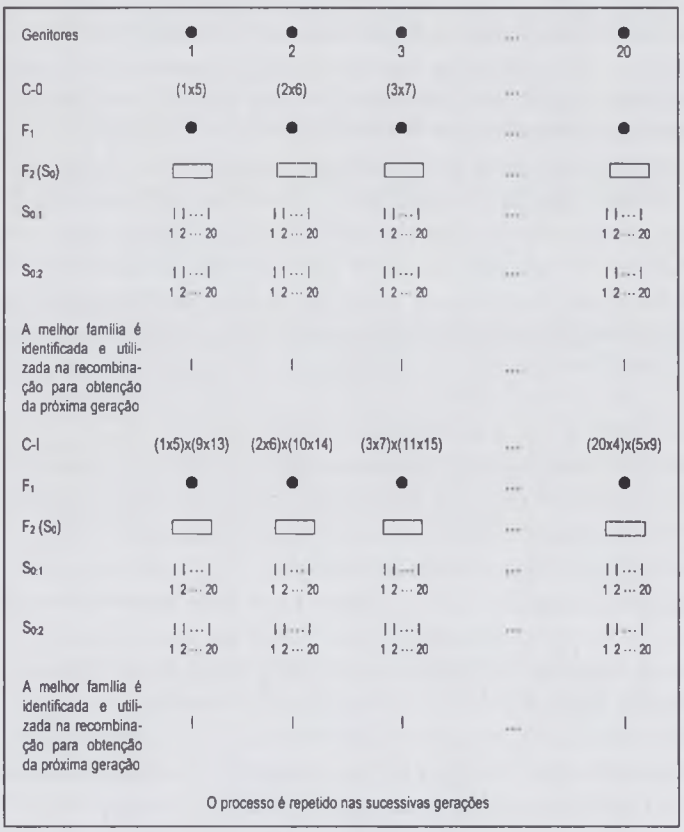


FIGURA 10. Proposta de condução de um programa de seleção recorrente. Os cruzamentos em cada recombinação são efetuados de modo que a contribuição de todos os genitores seja igual. O esquema de cruzamentos é apresentado por Ramalho (1997).

são escolhidos de modo que nos sucessivos intercruzamentos a contribuição de cada genitor seja a mesma. Uma sugestão para os cruzamentos a serem feitos em cada etapa foi fornecido por Bearzoti, citado por Ramalho (1997). Assim, em cada intercruzamento são geradas 20 populações híbridas. De cada uma delas são obtidas separadamente as sementes das gerações F_1 e F_2 (S_0) e geradas 20 famílias $S_{0:1}$ por população segregante. Elas são avaliadas nas gerações $S_{0:1}$ e $S_{0:2}$ e identificada a melhor. A melhor família, por população, é recombinada para se obter o ciclo I. Nesse caso, a recombinação novamente é efetuada utilizando-se um dialelo circulante, em que cada família é cruzada com duas outras, com o cuidado de não envolver famílias oriundas dos mesmos genitores da etapa anterior (Ramalho, 1997). O procedimento é repetido nos ciclos subseqüentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. de F.B. Predição do potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais. Lavras: UFLA, 1997. 79p. Tese, Doutorado.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. Rio de Janeiro: Edgard Blucher, 1971. 379p.

ALLARD, R.W. Genetic changes associated with the evolutionof adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. **Journal of Heredity**, v.79, p.225-238, 1988.

ALTMAN, D.W.; BUSCH, R.W. Random intermating before selection in spring wheat. **Crop Science**, v.24, p.1085-1089, 1984.

BAENZIGER, P.S.; PETERSON, C.J. Genetic variation: Its origin and use for breeding self-pollinated species. In: STALKER, H.T.; MURPHY, J.P. (Ed.) **Plant breeding in the 1990's**. Raleigh: North Carolina State University, 1991. p.69-100.

BEAVER, J.S.; KELLY, J.D. Comparison of selection methods for dry bean populations derived from crosses between gene pools. **Crop Science**, v.34, p.34-37, 1994.

BERNARDO, R. Correlation between tests cross performance of lines at early and last selfing generation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.17-21, 1991.

CORTE, H.R.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B. Ganho genético com a seleção natural após 12 gerações de endogamia em populações segregantes do feijoeiro. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5.,Viçosa, 1998. **Resumos**. Viçosa: SBG/UFV, 1998. p.68.

CRUZ, C.D. Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 188p. Tese, Doutorado.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390p.

CUTRIM, V. dos A.; RAMALHO, M.A.P.; CARVALHO, A.M. Eficiência da seleção visual na produtividade de grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.601-606, 1997.

De KOEYER, D.L.; STUTHMAN, D.D.; FULCHER, R.G.; POMERANKE, G.J. Effects of recurrent slection for grain yield on oat kernel morohology. **Crop Science**, v.33, p.924-928, 1993.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: MacMillan, 1987. 525p.

FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. de; SANTOS, M.X. dos; RAMALHO, M.A.P. Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.1189-1194, 1995.

FERREIRA, W.D. Implicação do número de famílias no processo seletivo na cultura do feijoeiro. Lavras: UFLA, 1998. 66p. Dissertação, Mestrado.

FOUILLOUX, G., BANNEROT, H. Selection methods in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GEPTS, P. (Ed.) **Genetics resources of *Phaseolus* beans**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.503-541.

FREY, K.J. The use of F_2 lines in predicting the performance of F_3 selections in two barley crosses. **Agronomy Journal**, v.46, p.541-544, 1954.

GERALDI, I.O. Selección recurrente en el mejoriamento de plantas. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.) **Seleccion recurrente en arroz**. Cali: CIAT, 1997. p.3-11.

GUIMARÃES, E.P.; FEHR, W.R. Alternative strategies of recurrent selection for seed yield of soybean. **Euphytica**, v.40, p.111-119, 1989.

HALLAUER, A.R. Compedium of recurrent selection methods and their applications. **CRC Review in Plant Science**, v.3, p.1-33, 1986.

HANSON, W.D. The breakup of initial linkage blocks under selection mating systems. **Genetics**, v.44, p.857-868, 1959.

JINKS, J.L.; POONI, H.S. Predicting the properties of recombinant inbred lines derived by single seed descent. **Heredity**, v.36, p.253-266, 1976.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p.265-327, 1995.

LOVE, H.H. **Report on rice investigations: 1950-54.** Bangkok: United States Operations Mission to Thailand, 1955. 148p.

MEREDITH, W.R.J.; BRIDGE, R.R. Breakup of linkage blocks in cotton, *Gossypium hirsutum* L. **Crop Science**, v.11, p.695-698, 1971.

OSPINA, Y.; BORRERO, I.; GUIMARÃES, E.P.; CHATEL, M. Ciclos de intercruzamiento y variabilidad genética em poplaciones de arroz. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.) **Seleccion recurrente en arroz.** Cali: CIAT, 1997. p.45-75.

OTUBO, S.T.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B.; SANTOS, J.B. dos. Genetic control of low temperature tolerance in germination of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v.89, p.313-317, 1996.

PIPER, T.E.; FEHR, W.R. Yield improvement in a soybean population by utilizing alternative strategies of recurrent selection. **Crop Science**, v.27, p.172-178, 1987.

RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijoeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, Lavras, 1997. **Anais**. Lavras: UFLA, 1997. p.167-196.

RAMALHO, M.A.P.; PINTO, C.A.B.P.; SANTA CECÍLIA, F.C. Avaliação de amostra de cultivares de feijão roxo e seleção de progênies. **Ciência e Prática**, v.6, p.35-43, 1982.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; ZIMMERMANN, M.J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**: aplicações ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

RANALLI, P. Phenotypic recurrent selection in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on performance of S_2 progenies. **Euphytica**, v.87, p.127-132, 1996.

RANGEL, P.H.N.; NEVES, P.C.F. Selección recurrente aplicada al arroz de riego en Brasil. In: GUIMARÃES, E.P. (Ed.) **Seleccion recurrente en arroz**. Cali: CIAT, 1997. p.79-97.

RANGEL, P.H.N.; ZIMMERMANN, F.J.P.; NEVES, P.C.F. Estimativas de parâmetros genéticos e resposta à seleção nas populações de arroz irrigado CNA - IRAT 4 PR e CNA - IRAT 4 ME. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.905-912, 1998.

SILVA, H.D.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B.; MARTINS, L.A.M. Efeito da seleção visual para produtividade de grãos em populações segregantes de feijoeiro. **Ciência e Prática**, v.18, p.181-185, 1994.

SOUZA JR., C.L. **Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento genético vegetal.** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1989. 134p.

TRILLER, C. **Previsão do potencial genético de cruzamentos em soja pela geração F_3**. Londrina: UEL; EMBRAPA; IAPAR, 1994. 133p. Dissertação, Mestrado.

UPHOFF ,M.D; FEHR,W.R; CIANZIO,S.R. Genetic gain for soybean seed yield by three recurrent selection methods. **Crop Science**, v.37, p.1155-1158, 1997.

VEIGA, R.D. Eficiência dos dialelos circulantes na escolha de genitores, avaliada com simulação de dados. Lavras: UFLA, 1998. 95p. Tese, Doutorado.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. (Ed.) **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.137-209.

WANG, X.W.; LAI, J.R.; FAN, L.; ZHANG, R.B. Effects of recurret selection on populations of various generations in wheat by using the Tai Gu single dominant male-sterile gene. **Journal of Agricultural Science**, v.126, p.397-402, 1996.

WERNER, B.K.; WILCOX, J.R. Recurrent selection for yield in *Glycine max* using genétic male-sterility. **Euphytica**, v.50, p.19-26, 1990.

10

GENÉTICA E MELHORAMENTO DE POPULAÇÕES MISTAS

ROLAND VENCOVSKY[1]
MAURICIO BALLESTEIRO PEREIRA[2]
JOÃO RIBEIRO CRISÓSTOMO[3]
MARIA ALDETE J. DA F. FERREIRA[4]

[1]Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.
[2]Depto. de Genética - UFRRJ, Br 465 Km 7 - Seropédica - CEP: 23890-000 - Rio de Janeiro, RJ.
[3]Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Planalto Pici - CEP: 60511-110 - Fortaleza, CE.
[4]Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas - Depto. de Genética, USP/ESALQ.

1. INTRODUÇÃO

Normalmente, em termos de sistema reprodutivo, as plantas que se reproduzem sexuadamente podem ser classificadas em alógamas ou autógamas, a depender da taxa de autofecundação (s) ou de fecundação cruzada (t). Estas taxas, no entanto, podem variar de 0 a 100%. As populações que apresentam grau intermediário de autofecundação, ou seja entre 5% a 95%, são denominadas parcialmente autógamas, parcialmente alógamas, intermediárias ou mistas. O algodão, o café, o cacau, o feijão fava, o girassol, o melão, a melancia e o sorgo, são alguns exemplos de plantas de interesse econômico que apresentam sistema reprodutivo misto (Frankel & Galun, 1977; Crisóstomo, 1989; Ferreira, 2000).

A teoria do melhoramento tem sido amplamente estudada, mas geralmente na suposição da endogamia total ou da panmixia. Assim, a base teórica para o melhoramento genético de populações mistas é ainda em parte desconhecida, porém o interesse nesse estudo aumentou a partir da publicação de alguns trabalhos importantes como os de Ghai (1982), Cockerham & Weir (1984) e Wright & Cockerham (1985; 1986).

As populações mistas diferem daquelas com alogamia ou com autogamia completa, pois consistem de uma mistura de indivíduos que apresentam diferentes graus de endogamia e, conseqüentemente, diferentes coeficientes de endogamia. Como a endogamia influi nos valores dos fenótipos individuais, bem como nas variâncias genéticas, o efeito da seleção é mais complexo nessas populações.

De início, serão vistas neste capítulo, as principais hipóteses de evolução das populações mistas. Posteriormente, será abordada a estrutura genética e a decomposição da variância genética, bem como o progresso genético na seleção. Por fim, serão sintetizadas as principais vantagens e limitações dessas populações em relação ao melhoramento genético e à estimação de parâmetros genéticos.

2. FATORES EVOLUTIVOS

O significado ecológico e evolutivo do sistema reprodutivo das plantas tem sido investigado desde o século XIX. Darwin, por exemplo, acreditava que a autogamia era desvantajosa em relação à alogamia, em decorrência dos efeitos depressivos da endogamia e dos mecanismos que favorecem a alogamia. Entretanto, tanto a alogamia quanto a autogamia são sistemas reprodutivos bem estabelecidos nos vegetais e fazem parte de estratégias adaptativas. Schemske & Lande (1985) ao utilizarem informações disponíveis sobre a taxa de fecundação cruzada em populações naturais, verificaram que o sistema reprodutivo de 55 espécies ficou agrupado em duas classes: uma com predomínio de autofecundação ($s \geq 0,8$) e outra com predominância de fecundação cruzada ($t \geq 0,8$).

Além disso, a existência de grande número de espécies autógamas demonstra ser esse sistema adaptativo e vantajoso, sob certas condições, conforme têm sido

destacado por Stebbins (1957), Allard *et al.* (1968), Antonovics (1968), Well (1979) e Richards (1986), os quais argumentam que a eficiência reprodutiva é um caráter marcante nas autógamas, uma vez que todos os óvulos são fertilizados, o que nem sempre ocorre com as alógamas. Também o dispêndio de energia no processo de fertilização é menor, não havendo gastos com transporte de pólen. Ainda, de acordo com esses autores, a autogamia pode ser favorecida quando: a) a dispersão de sementes a longa distância cria uma situação em que somente os indivíduos autoférteis são capazes de se perpetuar; b) perturbações nas condições ambientais provocam uma baixa densidade de indivíduos e polinizadores, tornando a autofertilidade vantajosa; c) existe precocidade no florescimento e conseqüentemente poucas plantas apresentam flores aptas à polinização, favorecendo a autofecundação; d) ocorrem diferentes populações de uma mesma espécie, mas com caracteres adaptativos distintos, tornando a prevenção do fluxo gênico vantajosa, uma vez que o cruzamento pode levar à diluição desses caracteres.

Segundo Lloyd, citado por Ronfort & Couvet (1995), Lande & Schemske (1985) e Schemske & Lande (1985), os modelos teóricos sobre a evolução do sistema reprodutivo de vegetais superiores, apontam para uma distribuição bimodal, ou seja, a existência de apenas dois sistemas reprodutivos estáveis na natureza (alogamia e autogamia). Considerando que em uma determinada população relativamente grande, que se reproduz por meio de acasalamentos aleatórios, ocorreu uma redução drástica de indivíduos (gargalo ou afunilamento genético ou *bottleneck*), provocando, com o decorrer das gerações, o acasalamento entre indivíduos aparentados, acredita-se que, a depender da intensidade da depressão endogâmica, essa população poderá evoluir para a autogamia ou permanecer alógama.

Quando a mencionada população possuir alelos recessivos que diminuem a sobrevivência ou a reprodução, isto é, provoquem diminuição do valor adaptativo, haverá, a princípio, uma considerável depressão pela endogamia com a exposição dos alelos deletérios. Caso essa população reconquiste alta média de valor adaptativo, devido à eliminação dos alelos deletérios pela seleção natural (*purging process*) e atinja alto nível de homozigose, ela tornar-se-á, então, autógama, em decorrência da ação combinada da endogamia e da seleção natural (Futuyma, 1993). Por outro lado, se a população apresentar forte depressão pela endogamia, a ponto de afetar a sobrevivência dos descendentes, a seleção natural atuará no sentido de manter a alogamia, favorecendo os indivíduos que possuam genes determinantes da fecundação cruzada. Essa hipótese é validada pelo fato de que muitas espécies monóicas e hermafroditas possuem mecanismos que promovem a fecundação cruzada, como por exemplo, a macho-esterilidade, auto-incompatibilidade, protoginia e protandria (Schemske & Lande, 1985; Lande & Schemske, 1985).

Certamente, a colonização de novas áreas por poucos indivíduos e a eliminação do custo da fecundação cruzada, associados a outros fatores, influenciaram na evolução da autogamia (Stebbins, 1957; Antonovics, 1968; Richards, 1986), ao passo que a variação ambiental favoreceu a seleção para a alogamia e a recombinação. É duvidoso que somente esses fatores possam ter produzido uma vantagem sensível da alogamia (Richards, 1986), porém, o fato de a maioria das espécies arbóreas serem de polinização cruzada enfatiza a necessidade de recombinação.

Com base nos estudos citados acima, acreditava-se que o sistema misto de reprodução não era estável na natureza, representando apenas uma forma alternativa

diante das adversidades ambientais. No entanto, conforme Jarne & Charlesworth e Uyenoyama citados por Ronfort & Couvet (1995), alguns fatores ecológicos e genéticos são responsáveis pela estabilidade de sistemas mistos de reprodução na natureza, como por exemplo, a estruturação genética de uma população. Em decorrência de fluxo gênico restrito (dispersão restrita de pólen e sementes), as populações, freqüentemente, estão estruturadas no espaço, o que favorece cruzamentos entre indivíduos vizinhos, algumas vezes geneticamente aparentados, que neste caso é denominado como endogamia biparental (*biparental inbreeding*). Com a ocorrência de endogamia biparental, o parentesco genético entre pais e filhos é maior do que quando ocorrem cruzamentos entre indivíduos não aparentados. Como conseqüência, tem-se uma diminuição no custo da fecundação cruzada e um aumento na transmissão da autofecundação. Há a possibilidade, então, de seleção e estabelecimento de um sistema misto de reprodução, uma vez que o parentesco entre pais e filhos aumenta com a taxa de autofecundação da população atenuando a depressão pela endogamia, enquanto que o custo da fecundação cruzada diminui. Assim, a diminuição do custo da fecundação cruzada favorece a ocorrência de cruzamentos naturais e, simultaneamente, a atenuação da depressão promove a ocorrência de autofecundações, caracterizando um sistema reprodutivo misto.

Ronfort & Couvet (1995) com o objetivo de analisar a estabilidade de sistemas mistos de reprodução na natureza, simularam uma população finita, diplóide, hermafrodita e estruturada geneticamente, com taxa parcial de autofecundação e com dispersão restrita de pólen e sementes. A principal conclusão foi que sistemas mistos de reprodução podem tornar-se estáveis, somente quando as populações ficarem estruturadas devido à ocorrência de endogamia biparental.

Características morfológicas ou fenotípicas também influenciam a taxa de fecundação cruzada. Brow & Clegg (1984), por exemplo, ao estudarem populações de *Ipomoeae purpurea*, polimórficas para cor de flores, constataram menor índice de visita de polinizadores em flores brancas, as quais exibiram uma taxa de cruzamento de 40%, contra 70% nas flores coloridas. Esses resultados confirmaram-se em trabalhos posteriores, com diferentes densidades para cada tipo de flor. Quando as flores brancas estavam em menor densidade, o índice de polinizadores nestas era reduzido. Em contraste, as flores azuis ou rosa, mesmo quando em minoria, eram bastante visitadas e apresentavam maior taxa de cruzamento (Epperson & Clegg, 1987).

Outro exemplo que pode ser citado é o caso da melancia (*Citrullus lanatus*), cucurbitácea de origem africana, que foi introduzida no Nordeste do Brasil, durante o Brasil Colônia, por ocasião do tráfico de escravos. Estudos de populações tradicionais de melancia coletadas no Nordeste, considerado como centro de diversidade (Romão, 1995), têm demonstrado a existência de grande variabilidade para diversos caracteres da planta e dos frutos (Assis, 1994; 1999; Borges *et al.*, 1999; Dias *et al.*, 1996; Ferreira, 1996; 2000; Queiróz, 1993; 1998; Queiróz *et al.*, 1996; 1999; 2000), inclusive para a expressão sexual (Ferreira *et al.*, 1995). Essa variabilidade genética deve-se à grande amplitude de germoplasma trazido de diferentes partes da África, à forma de cultivo sem o emprego de insumos modernos, à seleção de sementes para o próximo plantio de acordo com o critério e à necessidade de cada produtor, à diversidade edafoclimática e aos processos de migração e fluxo gênico que vêm

ocorrendo há muitos anos (Romão, 1995). Em relação à expressão sexual, Ferreira *et al.* (1995), ao avaliarem, em casa de vegetação, as populações B9 e P14, coletadas respectivamente na Bahia e em Pernambuco, verificaram altas porcentagens de autofecundações naturais nessas populações, as quais apresentaram plantas com flores masculinas e hermafroditas, caracterizando andromonoicismo. Vale salientar que o caráter andromonoicismo é controlado por um alelo recessivo em relação ao monoicismo (plantas que apresentam flores masculinas e femininas) e que a expressão sexual é também influenciada por fatores abióticos. Em condições de campo, as populações andromonóicas podem apresentar um sistema misto de reprodução, pois pode ocorrer tanto autofecundação das flores hermafroditas quanto cruzamento via pólen oriundo de outra planta, ou serem mais próximas das autógamas, a depender da taxa de autofecundação. Já nas populações monóicas, a autofecundação natural também é possível, por meio da fertilização de flores femininas com pólen de flores masculinas da mesma planta, porém com menor probabilidade. Assim, essas populações podem ser mistas, porém mais próximas das alógamas ou das predominantemente alógamas. Em populações segregantes para expressão sexual, o sistema reprodutivo deve variar entre predominantemente alógamo até predominantemente autógamo, a depender da freqüência de plantas monóicas e andromonóicas. Ferreira (2000), por exemplo, constatou que uma população segregante para expressão sexual, com 53,5% de plantas monóicas e 46,5% de plantas andromonóicas, apresentou um sistema misto de reprodução, porém tendendo mais para a alogamia.

Provavelmente as populações andromonóicas de melancia evoluíram das populações monóicas. O alelo recessivo que determina o andromonoicismo (*a*) certamente mantinha-se em indivíduos monóicos heterozigóticos (*Aa*). Romão (1995) ao estudar a dinâmica evolutiva da melancia no Nordeste brasileiro, constatou a existência de bancos naturais de sementes, formados em virtude da ação conjunta de fatores genéticos (genes que condicionam dormência de sementes e explosão dos frutos), ecológicos (dispersão de sementes pelo lobo guará) e cultural (sementes deixadas no solo devido ao consumo de frutos no campo). A existência de bancos de sementes juntamente com a persistência de populações em condições adversas e os diferentes sistemas de cultivo (surgimento de plantas por escape de cultivo que são mantidos como fonte alternativa de alimentação para a família e os animais; cultivo que tem como finalidade o consumo familiar com a venda de excedentes; cultivo que visa à comercialização dos frutos), possibilitaram o surgimento de populações subespontâneas que, evidentemente, devem ser formadas por poucos indivíduos, o que promove o acasalamento entre parentes e, com o decorrer das gerações, a fixação de alelos, como por exemplo, daquele que condiciona andromonoicismo.

Mediante o exposto, percebe-se que o modo de reprodução pode variar entre populações de uma mesma espécie, a depender tanto de fatores genéticos quanto ambientais. A existência destes sistemas reprodutivos, na verdade, evidencia que o modo de reprodução de uma espécie é o resultado do conflito entre a demanda por adaptação imediata e a necessidade de adaptação de longo prazo. De qualquer forma, Allard (1971) já dizia que a alogamia é desfavorável no curto prazo e a autogamia um alto risco no longo prazo. Essas noções reforçam a idéia de que espécies com sistema de reprodução misto, por serem mais flexíveis, podem ser predominantes na natureza.

3. ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A seguir, será visto como estimar a taxa de autofecundação ou de fecundação cruzada de uma população, assim como serão apresentadas algumas propriedades genéticas e particularidades de populações que praticam sistema misto de reprodução, enfocando-se aspectos que podem ser de interesse do melhorista de plantas. Esse tipo de abordagem tornou-se mais importante, nos últimos anos, porque o sistema de reprodução pode agora ser determinado com muito mais precisão, através de marcadores genéticos. Esta apresentação baseia-se principalmente nas teorias desenvolvidas por C. Clark Cockerham e seu grupo, da *North Carolina State University*. Pesquisas afins, realizadas posteriormente no Brasil, também são incluídas para compor o texto.

3.1 MÉTODOS DE ESTIMAÇÃO DA TAXA DE AUTOFECUNDAÇÃO OU DE FECUNDAÇÃO CRUZADA

As primeiras investigações sobre o sistema reprodutivo foram realizadas por meio do emprego de métodos empíricos, os quais não forneciam estimativas diretas de parâmetros envolvidos no modo de reprodução, como por exemplo da taxa de autofecundação natural. Na década de 50, geneticistas iniciaram o uso de marcadores genéticos e modelos estatísticos elementares para determinar quantitativamente o processo de reprodução. Os marcadores genéticos inicialmente utilizados eram morfológicos. Jones citado por Shaw *et al.* (1981), pioneiro nesse tipo de estudo, plantou número igual de plantas de tomate homozigóticas para os caracteres nanismo (recessivo) e normal (dominante), em fileiras alternadas, e colheu sementes nas fileiras anãs, contando o número de plantas normais originadas destas sementes para calcular a taxa de cruzamento. Determinou o estimador de máxima verossimilhança, $\hat{t} = h/p$, em que h corresponde à freqüência de filhos heterozigóticos oriundos dos genitores recessivos e p a freqüência do alelo dominante na população ($0 < p \leq 1$).

Segundo Clegg (1980), a quantificação do sistema reprodutivo tem-se desenvolvido muito devido a dois fatores: a) advento e desenvolvimento das técnicas de marcadores bioquímicos e moleculares; b) desenvolvimento de métodos e modelos estatísticos mais elaborados, os quais permitem descrever detalhes da transmissão genética.

Os marcadores bioquímicos e moleculares codominantes (isoenzimas, RFLP, microssatélites) são os mais indicados para estudos com esse propósito, pois possibilitam a identificação de todas as classes genotípicas diretamente de seus fenótipos moleculares. A técnica isoenzimática é a mais utilizada até o momento, em decorrência de ser mais barata quando comparada às demais. No entanto, marcadores moleculares dominantes (RAPD, AFLP) também já foram empregados para estimar taxas de cruzamentos, cujos valores foram similares aos obtidos com marcadores codominantes (Gaiotto, 1996; Gaiotto *et al.*, 1997).

Foram desenvolvidas várias metodologias para estimação de parâmetros do sistema reprodutivo, considerando algumas situações específicas, como a estimativa da taxa de cruzamento com base em um loco e nos arranjos genotípicos de progênies maternas, nas quais o genótipo materno é desconhecido (Brown & Allard, Clegg *et al.* citados por Schoen & Clegg, 1984); estimativa de máxima verossimilhança da

taxa de cruzamento e das freqüências alélicas, com base em dados de vários locos (Ritland & Jain, 1981; Shaw *et al.*, 1981); estimativa da taxa de cruzamento e das freqüências alélicas usando locos marcadores com alelos nulos (Ross, 1986), codominantes e dominantes (Ritland, 1990), entre outras. Estas metodologias são baseadas em dois modelos genéticos: a) modelo de sistema misto de reprodução; b) modelo de cruzamentos biparentais.

No modelo de sistema misto de reprodução, os filhos de cada planta materna representam um arranjo genético derivado de óvulos que cruzam com probabilidade t com um conjunto de grãos-de-pólen com freqüência gênica p, e que se autofecunda com probabilidade $s=1-t$. Este método impõe duas pressuposições. A primeira, que a taxa de cruzamento é constante e independente do genótipo materno e a segunda que o conjunto de pólen da população é distribuído uniformemente entre todos os óvulos das plantas mãe, isto é, cada evento de cruzamento é considerado como resultado da fertilização dos óvulos por um composto de pólen, oriundo de todos os genótipos da população (Clegg, 1980; Ritland & Jain, 1981).

Segundo Ennos & Clegg (1982) pode ocorrer violação da pressuposição de distribuição uniforme de pólen sobre todas as plantas mãe quando, por exemplo, uma população for dividida em subpopulações que diferem em freqüências genotípicas e entre as quais há fluxo de pólen limitado. Além disso, constataram que a estimativa da taxa de cruzamento é superestimada quando a freqüência gênica varia entre as subpopulações e que o grau do viés cresce quando aumenta o valor verdadeiro de t.

Schoen & Clegg (1984) também demonstraram, por simulação, que o uso do modelo de sistema misto de reprodução, em alguns casos, pode levar a estimativas incorretas dos parâmetros do sistema reprodutivo, principalmente quando as pressuposições são violadas. Em decorrência disso, propuseram um modelo alternativo denominado modelo de cruzamento biparental. Este modelo, ao contrário do anterior, pressupõe que os indivíduos oriundos de cruzamentos naturais são formados por pólen de um único genitor, isto é, que os óvulos da planta mãe são fecundados por pólen de apenas uma planta paterna.

Schoen & Clegg (1986) fizeram simulações com base nestes dois modelos com o objetivo de examinar as conseqüências da violação das diferentes pressuposições impostas quanto à distribuição de pólen entre as plantas mãe. Os resultados demonstraram que as violações das pressuposições de ambos os modelos levam a erros de estimação das freqüências genotípicas dos genitores, das variâncias dos parâmetros estimados e das distribuições das estimativas, as quais desviam da normalidade, sendo que a magnitude do viés aumenta com a taxa de cruzamento.

A escolha do modelo a ser empregado para estimação dos parâmetros do sistema reprodutivo pode ser baseada em alguns fatores como o agente polinizador (vento, insetos etc.), a fenologia do florescimento e a maneira pela qual as sementes das progênies são obtidas (a partir de um fruto ou de mais frutos por planta). Por exemplo, em uma população grande, na qual as plantas produzem poucas flores e/ou os frutos produzem poucas sementes e em que a polinização seja efetuada pelo vento, o modelo de sistema misto de reprodução pode ser mais apropriado, pois a probabilidade de os óvulos das plantas mãe serem fecundados por um conjunto de pólen composto de grãos-de-pólen de todos os indivíduos da população é maior. Já

no caso das plantas que produzem muitas flores e/ou os frutos produzem muitas sementes e em que o agente polinizador é um inseto, essa probabilidade é menor. Em conseqüência, nos eventos resultantes de fecundação cruzada devem estar envolvidos um ou poucos genótipos paternos; nesse caso o modelo biparental pode ser mais adequado (Schoen & Clegg, 1986). Uma boa alternativa para aumentar a precisão das estimativas dos parâmetros é utilizar dados de vários locos, ou seja, obter estimativas considerando mais de um loco por população.

Shaw *et al.* (1981) propuseram a estimação da taxa de cruzamento por meio de dados de vários locos simultaneamente (t_m *multilocus*). O método é baseado no arranjo de progênies e no emprego de marcadores genéticos codominantes. Ritland & Jain (1981) e Ritland (1990) também propuseram metodologias e programas computacionais para estimações de parâmetros populacionais e do sistema reprodutivo com base em dados de vários locos simultaneamente, empregando-se tanto marcadores genéticos codominantes quanto dominantes. As estimativas da taxa de cruzamento com base em vários locos simultaneamente (t_m *multilocus*), bem como as baseadas na média das estimativas de cada loco separadamente (t_m *single locus*), além da estimativa do coeficiente de endogamia (F), são obtidas por máxima verossimilhança. Também são fornecidas estimativas de t_m para cada família e inferido o genótipo materno.

Vale salientar que é muito importante a obtenção de estimativas precisas e consistentes das taxas de autofecundação ou de fecundação cruzada e do coeficiente de endogamia, especialmente em populações mistas e, principalmente, quando o objetivo é estudar parâmetros quantitativos. Apesar de as estimativas estarem coerentes com o esperado geneticamente, Ferreira (2000) constatou a necessidade do aprimoramento das metodologias e dos programas computacionais disponíveis para estimação desses parâmetros. Ao utilizar o programa MLDT (*Multilocus Estimation of Outcrossing with Dominant Markers*), desenvolvido por Ritland (1990), surgiram estimativas da taxa de fecundação cruzada superiores ao possível, ou seja superiores a 1,0, em três famílias maternas, em decorrência do próprio processo de estimação (máxima verossimilhança). De acordo com Ritland (1990), tais resultados são comuns, mas não invalidam a estimativa média da população. De qualquer maneira, como já comentado, o aprimoramento das metodologias e programas computacionais existentes, torna-se de extrema importância.

3.2 MODELO BÁSICO E EQUILÍBRIO

Para discutir um assunto dessa natureza é necessário dispor de modelos que, na medida do possível, descrevam os fenômenos genéticos e que estejam mais próximos da realidade. Dada a complexidade que esses fenômenos geralmente têm, costuma-se partir de modelos simplificados, relaxando-se suas restrições no decorrer das pesquisas.

Como visto anteriormente, sob sistema misto, admite-se que cada planta numa dada geração, pratica uma taxa s de autofecundação natural e portanto uma taxa $t = 1 - s$ de fecundação cruzada. Essa taxa é considerada constante de uma planta para outra. Populações em que $s \leq 0,05$, são, para fins práticos, consideradas alógamas e as com $s \geq 0,95$ consideradas autógamas. As demais, em que $0,05 < s < 0,95$, são consideradas de sistema misto.

Sendo a autogamia ou a alogamia apenas parcial, pode-se descrever as freqüências genotípicas (Q) num dado loco (B, b) através de: $Q_{BB} = p^2 + Fpq$; $Q_{Bb} = 2pq\ (1 - F)$ e $Q_{bb} = q^2 + Fpq$, sendo F o índice de fixação ou, neste caso, o coeficiente de endogamia e p e q as freqüências dos alelos B e b, respectivamente. Tal modelo também é aplicável havendo alelos múltiplos. Partindo de uma população qualquer e se esta praticar uma taxa s, constante também ao longo das gerações, ela entrará em equilíbrio com respeito ao sistema reprodutivo. Nesse ponto de equilíbrio haverá uma relação entre o coeficiente F e a taxa s, ou seja, $F = s/(2 - s)$ e o equilíbrio pode ser chamado de equilíbrio de Wright ou de endogamia. As freqüências Q_{BB}, Q_{Bb} e Q_{bb} não se alterarão através das gerações de reprodução natural, desde que não haja seleção, migração e deriva genética e de modo que as mutações possam ser consideradas desprezíveis.

Investigando o assunto verifica-se que tal equilíbrio é atingido apenas assintoticamente. Isso é importante não apenas em termos de teoria, mas também para fins práticos, pois para lançar uma variedade melhorada, por exemplo, é preciso esperar que o material entre em equilíbrio. Isso requer mais gerações do que é necessário nas panmíticas. Convém enfatizar que a seleção, nessas situações, gera desequilíbrio. Da mesma forma está em desequilíbrio uma população F_2 do cruzamento de dois genitores contrastantes, mesmo se essa F_2 for obtida por polinização aberta de plantas F_1.

A velocidade de aproximação ao equilíbrio depende do valor de s. Por ser um fenômeno gradual (assintótico), Pereira *et al.* (1986) quantificaram-no com base na homozigose, ou na freqüência de homozigotos (H) numa dada geração. Assim, considerando uma população que apresenta sistema misto de reprodução, sendo H_1 e H_∞ as homozigoses na geração inicial e no equilíbrio, respectivamente, e H_N a homozigose alcançada na geração N, o número de gerações de reprodução natural (N) necessário para que uma certa proporção (x) do equilíbrio total possível seja atingido é:

$$N = \frac{log[(1 - x)\, s/2]}{log\,(s/2)} \qquad (1)$$

sendo,

$$x = \frac{H_N - H_1}{H_\infty - H_1} \qquad (2)$$

A quantidade básica é, no caso, o valor de x, que mede a fração do acréscimo total ($H_\infty - H_1$) da homozigose que se pode alcançar com N gerações de reprodução natural. Tomando por exemplo, $s = 0{,}5$ e especificando-se 90% para x, ou seja $x = 0{,}90$, tem-se que $N = 2{,}7 \equiv 3$ gerações.

A Expressão 1 não se aplica para $s = 0$ ou se $x = 1{,}0$. Mas, se a taxa s tender a zero, N tenderá a 1,0, como esperado sob panmixia. Por outro lado, se $s = 1$ e $x = 0{,}9$, $N = 4{,}3$ ou $\equiv 5$ gerações, como é sabido para autógamas. A Tabela 1 mostra valores de N para $x = 0{,}90$ e $x = 0{,}95$, obtidos pela Expressão 1 e considerando-se diferentes taxas s. Tais valores podem servir de referencial para o melhorista, de modo que valores fracionários devem ser arredondados para mais.

TABELA 1. Número de gerações de reprodução natural (*N*) necessário para atingir a fração *x* do acréscimo de homozigose. População inicial em desequilíbrio de endogamia e valores de *s* constante dentro de cada tipo de população.

S	*N*	
	x = 0,90	x = 0,95
0,0	1,0	1,0
0,1	1,8	2,0
0,3	2,2	2,6
0,5	2,7	3,2
0,7	3,2	3,8
0,9	3,9	4,8
1,0	4,3	5,3

Fonte: Pereira *et al.* (1986)

Essa condição de equilíbrio com endogamia, conforme já mencionado, é importante quando se pensa em lançar população melhorada por seleção, na forma de uma variedade. Estando a população fora ou distante do equilíbrio total possível, o material pode modificar-se ao nível do produtor, se ele reutilizar suas próprias sementes para semeadura. É igualmente importante em estudos que visam estimar os componentes da variância genética, assim como, quando se pretende compreender quanto da variância genética aditiva está sendo explorada num certo esquema de seleção. Esse equilíbrio, no entanto, só pode ser garantido num material cujo passado de reprodução se conhece. Populações que vêm se multiplicando naturalmente por várias gerações devem estar em equilíbrio ou muito próximo dele. Variedades locais devem se enquadrar nessa condição.

Satisfeita a situação de equilíbrio, pode-se estimar o coeficiente F a partir da taxa s. Nas populações predominantemente alógamas em que, por exemplo, $s = 0,05$, obtém-se $F = 0,026$ que é, de fato, muito pequeno. Nas predominantemente autógamas, sendo $s = 0,95$, resulta $F = 0,905$ que é consideravelmente alto. Mas é oportuno lembrar que a relação entre s e F não é linear. Com 50% de autofecundação natural ($s = 0,5$) tem-se $F = 0,33$ que é menor que 0,5.

Nos esquemas de melhoramento em que são feitas autofecundações manualmente, para gerar progênies S_1 por exemplo, haverá acréscimo da endogamia, porém claramente menor do que nas alógamas. Tendo-se inicialmente $F_0 = s/(2 - s)$ sob equilíbrio, com uma geração de autofecundação resulta $F_1 = (1 + F_0)/2$ e com mais uma, $F_2 = (1 + F_1)/2$, etc. Tomando como exemplo uma espécie intermediária em relação à taxa de autofecundação ($s = 0,5$), tem-se $F_0 = 0,333$ e $F_1 = 0,666$ e um acréscimo $\Delta F = 0,333$. Noutra, com $s = 0,75$ o incremento da endogamia é de $\Delta F = 0,20$. Compreende-se daí porque a depressão endogâmica, como a observada em material autofecundado, tende a ser menor nas espécies mistas, visto que essa depressão é diretamente proporcional ao acréscimo no nível de endogamia (ΔF). Nas alógamas tem-se $\Delta F = 0,5$ com uma geração de autofecundação, se inicialmente $F_0 = 0$.

Uma grande questão, que na realidade é um ponto fraco desse modelo, é admitir que a taxa s é igual para todas as plantas e, além disso, constante ao longo das gerações. Para relaxar essa condição, foi feita simulação de dados[5], gerando-se uma população constituída por 10.000 plantas, a cada geração. Em um caso, variou-se a

[5]Coelho, A.S.G. (Universidade Federal de Goiás). Comunicação pessoal, 2000.

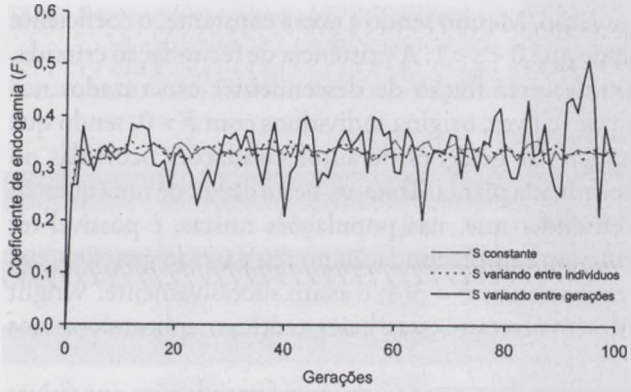


FIGURA 1. Simulação de populações com sistema misto de reprodução ao longo de 100 gerações. Variação no coeficiente de endogamia supondo *s* constante, *s* variando somente entre indivíduos e *s* variando somente entre gerações.

taxa *s* entre as plantas, porém mantendo-a fixa e igual no transcorrer das gerações. Em outro caso, admitiu-se a taxa *s* fixa em todas as plantas de uma dada geração, permitindo que variasse ao longo das gerações. Considerou-se que esse parâmetro variava aleatoriamente, de acordo com uma certa distribuição. Isso significa, entre outros aspectos, que a taxa de autofecundação não estava sob controle genético. As conseqüências dessa variação na taxa *s* foram averiguadas por meio do coeficiente de endogamia (*F*), estimado a cada geração. Em termos médios considerou-se $s = 0,5$. A Figura 1 mostra os valores de *F*, cobrindo 100 gerações de reprodução mista. Na simulação foi acrescentada, ainda, a situação em que $s = 0,5$ para todas as plantas e todas as gerações. Com a taxa *s* constante, nota-se que o coeficiente *F* varia muito pouco e apenas como conseqüência da amostragem. A variação da taxa *s* somente entre as plantas, também não causou muita perturbação, isto em decorrência do tamanho amostral, demonstrando que a amostragem foi suficiente para contornar as diferenças na taxa *s* entre as plantas. Os maiores desvios no coeficiente *F* foram provocados pela variação da taxa *s* ao longo das gerações, não sendo, portanto, contornáveis pelo tamanho das amostras em cada geração. Em termos gerais, nos três casos, os valores oscilaram em torno do valor médio esperado de $F = 0,33$, o que não deixa de ser um resultado favorável.

A variação da taxa *s* entre gerações ou mesmo entre diferentes locais de experimentação numa mesma geração, pode ser provocada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais, conforme é sabido. Não estando sob controle do melhorista, o que resta a fazer é medi-la e isso é plenamente viável, como foi discutido anteriormente. Convém reforçar que esse parâmetro explica a natureza genética ou de parentesco dentro das progênies maternas. Com $s = 0$ essas são meias-irmãs, caso os cruzamentos ocorram de modo amplo e irrestrito; sendo $0 < s < 1$ uma família dessas será formada por uma mistura de irmãs autofecundadas, ou seja S_1 (na proporção *s*) e de meias-irmãs na proporção *t*. Em condições naturais é comum existirem irmãs germanas nas famílias originadas de cruzamentos biparentais, além das meias-irmãs.

3.3 TAXA DE AUTOFECUNDAÇÃO E NÍVEIS DE ENDOGAMIA

A constância da taxa *s* pode levar à errônea impressão de que o coeficiente de endogamia (*F*) é também constante ou igual para todas as plantas. Na verdade, o valor $F = s/(2 - s)$ é apenas uma média, ou seja, um parâmetro válido para o conjunto

de plantas que formam uma população. Mesmo sendo a taxa s constante, o coeficiente F variará entre os indivíduos, desde que $0 < s < 1$. A existência de fecundação cruzada, sendo parcial na espécie, gera uma certa fração de descendentes exocruzados nos quais $F = 0$. A autofecundação, por sua vez, origina indivíduos com $F > 0$, sendo que esse valor de F depende do número de gerações de autofecundações ocorridas no passado genealógico de uma determinada planta. Trata-se, neste casao, de uma questão de probabilidade, sendo fácil entender que, nas populações mistas, é possível ter plantas que passaram por somente uma autofecundação no seu passado genético, nas quais $F = 1/2$; por duas gerações, nas quais $F = 3/4$; e assim sucessivamente. Wright & Cockerham (1985; 1986) desenvolveram essas bases teóricas, aplicando-as aos esquemas de seleção.

Tomando como g o número de gerações de autofecundações sucessivas existente na genealogia de uma determinada planta, o valor do coeficiente F dessa planta é:

$$F_g = 1 - (\tfrac{1}{2})^g \quad g = 0, 1, 2, \ldots \tag{3}$$

Em uma população que se encontra em equilíbrio de Wright, plantas possuindo um nível de endogamia igual a F_g ocorrem com a freqüência:

$$P_g = (1 - s)\, s^g \tag{4}$$

Pela Expressão 4, nota-se que indivíduos exocruzados, isto é, sem nenhuma geração prévia de autofecundação ($g = 0$) ocorrem com a freqüência esperada de:

$$P_o = (1 - s)\, s^o = 1 - s \tag{5}$$

Assim, em uma população com $s = 0{,}80$ e $F = 0{,}67$, espera-se que 20% das plantas sejam não endogâmicas, o que é relativamente alto diante da sua considerável taxa de autofecundação natural. Alternativamente, nota-se pela Expressão 4, que plantas muito endogâmicas também tendem a ser raras, exceto se a taxa s for muito próxima de 1,0. Em uma população que apresenta uma taxa $s = 0{,}7$, plantas que provieram de seis ou mais gerações antecipadas e sucessivas de autofecundação, ocorrerão com freqüência de 11,8%.

Na Tabela 2 constam as freqüências esperadas de indivíduos, em populações em equilíbrio, possibilitando a visualização da estrutura de populações com sistema misto de reprodução e que possuem diferentes taxas s. Comparando as situações extremas, percebe-se que com $s = 0{,}1$ há, na população, um predomínio de plantas provenientes de cruzamento, mas com $s = 0{,}9$ não há predomínio de plantas altamente endogâmicas. Aliás, na última situação há uma distribuição quase uniforme das plantas nos vários níveis de endogamia. Na última linha da Tabela 2 consta a freqüência esperada de plantas altamente homozigóticas ($F > 15/16$). O melhorista pode ter interesse especial nesse tipo de genótipo em sua seleção, porém sua ocorrência pode ser aquém do esperado, pois com $s = 0{,}5$, por exemplo, tal freqüência é só de 3,2%.

TABELA 2. Freqüência esperada (P_g) de indivíduos, em populações em equilíbrio, de acordo com seu nível de endogamia (F_g), sob diferentes níveis de autofecundação natural (s), com diferentes números (g) de autofecundações sucessivas na genealogia.

g	F_g	s						
		0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1
0	0	1	0,900	0,700	0,500	0,300	0,100	0
1	1/2	0	0,090	0,210	0,250	0,210	0,090	0
2	3/4	0	0,009	0,063	0,125	0,147	0,081	0
3	7/8	0	$9x10^{-4}$	0,019	0,062	0,103	0,073	0
4	15/16	0	$9x10^{-5}$	0,006	0,031	0,072	0,066	0
5	31/32	0	$9x10^{-6}$	0,002	0,016	0,050	0,059	0
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
$F_{(médio)} = s/(2-s)$		0	0,053	0,176	0,333	0,538	0,818	1
Pr (F > 15/16)		0	10^{-5}	0,002	0,032	0,168	0,590	1

Fonte: Wright & Cockerham (1985)

A desuniformidade no nível de endogamia das plantas em populações de reprodução mista é uma particularidade importante. Esse é um dos aspectos que as diferencia das predominantemente alógamas ($F \cong 0$ em todas as plantas) e das predominantemente autógamas ($F \cong 1$ em todas as plantas). Cockerham & Weir (1984) quantificaram essa desuniformidade do coeficiente F calculando sua variância (σ_F^2), dada por:

$$\sigma_F^2 = \frac{4\,s\,(1-s)}{(2-s)^2\,(4-s)} \qquad (6)$$

É evidente que, com $s = 0$ ou $s = 1$ essa variância é nula, pois nesses extremos as plantas são todas exogâmicas ou todas completamente endogâmicas, respectivamente. Por meio da Tabela 3, onde constam alguns valores da variância σ_F^2 e do desvio σ_F, é possível ter uma idéia da desuniformidade no nível de endogamia das plantas. Esses valores evidenciam as diferenças existentes nos níveis do coeficiente F entre as plantas dentro das populações. De um modo geral, quando $s > 0,3$ essa variação, em termos de σ_F é superior a 0,3, o que é bem elevado.

Convém reforçar que os valores presentes nas Tabelas 2 e 3, referem-se sempre a situações em que a taxa de autofecundação (s) é constante de um indivíduo para outro, dentro de cada tipo de população, ao longo das gerações. A variação do coeficiente F, por isso, é decorrente apenas das diferenças na história genealógica das plantas, ou seja, do número de gerações de autofecundações sucessivas que cada uma tem em seu passado.

Do ponto de vista do melhoramento de populações são muitos os reflexos dessa desuniformidade no nível F das plantas. Um esquema de seleção baseado na avaliação de progênies maternas (M), isto é de polinização livre ou aberta, pode servir de exemplo. Na avaliação dessas progênies, em ensaios apropriados, devem-se

destacar aquelas que provêm de plantas mãe que apresentam boa capacidade geral de combinação e que, ao mesmo tempo, possuem mais alelos favoráveis em homozigose e, portanto, elevado valor de *F*. A última colocação significa que não deverá ter ocorrido pronunciada depressão endogâmica nos descendentes autofecundados nessas progênies superiores. Nesses termos, as populações com sistema misto de reprodução são mais versáteis do que as alógamas, pois ao selecionar com base em testes de progênies de polinização aberta, a seleção levará em conta não só a capacidade de combinação de cada mãe como a sua capacidade em originar filhas S_1 superiores. Em alógamas, para atingir esse duplo objetivo da seleção (aumento da freqüência de alelos favoráveis e redução da depressão pela endogamia) é preciso avaliar dois tipos de progênies por mãe: aquelas obtidas por meio de cruzamentos ou meias-irmãs e aquelas obtidas através de autofecundações manuais, quando possível. Na prática do melhoramento via seleção a situação, em geral, não é tão simples como é imaginado. Foi visto que mesmo com a taxa *s* constante, o coeficiente *F* varia. O que pensar então se a própria taxa *s* varia?

Anteriormente, foram discutidos alguns resultados de simulação, agora são mostradas algumas estimativas da taxa *s* obtidas no bojo de programas de melhoramento de algodão *(Gossypium hirsutum* L. raça *latifolium* Hutch.) (Crisóstomo, 1989) e de melancia (Ferreira, 2000; Ferreira *et al.*, 2000) (Tabela 4). Para a estimativa da taxa *s*, no caso do algodão, foi empregado um marcador genético morfológico, ao passo que, no caso da melancia, ela foi baseada em nove locos RAPD.

Os resultados demonstram que houve uma variação nas taxas *s* entre as plantas maternas, provavelmente devida a fatores ambientais, mas também em decorrência de fatores genéticos, como no caso da melancia. A população de melancia estava segregando para a expressão sexual, que é controlada geneticamente, como já foi visto. A estimativa da taxa *s*, considerando todas as famílias conjuntamente e todos os locos simultaneamente, foi de $\hat{s}_m$ = 0,235. Ao estimar esse parâmetro, de acordo

TABELA 3. Desuniformidade do grau de endogamia (*F*) entre plantas, em populações em equilíbrio, medida pela variância (σ_F^2) e respectivo desvio-padrão (σ_F).

s	*F*	σ_F^2	σ_F
0,1	0,053	0,026	0,160
0,3	0,176	0,078	0,280
0,5	0,333	0,127	0,356
0,7	0,538	0,151	0,388
0,9	0,818	0,096	0,310

Fonte: Cockerham & Weir (1984)

TABELA 4. Estimativas da taxa *s* em plantas individuais de populações mistas de algodão e melancia.

Populações	$\hat{s}$						Média
Algodão	0,717	0,851	0,708	0,643	0,518	0,725	0,714**[a]
Melancia	0,20	0,17	0,43	0,14	0,52	0,03	
	0,13	0,40	0,16				0,235**[b]

**Significância a 1% relativa ao teste feito considerando a hipótese de que $S = 0$.
[a]Média ponderada pelo número de sementes por planta. [b]Média por máxima verossimilhança.
Fonte: Crisóstomo (1989) e Ferreira (2000)

com a expressão sexual das plantas maternas, observou-se que a taxa de autofecundação foi maior nas famílias andromonóicas ($\hat{s} = 0,354$) do que nas monóicas ($\hat{s} = 0,185$). Esses resultados estão em conformidade com o previsto, uma vez que em condições isoladas de casa de vegetação foi constatada, por Ferreira *et al.* (1995), a ocorrência natural de autofecundações em indivíduos andromonóicos. É esperado também que a endogamia nestes indivíduos seja maior do que em indivíduos monóicos, o que foi confirmado pelas estimativas das taxas de endogamia ($\hat{F} = 0,414$ nos andromonóicos e $\hat{F} = 0,075$ nos monóicos).

Com base nos resultados mostrados é possível prever o grau de complexidade que um sistema misto de reprodução pode apresentar, principalmente se houver variação na expressão sexual das plantas. Como será visto posteriormente, o fato de uma população possuir sistema de reprodução misto reverte em algumas dificuldades, mas também em algumas vantagens, em termos de condução de programas de melhoramento, multiplicação de acessos de germoplasma e cultivares, assim como na estimação de componentes da variância genética.

3.4 DEPRESSÃO PELA ENDOGAMIA

O emprego de processos endogâmicos em programas de melhoramento é muito importante, uma vez que promove a liberação da variabilidade e a diminuição da carga genética, podendo ser útil também na identificação de genitores com potencial para o melhoramento e de fontes para gerar linhagens, bem como para determinar a importância dos efeitos devidos à dominância e à epistasia na expressão de um caráter. Entretanto, normalmente, a endogamia leva à ocorrência de depressão endogâmica, isto é, a uma redução do valor adaptativo de um indivíduo, podendo ser resultante da expressão de genes deletérios (carga genética) que se encontravam encobertos nos heterozigotos na geração anterior ou da redução da heterozigose que provoca a eliminação de interações alélicas favoráveis envolvendo dominância e/ou sobredominância (Hallauer & Miranda Filho, 1988; Vencovsky & Barriga, 1992).

Aqui, esse fenômeno é definido como a alteração na média de um caráter numa população quando esta é submetida a uma endogamia maior do que ela normalmente pratica. Os procedimentos mais comuns utilizados pelos melhoristas para provocar endogamia são aqueles que envolvem cruzamentos entre parentes, como irmãs perfeitas, meias-irmãs e autofecundação. Destes, a autofecundação manual é a forma mais usual em virtude da rapidez em atingir alto nível de homozigose. A endogamia pode ocorrer também em decorrência do estreitamento da base genética de uma população.

A maioria das populações alógamas apresenta depressão em conseqüência do emprego de sistemas endogâmicos, por possuírem alta concentração de carga genética e heterozigosidade. As populações autógamas, ao contrário das alógamas, apresentam pouca ou nenhuma carga genética e são altamente homozigóticas, portanto, não sofrem depressão endogâmica significativa. Nas populações que possuem sistema misto de reprodução o efeito da depressão endogâmica é intermediário aos efeitos que ocorrem nas alógamas e autógamas e está relacionado à taxa de autofecundação natural. Informações a respeito da magnitude da depressão endogâmica são tão importantes quanto o conhecimento de outros parâmetros genéticos, pois como será

visto, ela pode influenciar o progresso genético quando a população possui sistema reprodutivo misto.

Representando por $Y(M)$ e $Y(S_1)$ a média de um caráter (Y) em progênies maternas (M), obtidas através de polinização livre, e em progênies autofecundadas (S_1), obtidas após uma só geração de autofecundação, respectivamente, a depressão endogâmica ocorrida na população que originou essas progênies pode ser medida por:

$$\Delta Y = Y(M) - Y(S_1) \quad (7)$$

$$\Delta Y\% = \frac{\Delta Y}{Y(M)} \ 100 \quad (8)$$

Convém enfatizar que essa mensuração da depressão refere-se a apenas uma geração de autofecundação, pois quando se mensura a depressão total, esperada até a total homozigose, o símbolo usado é H, conforme será visto mais adiante.

Para exemplificar, serão discutidos os resultados da depressão endogâmica, ocorrida em uma população mista de algodão, obtidos por Crisóstomo (1989) e apresentados na Tabela 5. Os dados constantes nessa tabela referem-se a valores médios, obtidos a partir de informações referentes a 57 plantas da população mista. Cada uma dessas plantas deu origem a um par de progênies, ou seja, uma progênie materna (M) e outra autofecundada (S_1), o que possibilitou individualizar os efeitos da depressão para cada família.

Em termos percentuais, a porcentagem de fibra foi o caráter que apresentou menor depressão. Nos caracteres relacionados com a produtividade do algodão essa foi mais alta, porém aquém do que é observado, normalmente, para a produtividade de grãos em populações alógamas, como o milho. A baixa depressão na porcentagem de fibra, pode ser conseqüência de: a) menor grau de segregação nos locos que governam esse caráter, nessa população, o que significa maior grau de fixação gênica e, por conseguinte, menor heterozigosidade; b) menor nível de dominância dos genes responsáveis por esse caráter, já que sem dominância não há depressão, caso seja desprezada a epistasia; c) uma ação combinada dessas duas causas.

É bom lembrar que essa depressão (ΔY) refere-se a um acréscimo de endogamia $\{\Delta_F = [(1 + F)/2] - F = (1 - F)/2\}$, em que F é o coeficiente de endogamia na população original. Se, antes da autofecundação, a população estiver em equilíbrio, tem-se que

TABELA 5. Médias das depressões endogâmicas de três caracteres em uma população mista de algodão, avaliadas por meio de progênies maternas (M) e autofecundadas (S_1), com respectivos intervalos de variação [$IV(\%)$].

Caráter	$Y(M)$	$Y(S_1)$	ΔY	$\Delta Y(\%)$	$IV(\%)$
Rendimento de algodão em caroço (kg ha^{-1})	1091,0	980,0	111,0	10,2	- 25 a 34
Porcentagem de fibra	36,3	35,7	0,6	1,6	- 10 a 16
Peso do capulho (g)	5,5	4,8	0,7	12,7	- 11 a 31

Fonte: Crisóstomo (1989)

$\Delta_F = (1 - s)/(2 - s)$, que é máximo quando $s = 0$, e vai diminuindo à medida que a taxa s cresce. Com $s = 0{,}714$, como no caso do algodão, $\Delta_F = 0{,}222$, que é um impacto endogâmico muito menor do que o provocado por uma autofecundação em uma população alógama, para a qual $\Delta_F = 0{,}5$.

De interesse para o melhorista é a possibilidade de selecionar plantas mãe que apresentem boa capacidade geral de combinação, observada através das médias das progênies maternas, e baixa depressão endogâmica, observada por meio das médias das progênies autofecundadas. Ao observar os intervalos de variação das depressões endogâmicas apresentados na Tabela 5, percebe-se que em algumas genitoras não ocorreu depressão, indicando que elas devem ser altamente homozigóticas para os genes responsáveis por esses caracteres. Em relação ao rendimento de algodão em caroço, por exemplo, 20 das 57 plantas maternas, ou seja em 35% delas, a depressão foi desprezível ($\Delta Y\% \leq 6{,}0\%$). Considerando o nível $F = 7/8$ como de suficiente homozigose e incluindo nos cômputos o valor médio obtido de $s = 0{,}714$ obtém-se, conforme exposto anteriormente, que a probabilidade de pelo menos uma planta mãe dessa população apresentar 87,5% ou mais de locos em homozigose é de 25,6% [$P_r(F > 7/8) = 0{,}256$]. Em relação às 57 mães, isso quer dizer que, em pelo menos 15 genitoras (57 x 0,256), espera-se um grau de homozigose superior a 87,5% e, portanto, baixa depressão endogâmica. Porém, o número de plantas que apresentaram baixa depressão (20 mães) foi superior ao esperado, ao menos para o caráter rendimento de algodão em caroço.

Por outro lado, ao selecionar as 10 melhores progênies maternas em relação à produtividade de algodão em caroço, ou seja, aquelas nas quais se espera boa capacidade geral de combinação, verificou-se que somente duas progênies autofecundadas apresentaram médias altas e, conseqüentemente, baixa depressão. Neste caso, seria esperado que entre as 10 progênies selecionadas, em pelo menos 3 ($0{,}256 \times 10 = 2{,}56 \cong 3$), aproximadamente, a depressão fosse baixa. Portanto, o valor observado concorda razoavelmente com o esperado. Entretanto, para aumentar a probabilidade de selecionar genitoras que apresentem alta freqüência de alelos favoráveis e alta homozigosidade, seria necessário obter e avaliar maior número de progênies.

Deve-se realçar que os raciocínios desenvolvidos anteriormente, não podem ser quantificados da mesma forma, caso a população seja alógama, pois em populações alógamas segregantes, é irrisória a probabilidade de existirem plantas com alto grau de homozigose.

Ferreira (2000) ao avaliar a depressão endogâmica em uma população segregante de melancia e com sistema misto de reprodução, através de progênies maternas (M) e autofecundadas (S_1) oriundas de 64 plantas mãe, verificou que, em média, os efeitos depressivos não foram tão drásticos como em populações tipicamente alógamas (Tabela 6). Isso deve ter acontecido em função de três fatores. O primeiro deles, refere-se ao fato de a depressão real poder ser maior do que a depressão observada, em decorrência da seleção não intencional ocorrida na fase de viveiro e do transplantio das mudas. O outro ponto está intimamente relacionado com a história evolutiva das cucurbitáceas, pois acredita-se que a ocorrência de populações pequenas leva a constantes cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode ter contribuído

para a eliminação progressiva da carga genética. Já o terceiro, relaciona-se com o fato de que em espécies com sistema misto de reprodução a ocorrência de autofecundações naturais também deve contribuir para a eliminação gradual dessa carga genética.

Entretanto, apesar de a depressão média ter sido baixa, foi observada uma ampla variação na amplitude da depressão, sendo que, em algumas progênies, esses valores foram tão altos quanto aqueles observados em populações estritamente alógamas, como, por exemplo, para PP, NP e CP, nas quais foram verificadas estimativas de até 49%, 72% e 52%, respectivamente. Em contrapartida, todos os intervalos de variação das depressões abrangeram o valor zero, demonstrando a existência de progênies em que a depressão foi nula ou desprezível e, conseqüentemente, a possibilidade de efetuar seleção entre as progênies, de modo a priorizar aquelas que apresentem médias desejadas pelo melhorista, bem como baixa ou nenhuma depressão. De fato, foram identificadas algumas plantas mãe, cujas progênies maternas tiveram bom desempenho agronômico e cujas progênies autofecundadas apresentaram baixa depressão endogâmica, isto é, progênies promissoras para o melhoramento genético.

Nota-se, ainda, que houve depressões médias positivas e negativas, conforme o caráter, resultados esses que são determinados, principalmente, pela direção prevalecente da dominância gênica e são também importantes para os melhoristas. As estimativas médias das depressões nos caracteres PP, NP e CP foram positivas, indicando que, com o decorrer das gerações de autofecundação, esses caracteres tenderão a diminuir, ao passo que em relação às variáveis PF e TS as estimativas foram negativas, esperando-se, assim, que aumentem com as autofecundações. Quanto aos caracteres CP e TS, os efeitos de sucessivas gerações de autofecundações, as favorecerão, pois a tendência é que a cor da polpa fique mais vermelha e o teor de sólidos solúveis aumente, tornando os frutos mais doces. Para os demais caracteres, por outro lado, os efeitos da endogamia os prejudicarão, pois a tendência é que a produtividade de frutos e o número de frutos por planta decresçam e o peso de frutos aumente, sendo esses fenótipos indesejáveis em alguns programas de melhoramento de melancia.

Diante das considerações expostas, percebe-se que a estrutura genética de populações mistas favorece a ocorrência de depressões nulas ou desprezíveis, o que é

TABELA 6. Médias das depressões endogâmicas de cinco caracteres em uma população mista e segregante de melancia, avaliadas por meio de progênies maternas (M) e autofecundadas (S_1), com respectivos intervalos de variação [IV (%)].

Caráter[1]	$Y(M)$	$Y(S_1)$	ΔY	ΔY(%)	IV(%)
PP (kg/planta)	17,18	16,23	0,95	5,5	- 116,7 a 49,0
PF (kg)	3,15	3,47	- 0,32	- 10,2	- 116,8 a 22,5
NP	7,89	6,82	1,07	13,6	- 89,5 a 72,3
CP	3,45	3,25	0,20	5,8	- 25,2 a 51,6
TS (°Brix)	7,27	7,53	- 0,26	- 3,6	- 49,0 a 12,8

[1]PP: produtividade de frutos por planta; PF: peso médio de frutos por planta; NP: número de frutos por planta; CP: cor da polpa (escala: 0 = vermelha a 5 = branca); TS: teor de sólidos solúveis. Fonte: Ferreira (2000)

altamente interessante para o melhoramento, ao contrário do que é observado em populações alógamas, especialmente para os caracteres relacionados à produtividade ou à biomassa. Como visto, isso facilita não só a seleção recorrente como a que visa híbridos de linhagens. A seleção recorrente, no entanto, poderá ser prejudicada na fase de recombinação natural, se o valor da taxa de autofecundação natural for elevado. Além disso, quando a taxa *s* é alta, significa que a população é composta, em grande parte, por uma coleção de linhagens endogâmicas; e isso afeta a magnitude da resposta à seleção, que é reduzida após o primeiro ciclo e exaurida após poucos ciclos seletivos. Se a taxa *s* for baixa, haverá a possibilidade de recombinações naturais e também a população conterá grande proporção de indivíduos não endogâmicos, de modo que as respostas podem continuar por muitas gerações.

Uma abordagem mais técnica e detalhada do provável sucesso da seleção, em espécies de reprodução mista, requer conhecimento dos componentes da variância genética dos caracteres, além do que foi exposto. Essa abordagem será feita posteriormente.

4. SEMELHANÇA ENTRE PARENTES E MEDIDAS DE PARENTESCO

O comportamento hereditário dos caracteres nas populações tem sido estudado por meio de coeficientes de parentesco e de covariâncias entre indivíduos aparentados, isto é, através de medidas que consideram a semelhança entre parentes.

Os trabalhos de Fisher (1918) e Wright (1921; 1922), foram marcos importantes nessa área, pois foi proposta a decomposição da variância genética em variância aditiva, de dominância e epistática (Fisher) e incluída a endogamia (Wright). Depois desses trabalhos, outros também foram desenvolvidos e novos modelos propostos, a exemplo daqueles realizados por Kempthorne (1954; 1955a,b), Cockerham (1963) e Ghai (1982), entre outros.

Os resultados obtidos com modelos que consideram as epistasias, a ligação gênica e a endogamia, são extremamente complexos, a exemplo do modelo desenvolvido por Harris (1964) que necessitou de 28 parâmetros nas suas derivações. Isso atesta a complexidade do modelo, que foi o mais geral até a sua publicação. Weir & Cockerham (1977) apresentaram expressões para a variância genética e discutiram a covariância entre indivíduos considerando dois locos, admitindo epistasia e ligação fatorial, em uma população mista em equilíbrio. A complexidade da expressão foi tal que se sugeriu a busca de simplificações, principalmente pelo uso de aproximações para as medidas de parentesco.

Neste tópico serão revisados os princípios e conceitos das medidas de parentesco, que são mensuradas pelos coeficientes de parentesco e no próximo tópico serão vistos os componentes genéticos das variâncias e covariâncias de acordo com a semelhança entre os indivíduos aparentados.

Geneticamente, os indivíduos aparentados são mais semelhantes entre si do que os indivíduos que não possuem qualquer tipo de parentesco. Esta maior semelhança deve-se ao fato de esses indivíduos possuírem alelos iguais, ou seja, idênticos por descendência, que, logicamente, são herdados de pelo menos um ancestral comum a eles. Assim, a maior ou menor semelhança entre parentes é função da maior ou menor probabilidade de terem alelos em comum.

Essas probabilidades são determinadas através de coeficientes, denominados como medidas de parentesco ou, ainda, coeficientes de parentesco. Segundo Kempthorne (1973), que inclusive fez uma apresentação didática sobre o assunto, as bases para o entendimento das medidas de parentesco foram, inicialmente, fornecidas por Malécot[6] em 1948. A noção básica apresentada por Malécot, é que dois alelos podem ser semelhantes em decorrência de um ser cópia do outro ou de ambos serem cópias de um outro alelo presente em um ancestral comum. Neste caso, os alelos são designados como "idênticos por descendência". Entretanto, dois alelos podem ser semelhantes apenas em "estado" e não por descendência, ou seja, ambos são iguais, porém não são cópias de um mesmo alelo.

Dessa forma, Malecot[6] definiu o coeficiente de coancestralidade (*coefficient de parenté*) como sendo a probabilidade de um alelo qualquer presente no indivíduo *X* ser idêntico por descendência a outro alelo qualquer presente no indivíduo *Y*. Se o indivíduo *X* possui os alelos x_1 e x_2 e o indivíduo *Y* os alelos y_1 e y_2, então esse coeficiente é igual a:

$$f_{xy} = \frac{1}{4}[P(x_1 \equiv y_1) + P(x_1 \equiv y_2) + P(x_2 \equiv y_1) + P(x_2 \equiv y_2)] \quad (9)$$

em que:

$P(x_1 \equiv y_1)$ é a probabilidade de os indivíduos *X* e *Y* receberem cópias de um alelo da mãe;

$P(x_1 \equiv y_2)$ e $P(x_2 \equiv y_1)$ é a probabilidade de os indivíduos *X* e *Y* receberem cópias de um alelo, sendo um da mãe e o outro do pai;

$P(x_2 \equiv y_2)$ é a probabilidade de os indivíduos *X* e *Y* receberem cópias de um alelo do pai;

Este valor, em casos de panmixia, é igual à metade do coeficiente de parentesco aditivo (r_{xy}) (*coefficient of relationship*) usado por Wright (1922).

Kempthorne (1973) também definiu um coeficiente, designado como coeficiente de dominância, que mensura a probabilidade de dois alelos quaisquer presentes no indivíduo *X* serem idênticos por descendência a dois alelos quaisquer presentes no indivíduo *Y* e, simultaneamente, de os dois alelos de *X* e os dois de *Y* serem distintos. Esse coeficiente é, então, igual a:

$$\mu_{xy} = [P(x_1 \equiv y_1 \text{ e } x_2 \equiv y_2) + P(x_1 \equiv y_2 \text{ e } x_2 \equiv y_1)] \quad (10)$$

em que:

$P(x_1 \equiv y_1)$ e $x_2 \equiv y_2)$ é a probabilidade de *X* e *Y* receberem, simultaneamente, cópias idênticas dos alelos do pai e da mãe, respectivamente;

$P(x_1 \equiv y_2)$ e $x_2 \equiv y_1)$ é a probabilidade de *X* receber o alelo 1 da mãe e *Y* receber cópia do mesmo alelo, porém do pai e vice-versa, ou seja, de *X* receber o alelo 2 do pai e *Y* receber cópia do mesmo alelo da mãe.

[6]MALÉCOT, G. Les mathematique de l'herédité. Paris, Masson et Cil, 1948.

Outro conceito importante é o do coeficiente de endogamia (F), determinado por Wright. Este coeficiente é a probabilidade de dois gametas, que se unem para formar o indivíduo, portarem alelos idênticos por descendência. Como na fecundação, gametas femininos e masculinos se unem ao acaso, o valor de F é igual ao do coeficiente de coancestralidade dos pais do indivíduo considerado.

Os coeficientes especificados acima são largamente conhecidos e utilizados para estudar populações panmíticas ou populações obtidas artificialmente (por cruzamentos manuais), nas quais o coeficiente de endogamia é constante entre os indivíduos de uma mesma geração. Em populações cujos coeficientes de endogamia são variáveis entre os indivíduos, como no caso das populações mistas ou intermediárias, a situação é mais complexa e outros coeficientes de parentesco são exigidos.

Harris (1964) apresentou um sistema de medida de parentesco de forma que os coeficientes descrevem situações em que estão envolvidos os efeitos aditivos e de dominância, assim como a endogamia. Para isso, além dos coeficientes de endogamia (F_X e F_Y), parentesco aditivo (r_{XY}) de Wright e o coeficiente de dominância (μ_{XY}) de Kempthorne, usou mais quatro medidas de identidade gênica. Já, Cockerham (1971), relacionou todas as funções de probabilidade para todas as situações envolvendo quatro alelos, podendo a identidade gênica ser para dois, três ou quatro alelos em um, dois, três ou quatro indivíduos diferentes.

Para sintetizar todas as possibilidades de parentesco entre dois indivíduos, considerem-se quatro alelos (a, b, c, e d), sendo que os alelos a e b estão presentes no indivíduo X e os alelos c e d no indivíduo Y. Desta forma, existem as seguintes probabilidades de parentesco:

a) Probabilidade de identidade entre dois alelos no mesmo indivíduo (F_X ou F_Y), que corresponde ao coeficiente de endogamia e é igual a:

$$F_X = f_{ab} = t_{abcd} + t_{abc} + t_{abd} + t_{ab.cd} + t_{ab}$$

$$F_Y = f_{cd} = t_{abcd} + t_{acd} + t_{bcd} + t_{ab.cd} + t_{cd}$$

b) Probabilidade de identidade entre dois alelos quaisquer, sendo que um está no indivíduo X e o outro no indivíduo Y, que equivale ao coeficiente de coancestralidade (f_{XY}). Neste caso, podem existir as seguintes identidades gênicas:

$$f_{ac} = f_{abcd} = t_{abc} + t_{acd} + t_{ac.bd} + t_{ac}$$

$$f_{ad} = f_{abcd} = t_{abd} + t_{adc} + t_{ad.bc} + t_{ad}$$

$$f_{bc} = t_{abcd} = t_{abc} + t_{bcd} + t_{ad.bc} + t_{bc}$$

$$f_{bd} = f_{abcd} = t_{abd} + t_{bcd} + t_{ac.bd} + t_{bd}$$

c) Probabilidade de os dois alelos de X serem idênticos entre si e idênticos a qualquer alelo presente no indivíduo Y ($2G_{XY}$):

$$2\,G_{XY} = G_{abc} + G_{abd}$$

sendo:

$$G_{abc} = t_{abcd} + t_{abc}$$
$$G_{abd} = t_{abcd} + t_{abd}$$

d) Probabilidade de os dois alelos de Y serem idênticos entre si e idênticos a qualquer alelo presente no indivíduo X ($2G_{XY}$):

$$2\,G_{XY} = G_{acl} + G_{bcd}$$

sendo:

$$G_{acd} = t_{abcd} + t_{acd}$$
$$G_{bcd} = t_{abcd} + t_{bcd}$$

e) Probabilidade de os dois alelos presentes em X serem idênticos aos dois alelos presentes em Y ($2T_{X'+Y}$):

$$2\,T_{X'+Y} = T_{ac.bd} + T_{ad.bc}$$

sendo:

$$T_{ac.bd} = t_{abcd} \cdot t_{ac.bd}$$
$$T_{ad.bc} = t_{abcd} \cdot t_{ad.bc}$$

f) Probabilidade de os quatro alelos, os dois presentes no indivíduo X e os dois presentes no indivíduo Y, serem todos idênticos por descendência ($t_{X'Y'}$):

$$t_{X'Y'} = t_{abcd}$$

g) Probabilidade de os dois alelos de X serem idênticos entre si e de os dois alelos de Y também serem idênticos entre si ($T_{X'.Y'}$):

$$T_{X'.Y'} = t_{ab.cd}$$

sendo:

$$T_{ab.cd} = t_{abcd} + t_{ab.cd}$$

As probabilidades acima citadas são iguais a:

$t_{abcd} = P\,(a = b = c = d)$ $t_{ab.cd} = P\,(a = b,\ c = d)$ $t_{ad} = P\,(a = d \neq b \neq c)$

$t_{abc} = P\,(a = b = c \neq d)$ $t_{ac.bd} = P\,(a = c,\ b = d)$ $t_{bc} = P\,(b = c \neq a \neq d)$

$t_{abd} = P\,(a = b = d \neq a)$ $t_{ad.bc} = P\,(a = d,\ b = c)$ $t_{bd} = P\,(b = d \neq a \neq c)$

$t_{acd} = P\,(a = c = d \neq b)$ $t_{ab} = P\,(a = b \neq c \neq d)$ $t_{cd} = P\,(c = d \neq a \neq b)$

$t_{bcd} = P\,(b = c = d \neq a)$ $t_{ac} = P\,(a = c \neq b \neq d)$ $t_{o} = P\,(a \neq b \neq c \neq d)$

Vale frisar que o apostrofe (') foi utilizado para indicar que ambos os alelos do indivíduo estão envolvidos na probabilidade referida.

Cockerham (1984) e Cockerham & Weir (1984), acrescentaram ainda a probabilidade de um indivíduo ter alelos idênticos por descendência tanto no loco i como no loco j (Fc_{ij}), e a probabilidade, para dois indivíduos, de que os dois alelos do loco i, em um indivíduo, sejam idênticos por descendência entre si, e que ao mesmo tempo os dois alelos do loco j do outro sejam também idênticos por descendência (T_{Cij}).

Desprezando o efeito da ligação fatorial e considerando populações em equilíbrio de Wright, isto é, em equilíbrio com endogamia, a probabilidade F_{Cij} é igual a:

$$F_{Cij} = F_C = \frac{F(1-2F)}{2+F} \tag{11}$$

esse valor seria igual a F^2 caso não houvesse variação do valor de F entre os indivíduos em uma mesma geração.

O valor T_{Cij}, designado por Cockerham & Matzinger (1985) como coeficiente de coancestralidade conjunto, quando existe recombinação livre e sem variação do valor de F, é igual a:

$$T_{CXY} = F_X F_Y \tag{12}$$

porém, se existir ligação e variação do coeficiente de endogamia (F) na população, este valor dependerá de F_C.

5. VARIÂNCIAS E COVARIÂNCIAS GENÉTICAS

Uma das maneiras de estudar a variabilidade de uma determinada população é efetuar a decomposição da variância genética com base no conhecimento dos processos genéticos envolvidos na herança dos caracteres. Tal prática é muito utilizada, tanto em plantas alógamas como em autógamas.

Entretanto, as populações mistas têm sido consideradas, em programas de melhoramento, como autógamas ou alógamas, a depender da taxa de autofecundação ou de fecundação cruzada ser mais próxima de uma categoria ou de outra. Isso em decorrência de uma série de limitações, entre elas a indisponibilidade, até há pouco tempo atrás, de metodologias que permitissem a decomposição da variância genética. Na década de 80, Cockerham & Weir (1984) e Pereira (1989) deram um grande impulso no aprimoramento de estimativas de metodologias que possibilitam a decomposição da variância genética em populações mistas, sendo que Crisóstomo (1989) fez aplicação prática em algodão e Ferreira (2000) em melancia.

Neste tópico serão estudados, portanto, os componentes genéticos das variâncias e covariâncias, assim como seus coeficientes, em um modelo que, por simplicidade, não inclui epistasia, mas inclui endogamia variável entre os indivíduos, sendo adequado para populações com reprodução mista.

5.1 COMPONENTES DA VARIÂNCIA GENÉTICA

Cockerham & Weir (1984) apresentaram um modelo aditivo para o estudo dos componentes das variâncias e covariâncias, idêntico ao apresentado por Weir & Cockerham (1977), contudo sem considerar a existência de epistasia. Neste modelo, o valor genotípico de um indivíduo que possui os alelos j e k no loco i, é igual a:

$$G_{ijk} = a_{ij} + a_{ik} + d^j_{ik} \tag{13}$$

sendo que a corresponde ao efeito aditivo e d ao efeito de dominância em uma população ideal não endógama.

Considerando p_{ji} a freqüência do alelo j no loco i, foram determinados os componentes quadráticos que compõem a variância genética da população, os quais estão descritos na Tabela 7. Considerando estes componentes quadráticos, a variância genética total é igual a:

$$V_G = (1+F)V_A + (1-F)V_D + 4F\,D_1 + F\,D_2^* + F\,(1-F)H^* + (F_c - F^2)(H^2 - H^*) \qquad (14)$$

F = coeficiente de endogamia de Wright;

V_A = variância aditiva;

V_D = variância de dominância;

D_1 = covariância entre efeitos aditivos e de dominância nos homozigotos;

D_2^* = variância dos efeitos de dominância dos homozigotos;

H^* = soma dos quadrados da depressão endogâmica de cada loco;

H^2 = quadrado da soma da depressão endogâmica de cada loco;

$F_c = \frac{F(1+2F)}{2+F}$ = coeficiente de endogamia conjunto para dois locos.

Já a covariância entre parentes é dada por:

$$C_{XY} = 2f_{xy}V_A + 2(T_{X+Y} - t_{XY})V_D + 2(G_{XY} - G_{XY})D_1 + t_{XY}D_2^* + (T_{X,Y} - F_X F_Y)H^* + (T_{CXY} - F_X F_Y)(H^2 - H^*) \qquad (15)$$

em que f_{XY}, T_{X+Y}, t_{XY}, G_{XY}, F_X etc, são os coeficientes de parentesco definidos de acordo com Cockerham (1971) e discutidos anteriormente.

Para melhor compreender esses componentes quadráticos, considere-se um loco com dois alelos no qual o genótipo *AA* tenha valor 1, o genótipo *Aa* valor *d* e o genótipo *aa* valor -1. Neste caso, a variância aditiva será:

$$V_A = 2\sum_i p_i(1-p_i)[1+(1-p_i)d_i]^2 \qquad (16)$$

A variância de dominância será:

$$V_D = 4\sum_i [p_i(1-p_i)d_i]^2 \qquad (17)$$

TABELA 7. Componentes quadráticos que compõem a variância genética.

Componentes da variância genética	Componentes quadráticos	
	Um loco	Vários locos
Variância aditiva	$2V_{ai} = 2\sum_j p_{ji}a_{ji}^2$	$V_A = \sum_i 2V_{ai}$
Variância de dominância	$V_{di} = \sum_j \sum_k p_{ji}p_{ki}(d_{ki}^j)^2$	$V_D = \sum_i V_{di}$
Depressão endogânica	$h_i = \sum_j p_{ji}d_{ji}^j$	$H^2 = (\sum_i h_i)^2$ $H^* = \sum_i h_i^2$
Covariância a_j e d_j^j	$d_{1i} = \sum_j p_{ji}a_{ji}d_{ji}^j$	$D_1 = \sum_i d_{1i}$
Variância d_j^j	$d_{2i} = \sum_j p_{ji}(d_{ji}^j)^2$	$D_2 = \sum_i d_{2i}$

Fonte: Cockerham & Weir (1984)

Estes valores são os mesmos que a variância aditiva e de dominância em uma população panmítica de referência com as mesmas freqüências alélicas e independem da taxa *s* ou do coeficiente *F*; portanto podem ser usados como referência, não importando o nível de endogamia. Quando só há dois alelos por loco, como neste caso, $H^* = V_D$.

A covariância entre efeitos aditivos e de dominância nos homozigotos é:

$$D_1 = -2 \sum_i p_i (1 - p_i)(1 - 2 p_i) d_i [1 + (1 - 2 p_i) d_i] \quad (18)$$

Este valor somente será positivo quando: $-1 < (1 - 2p_i) d_i < 0$. E será negativo nos demais casos. O seu sinal depende das freqüências dos alelos e do sentido e intensidade da dominância. Este fato se reveste de importância já que o coeficiente deste componente na variância genética é *4F*, podendo chegar a ser o dobro do coeficiente da variância aditiva, interferindo no progresso genético de forma negativa, em alguns casos. O seu valor absoluto, porém, só será maior que o da variância aditiva quando: $(1 - 2p_i) d_i < -0{,}5$. Isto, no modelo adotado, só irá acontecer para valores positivos de D_i.

O valor da variância total dos efeitos de dominância dos homozigotos é dado por:

$$D_2^* = 4 \sum_i p_i (1 - p_i)(1 - 2 p_i)^2 d_i^2 \quad (19)$$

Seus valores serão sempre positivos e dependerão das freqüências alélicas e do valor da dominância. Já o valor do quadrado da depressão endogâmica será:

$$H^2 = \left[2 \sum_i p_i (1 - p_i) d_i \right]^2 \quad (20)$$

Este componente poderá ser muito grande em relação aos outros componentes em certas situações. Se todos os locos forem idênticos em freqüências e efeitos, ele será igual a: $H^2 = [2 n p_i (1 - p_i) d_i]^2 = n V_D$. Se, no entanto, os locos tiverem valores de dominância com sinais negativos e positivos na mesma proporção, H^2 terá valor nulo, o que ocasionará uma diferença negativa, $H^2 - H^*$, que aparecerá na variância genética.

Foi observado, ainda, que sem dominância todas as covariâncias entre parentes tendem para $C_{XY} = 2 f_{XY} V_A$. A dominância, em conjunto com a endogamia, exige cinco componentes. Um sexto é necessário quando há desequilíbrio de identidade, o que ocorre quando existe variação no coeficiente de endogamia ou quando o coeficiente de endogamia conjunto (F_C) exceder F^2. Isto é especialmente relevante para populações mistas, nas quais as taxas de endogamia variam entre os indivíduos.

Para uma avaliação detalhada dos possíveis valores dos componentes da variância genética, Wright & Cockerham (1985) simularam um caráter quantitativo, em uma população mista, com freqüência alélica *p* para o alelo *A* e *1 - p* para o alelo *a*, em 100 locos, idênticos em seus efeitos, em que o valor genotípico de *AA* é 1, o de *Aa* é *d* e o de *aa* é -1. O modelo, portanto, prevê apenas dois alelos por loco e, ainda,

ausência de ligação gênica e de epistasia. Foram considerados diversos valores para o grau de dominância (*d*) e para as freqüências alélicas, supondo-se que todos os locos são iguais em seus efeitos e nas freqüências alélicas. Para simular caracteres nos quais os alelos têm freqüências diferentes foi usado o modelo "A", em que os alelos têm freqüências variando uniformemente de 0 a 1 e o modelo "B", que é idêntico ao "A" apenas que metade dos genes tem a dominância positiva e a outra metade tem a dominância negativa. Note-se que, neste modelo, H^* é igual a V_D, por se tratar de apenas dois alelos por loco e H^2 é igual a $n\ V_D$ (exceto no "modelo B"), pois todos os locos têm o mesmo efeito de dominância (Tabela 8).

Na Tabela 8 constam também três casos que simulam populações com propriedades mais próximas da realidade. Para efetuar essas simulações, Pereira (1989) admitiu que os genes que controlam o caráter têm a freqüência alélica seguindo uma distribuição definida que, no caso, foi a distribuição Beta (x, y) com diferentes parâmetros. Essa distribuição já foi utilizada também por Kempthorne & Folks (1971), Ramalho (1977), Miranda Filho (1978), Pereira (1980), Souza Jr. (1983) e Pereira & Vencovsky (1988). Assim, os valores foram obtidos com base nas freqüências alélicas

TABELA 8. Valores simulados de componentes quadráticos da variância genética de um caráter controlado por 100 locos, com dois alelos por loco. Foram considerados diferentes graus de dominância (*d*) e valores de freqüências alélicas (*p*) em duas situações: com todos os alelos com a mesma freqüência e com freqüência gênica variável em cinco modelos.

Freqüências	*d*	V_A	V_D	D_1	D_1^*	H^2
0,1	1,0	58,3	3,2	- 25,9	23,0	324
	0,6	39,4	1,2	- 12,8	8,3	117
	0,2	24,2	0,1	- 3,3	0,9	13
0,5	1,0	50,0	25,0	0,0	0,0	2500
	0,6	50,0	9,0	0,0	0,0	900
	0,2	50,0	1,0	0,0	0,0	100
0,9	1,0	0,7	3,2	2,9	23,0	324
	0,6	4,9	1,2	4,5	8,3	117
	0,2	12,7	0,1	2,4	0,9	13
Modela A	1,0	43,6	14,7	- 7,1	14,2	1467
Modelo B	1,0	43,6	14,7	- 7,1	14,2	0
Beta (2, 4)	1,0	63,5	15,9	- 15,9	12,7	1587,3
	0,6	51,8	5,7	- 8,0	4,6	571,4
	0,2	42,2	0,6	- 2,2	0,5	63,5
Beta (2, 2)	1,0	45,7	17,1	- 5,7	1,4	1714,3
	0,6	42,0	6,2	- 2,1	4,2	617,1
	0,2	40,2	0,7	- 0,2	0,4	68,6
Beta (4, 2)	1,0	25,4	15,9	3,2	12,7	1587,3
	0,6	28,9	5,7	3,4	4,6	571,4
	0,2	34,5	0,6	1,6	0,5	63,5

Fonte: Wright & Cockerham (1985) e Pereira (1989)

e nas funções de densidade das distribuições em conjunto com as expressões dos componentes da variância genética. De forma aproximada, a população Beta (2, 4) representa uma população não melhorada, ou seja, em que o caráter apresenta média baixa e com freqüência gênica média igual a 0,333; a população Beta (2, 2) uma população de base ampla (composto), com freqüência gênica média igual a 0,5; e a Beta (4, 2) uma população melhorada, cujo caráter apresenta média alta e freqüência gênica média igual a 0,667.

Vale ressaltar que os valores obtidos têm efeito apenas comparativo e referem-se exclusivamente aos modelos propostos. Em geral, alguns fatos sobressaem dos resultados. Um deles, refere-se aos valores negativos de D_1, que aparecem em vários casos. Esta componente, como será mostrado posteriormente, participa das expressões do progresso genético permanente, podendo interferir negativamente nesse progresso a depender da sua magnitude. Esses valores negativos aparecem justamente quando as freqüências alélicas são baixas, ou seja, em populações pouco melhoradas. No entanto, pode-se observar também, que esses valores sempre são bem menores que os valores da soma de $V_A + D_2^*$, que são os outros componentes que participam do progresso permanente, não se esperando, portanto, a possibilidade de progresso negativo, sob esses modelos.

Um outro fato está relacionado aos valores do componente H^2. Como neste modelo $H^2 = n\ V_D$ (à exceção do "modelo B"), este parâmetro poderá ser maior do que os outros componentes quando há muitos locos. Isso significa que, em um caráter controlado por n locos, todos com dominância no mesmo sentido, a componente da variância predominante será H^2, o que é preocupante, pois a mesma participa do denominador da expressão do progresso permanente, ou seja, participa da variância fenotípica da unidade de seleção. Contudo, acredita-se que a dominância não deva ser importante nessas espécies, pelo menos nos genes que controlam caracteres adaptativos, já que, como foi discutido antes, nesse caso haveria uma seleção para alogamia, o que não ocorre. Já para genes de caracteres não adaptativos, a dominância poderá ser positiva ou negativa, indistintamente, tendo-se então uma situação semelhante ao "modelo B", no que diz respeito a esse componente.

5.2 DELINEAMENTOS GENÉTICOS

O esquema genético proposto por Cockerham & Weir (1984) permite a estimação dos seis componentes da variância genética, sendo, entretanto, necessária a obtenção de quatro tipos de progênies e a avaliação dessas progênies e suas respectivas plantas mãe. Com esses dados é possível obter as covariâncias: C_1 = covariância entre mãe e filhas oriundas de cruzamento; C_2 = covariância entre mãe e filhas autofecundadas; C_3 = covariância entre irmãs autofecundadas; C_4 = covariância entre irmãs autofecundadas e cruzadas (polinização livre); C_5 = covariância entre irmãs perfeitas e C_6 = covariância entre meias-irmãs (Figura 2).

Após a obtenção das medidas de parentesco em função do coeficiente de endogamia (F) e as substituições dos coeficientes estimados nas expressões das covariâncias entre parentes, são obtidas as expressões das covariâncias, as quais encontram-se na Tabela 9.

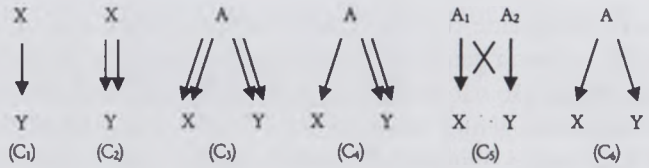


FIGURA 2. Esquemas de parentesco e representação das relações entre *X* e *Y* e de pelo menos um ancestral envolvido nas covariâncias (*A*). (C_1) Mãe e filha oriunda de cruzamento; (C_2) Mãe e filha autofecundada; (C_3) Irmãs autofecundadas (*X*, *Y*); (C_4) Irmãs cruzadas e autofecundadas; (C_5) Irmãs perfeitas; (C_6) Meias-irmãs (Cockerham & Weir, 1984).

Entretanto, com base nesses coeficientes não é possível estimar todos os componentes quadráticos, por isso é sugerida a estimação em separado do quadrado da soma da depressão endogâmica de cada loco (H^2). Esse componente é estimado pela diferença entre as médias das progênies obtidas por cruzamentos e as médias das progênies obtidas por autofecundação, de modo que é igual a:

$$\hat{H} = \frac{2}{1+F}(m_e - m_s) \tag{21}$$

$$\hat{H}^2 = (\hat{H})^2 - \frac{4}{(1+F)^2}(V_{me} + V_{ms}) \tag{22}$$

A Expressão 21 fornece o efeito da depressão endogâmica total, sendo que $(m_e - m_s)$ corresponde à depressão endogâmica observada, ao passo que a Expressão 22 corresponde a uma estimativa não tendenciosa de H^2 e, V_{me} e V_{ms} são as variâncias de erros experimentais das médias das progênies cruzadas e autofecundadas, respectivamente.

O esquema proposto inclui covariâncias envolvendo muitos parentescos que, em alguns casos, devem ser de difícil obtenção em populações mistas, pela dificuldade de se prevenir a autofecundação e efetuar polinizações manuais, tornando-se um esquema de difícil aplicação pelos melhoristas. Devido a isso, Pereira (1989) propôs o emprego de outros esquemas genéticos, de modo a facilitar a obtenção de dados a

TABELA 9. Coeficientes dos componentes quadráticos das covariâncias entre parentes em populações com sistema misto de reprodução.

Covariância	V_A	V_D	D_1	D_2^*	H^*	H^2
C_1	$\frac{1+F}{2}$	0	F	0	0	0
C_2	$1+F$	$\frac{1-F}{2}$	$\frac{1+7F}{2}$	F	$\frac{F(1-F)}{2}$	$\frac{F(1-F^2)}{2(2+F)}$
C_3	$1+F$	$\frac{1-F}{4}$	$1+3F$	$\frac{1+7F}{8}$	$\frac{F(1-F)}{4}$	$\frac{F(1-F^2)}{4(2+F)}$
C_4	$\frac{1+F}{2}$	0	$\frac{1+3F}{4}$	0	0	0
C_5	$\frac{1+F}{2}$	$\frac{(1+F)^2}{4}$	0	0	0	0
C_6	$\frac{1+F}{4}$	0	0	0	0	0

Fonte: Cockerham & Weir (1984)

serem empregados para a estimação dos componentes da variância genética. Esses esquemas têm como principal objetivo, portanto, diminuir ao máximo o trabalho do melhorista, evitando o uso de progênies de difícil obtenção e enquadrando-os ao máximo aos esquemas já utilizados no melhoramento.

Nesses esquemas, as progênies são representadas como: H = meias-irmãs; S = autofecundadas (S_1); F = irmãs perfeitas; M = maternas (obtida por meio de polinização livre); C = obtidas por cruzamento, podendo ser progênies de meias-irmãs ou de irmãs perfeitas. Os diagramas de parentesco encontram-se representados na Figura 3.

As covariâncias correspondentes aos parentescos expressos na Figura 3, estão na Tabela 10. Para formar a matriz correspondente a cada esquema basta observar nesta tabela os coeficientes dos componentes das covariâncias nas linhas correspondentes às progênies usadas. Por exemplo, poder-se-ia utilizar um esquema simples que exige progênies obtidas com baixo controle de polinização e que muitas vezes já fazem parte do esquema de melhoramento. Trata-se do uso das mães (A), das progênies autofecundadas (S_1) e respectivas progênies maternas (M).

O uso dessas progênies pode significar uma grande facilidade para os melhoristas, quando as progênies S_1 já forem obtidas normalmente no início dos programas de melhoramento, ao passo que as progênies M podem ser obtidas de flores femininas, quando a planta produz flores separadas, ou de inflorescências pouco compactas, não necessitando, portanto, de controle da polinização. As desvantagens podem ser a necessidade de avaliar as plantas mãe (às vezes isso já é feito como rotina) e o aumento nas dimensões do ensaio, uma vez que será preciso avaliar o dobro do número de progênies.

Neste caso, há a necessidade de estimar as covariâncias C_{AS}, C_{AM}, C_{SS}, C_{SM} e C_{MM}, as quais juntamente com os componentes da variância e com seus respectivos coeficientes, darão origem a cinco equações. Com esse sistema de equações não é possível, obviamente, estimar os seis componentes quadráticos. Assim, o componente H^2 é, mais uma vez, estimado em separado pela diferença entre as médias das família, ou seja, será igual a:

$$\hat{H} = \frac{2-s}{1-s}(m_m - m_i) \tag{23}$$

$$\hat{H}^2 = (\hat{H})^2 - \left(\frac{2-s}{1-s}\right)^2 (V_{mm} + V_{mi}) \text{ , para } 0 \leq s < 1. \tag{24}$$

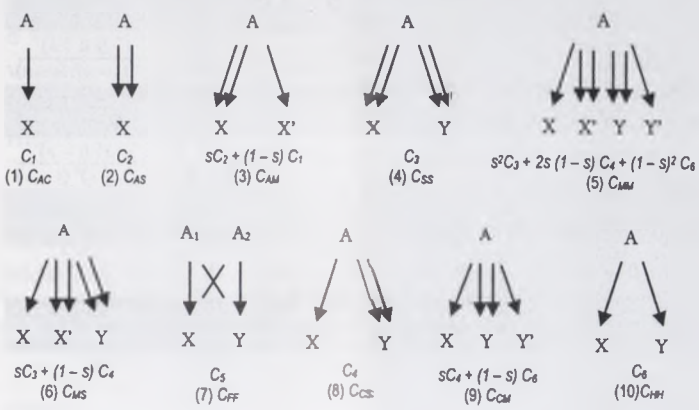


FIGURA 3. Diagramas dos parentescos empregados para estimação dos componentes da variância genética e suas correspondências com os parentescos propostos por Cockerham & Weir (1984). O índice *C* nas covariâncias significa a covariância com um indivíduo oriundo de cruzamento, podendo ser uma família de meias-irmãs ou de irmãs perfeitas.

em que $\hat{H}^2$ é o estimador não tendencioso de H^2, m_m é a média das progênies M e m_s das progênies S_1, e V_{mm} e V_{ms} suas variâncias residuais, respectivamente.

A impossibilidade de estimar todos os componentes quadráticos com base, diretamente, nesse sistema de equações, deve-se ao fato de a matriz resultante desse sistema não ter posto completo, uma vez que a coluna 5, que reúne os coeficientes de H^*, é igual à coluna 2 multiplicada por $s/(4 - s)$, assim como a coluna 6 dos coeficientes de H^2 também é proporcional à coluna 2, ou seja, os coeficientes de H^2 são iguais aos da coluna 2 multiplicados por $2s/(2 - s)(4 - s)$. Quanto à estimativa de H^2 não há problemas, pois como visto pode ser estimado à parte. Essa redundância de informações tem como conseqüência a existência de correlações muito altas entre as colunas das matrizes, o que causa má conformação das mesmas e com isso problemas na estimação dos componentes. Tal redundância é causada também pela própria natureza dos componentes da variância genética, uma vez que tanto a variância V_D quanto as componentes D_1 e D_2^* são funções dos efeitos de dominância, assim como D_3 (covariância entre efeitos aditivos e dominantes dos homozigotos) é função também de efeitos aditivos.

A avaliação de adequação do sistema de estimação pode ser realizada por meio de testes de colinearidade entre as colunas das matrizes compostas pelos coeficientes dos componentes da variância genética, os quais dependem da natureza genética de cada covariância e que são função do coeficiente de endogamia e da taxa de autofecundação ou de fecundação cruzada. A colinearidade é mensurada através do coeficiente de correlação linear simples entre os valores dos coeficientes da matriz. Segundo Rawlings (1988), quando o valor do quociente entre o maior e o menor autovalor da matriz varia de 2 a 10 a colinearidade é considerada pequena,

TABELA 10. Coeficientes dos componentes quadráticos das covariâncias entre parentes em população com sistema misto de reprodução, de acordo com os diagramas apresentados na Figura 3.

	V_A	V_D	D_1	D_2^*	H^*	H^2
C_{AC}	$\frac{1}{2-s}$	0	$\frac{s}{2-s}$	0	0	0
C_{AS}	$\frac{2}{2-s}$	$\frac{1-s}{2-s}$	$\frac{1+3s}{2-s}$	$\frac{s}{2-s}$	$\frac{s(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{2s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{AM}	$\frac{1+s}{2-s}$	$\frac{s(1-s)}{2-s}$	$\frac{2s(1+s)}{2-s}$	$\frac{s^2}{2-s}$	$\frac{s^2(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{2s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{SS}	$\frac{2}{2-s}$	$\frac{1-s}{2(2-s)}$	$\frac{2(1+s)}{2-s}$	$\frac{1+3s}{4(2-s)}$	$\frac{s(1-s)}{2(2-s)(4-s)}$	$\frac{s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{MM}	$\frac{(1+s)^2}{2(2-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{2(2-s)}$	$\frac{s(1+s)^2}{2-s}$	$\frac{s^2+3s^3}{4(2-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{2(2-s)(4-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{SM}	$\frac{1+s}{2-s}$	$\frac{s(1-s)}{2(2-s)}$	$\frac{(1+3s)(1+s)}{2(2-s)}$	$\frac{s+3s^2}{4(2-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{2(2-s)(4-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{FF}	$\frac{1}{2-s}$	$\frac{1}{(2-s)^2}$	0	0	0	0
C_{CS}	$\frac{1}{2-s}$	0	$\frac{1+s}{2(2-s)}$	0	0	0
C_{CM}	$\frac{1+s}{2(2-s)}$	0	$\frac{s+s^2}{2(2-s)}$	0	0	0
C_{HH}	$\frac{1}{2(2-s)}$	0	0	0	0	0

Fonte: Pereira (1989)

quando varia de 30 a 100 é moderada e quando está acima de 100 é considerada forte e, nesse caso, provoca vários problemas na estimação dos parâmetros. Crisóstomo (1989), Ferreira (2000) e Pereira (1989) verificaram a existência de altas colinearidades para as componentes associadas a V_A x D_1, V_A x D_2^* e D_1 x D_2^* , em todos os esquemas genéticos estudados, incluindo o proposto por Cocherham & Weir (1984).

Outro comentário importante diz respeito ao papel da taxa *s*. O valor do coeficiente que aparece no parâmetro *H*, por exemplo, é igual a *(2 - s)/(1 - s)*, implicando que se *s* tende a 1 esse valor cresce muito, tendendo a infinito. A componente *H* é estimada pela diferença entre a média de progênies maternas, que tem uma endogamia *s/(2-s)* e de progênies S_1, com endogamia *1/(2 - s)*, sendo a diferença igual a *(1 - s)/2 - s)*, valor que tende a zero se *s* tende a um. Com o aumento de *s* essas duas progênies tornam-se cada vez mais próximas, sendo iguais quando *s* = 1. Na prática isso exige uma precisão experimental cada vez maior, já que a quantidade estimada torna-se muito pequena, podendo resultar, inclusive, em valores negativos de *H*. Por isso recomenda-se efetuar o teste *t* para contrastar as médias das progênies maternas com as das progênies autofecundadas. Somente nos casos em que o teste for significativo é que deverá ser incluído o componente H^2 no modelo, do contrário ele deverá ser considerado nulo.

Essas mesmas observações são válidas para a matriz, cujas linhas refletem diferenças entre progênies autofecundadas e progênies maternas. Com *s* = 1 todas as linhas da matriz dos coeficientes, tornam-se iguais a 2, 0, 4, 1, 0, 0, o que inviabiliza qualquer estimativa, pois há colinearidade perfeita. Todavia, com *s* = 1 não haverá mais a necessidade de estimar esses componentes.

Diante das considerações expostas pode-se prever que, ao usar qualquer esquema genético baseado nessas covariâncias, deverão ocorrer os mesmos problemas. Aliás, Pereira (1989) já constatou para diferentes esquemas genéticos, inclusive o proposto por Cockerham & Weir (1984), a existência dessas dificuldades, sugerindo soluções interessantes.

Uma das soluções consistiria em estimar as componentes V_D e H^* em conjunto, eliminando a quinta coluna da matriz; com isso o segundo elemento estimado seria $V_D + [sH^*/(4 - s)]$, ou então considerar $V_D = H^*$, somando-se a coluna dois com a cinco, solução apresentada na Tabela 11. Nesta tabela encontram-se várias covariâncias e variâncias que podem ser utilizadas em esquemas para estimar os componentes da variância genética. Devem ser escolhidas aquelas que forem mais fáceis de obter e que ofereçam condições para a estimação dos componentes, isto é, que formem matrizes de posto completo.

Outra opção seria estimar em separado somente as componentes que influem no progresso permanente. Como será visto posteriormente, essas componentes são a variância V_A, a covariância D_1 e a variância D_2^* . A outra componente consistiria da reunião das componentes V_D, H^* e H^2, ou seja, $V_D + [SH^*/(4 - s)] + 2FH^2/(4 - s)$. Desta forma, a coluna 6 da matriz também poderia ser eliminada. Essa opção prescinde do cálculo de H^2 em separado e reduz o trabalho; porém a inclusão dos valores de V_D, H^* e H^2 em um único componente não é possível para todas as covariância entre parentes, o que restringe essa solução.

TABELA 11. Coeficientes dos componentes quadráticos das covariâncias entre progênies e variâncias dentro de progênies para os diversos tipos de progênies usadas, supondo $V_D = H^*$.

Cov	V_A	V_D	D_1	D_2^*	H^2
C_{AC}	$\frac{1}{2-s}$	0	$\frac{s}{2-s}$	0	0
C_{AS}	$\frac{2}{2-s}$	$\frac{4(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{1+3s}{2-s}$	$\frac{s}{2-s}$	$\frac{2s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{AM}	$\frac{1+s}{2-s}$	$\frac{4s(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{2s(1+s)}{2-s}$	$\frac{s^2}{2-s}$	$\frac{2s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{SS}	$\frac{2}{2-s}$	$\frac{2(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{2(1+s)}{2-s}$	$\frac{1+3s}{4(2-s)}$	$\frac{s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{MM}	$\frac{(1+s)^2}{2(2-s)}$	$\frac{2s^2(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{s(1+s)^2}{2-s}$	$\frac{s^2(1+3s)}{4(2-s)}$	$\frac{s^3(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{SM}	$\frac{1+s}{2-s}$	$\frac{2s(1-s)}{(2-s)(4-s)}$	$\frac{(1+s)(1+3s)}{2(2-s)}$	$\frac{s(1+3s)}{4(2-s)}$	$\frac{s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}$
C_{FF}	$\frac{1}{2-s}$	$\frac{1}{(2-s)^2}$	0	0	0
C_{CM}	$\frac{1+s}{2(2-s)}$	0	$\frac{s(1+s)}{2(2-s)}$	0	0
C_{HH}	$\frac{1}{2(2-s)}$	0	0	0	0
V_{DS}	$\frac{1-s}{2-s}$	$\frac{1-s}{2-s}$	$\frac{2(1-s)}{2-s}$	$\frac{3(1-s)}{4(2-s)}$	0
V_{DM}	$\frac{4-(1+s)^2}{2(2-s)}$	$\frac{(1-s)(6-8s^2+s^3)}{2(2-s)(4-s)}$	$\frac{4s-s(1+s)^2}{2-s}$	$\frac{4s-s(s+3s^2)}{4(2-s)}$	$\frac{s(1-s)(2+s)}{(2-s)(4-s)}$
V_{DH}	$\frac{3-2s}{2(2-s)}$	1	0	0	0
V_{DF}	$\frac{1-s}{2-s}$	$1-\frac{1}{(2-s)^2}$	0	0	0

Fonte: Pereira (1989)

6. MÉTODOS DE SELEÇÃO E PROGRESSO GENÉTICO

Conforme foi comentado, as populações mistas atingem o equilíbrio lentamente, consumindo a rigor infinitas gerações. A principal mudança durante o período em que a população está tendendo ao equilíbrio, é a alteração da proporção entre homozigotos e heterozigotos, de forma que a média muda lentamente durante esse período até se estabilizar, quando a população atinge o equilíbrio.

A seleção e a estruturação de uma população em progênies levam a um desequilíbrio da freqüência genotípica e a uma alteração da endogamia na população, com exceção apenas das progênies maternas, que são obtidas por polinização livre e nas quais o desequilíbrio é minimizado. Portanto, o ganho obtido na geração imediatamente após a seleção não é permanente. Dessa forma, existem dois tipos de ganhos genéticos pela seleção: a) **Ganho imediato** – que equivale ao progresso na geração imediatamente após a geração de seleção; b) **Ganho permanente** – que corresponde ao progresso atingido quando a população selecionada retorna ao equilíbrio. Sendo assim, o ganho permanente, sendo retido pelos descendentes distantes, é mais importante que o ganho imediato, pois este pode ser perdido com o avanço das gerações.

Existe também o ganho transitório, que equivale à porção do ganho imediato que é perdida, sendo estimado pela diferença entre as covariâncias definidas para a primeira geração após a seleção e as relativas à geração de equilíbrio. Este ganho pode surgir através de seleção de efeitos de dominância dentro de grupos de indivíduos com um coeficiente comum de endogamia (contribuições de V_D, D_1 e D_2^*), através de mudanças na média da população causada pela seleção entre grupos (H^* e H^2) e, no caso de seleção de progênies, por mudanças no sistema de obtenção das progênies. Para a maioria dos tipos de seleção, é esperado que o ganho transitório seja positivo; contudo para a seleção de progênies autofecundadas geralmente é negativo (Wright & Cockerham, 1986).

De acordo com Wright & Cockerham (1985), as respostas dos ganhos imediatos e permanentes são distintas em decorrência das contribuições diferenciadas dos componentes quadráticos da variância genética, exceto da variância aditiva. Na presença de depressão endogâmica, a seleção tende a favorecer indivíduos menos endogâmicos, implicando em descendentes que são menos endogâmicos que a média populacional. Assim, o ganho imediato é resultante, parcialmente, de mudanças que ocorrem no coeficiente de endogamia (F), e neste caso estão presentes os componentes da depressão endogâmica H^* e H^2. Como o coeficiente F é afetado temporariamente, esses componentes não estão presentes nas covariâncias envolvidas no ganho permanente. A contribuição inicial da variância V_D também é devida a um efeito transiente similar resultante da seleção de heterozigotos dentro de grupos endogâmicos; em conseqüência essa componente também não influencia na resposta do ganho permanente. Já as componentes D_1 e D_2^* participam de modo diferenciado no ganho imediato e permanente, devido à perturbação do equilíbrio de endogamia.

Wright & Cockerham (1985) formularam as respostas esperadas, imediatas e permanentes, com a seleção massal usando as covariâncias entre parentes e os componentes quadráticos dados por Cockerham & Weir (1984). A covariância entre pais e filhos foi denominada como C_p: C_{PO} = covariância entre pais e filhos oriundos de cruzamento; C_{PS} = covariância entre pais e filhos oriundos de autofecundação. Consideraram, também, dois métodos de seleção massal:

a) Seleção após a reprodução; método mais usual em culturas anuais que se caracteriza por ser o pólen oriundo de indivíduos não selecionados. Neste caso a covariância dos ancestrais selecionados com seus descendentes, na geração em equilíbrio, é igual a:

$$C_{P1} = \frac{1+s}{2-s} V_A + \frac{s(1+s)(3-s)}{(2-s)^2} D_1 + \frac{s^2(1+s)}{2(2-s)^2} D_2^* \qquad (25)$$

b) Seleção antes da reprodução; método mais comum em culturas perenes, nas quais os indivíduos podem ser mantidos após a avaliação e que se caracteriza pelo fato de apenas os indivíduos selecionados serem reproduzidos. Agora, a covariância dos ancestrais selecionados com seus descendentes, na geração em equilíbrio, é igual a:

$$C_{P2} = \frac{2}{2-s} V_A + \frac{2s(3-s)}{(2-s)^2} D_1 + \frac{s^2}{(2-s)^2} D_2^* \qquad (26)$$

Nota-se que, $C_{p1}=C_{p2}\frac{1+s}{2}$, já que nessa seleção $\frac{1+s}{2}$ dos alelos nos descendentes provêm de progenitores selecionados.

Foi demonstrado, ainda, que o valor da média na geração em equilíbrio pode ser determinada pela média de duas gerações quaisquer e seus coeficientes de endogamia, já que a média é uma função linear dos coeficientes de endogamia quando a epistasia é desprezada. Considerando as duas primeiras gerações, em qualquer método de seleção, a média na geração em equilíbrio (Y_∞) será igual a:

$$Y_\infty = \frac{2Y_2 - sY_1}{2-s} \tag{27}$$

em que Y_1 é a média na primeira geração e Y_2 é a média na segunda geração após a seleção.

Considerando a seleção antes da reprodução, a relação citada na Expressão 27 pode ser estendida à geração inicial, na qual se faz a seleção. Assim, o ganho genético permanente é igual a:

$$Gs_{P2} = \frac{2Gs_{21} - s\,Gs_{20}}{2-s} \tag{28}$$

$$Gs_{20} = i\frac{V_G}{\sqrt{V_P}} \tag{29}$$

onde Gs_{20} é a resposta à seleção ocorrida na geração sob seleção e Gs_{21} é o ganho imediato, observado na geração seguinte.

O ganho com base na seleção em um só sexo pode ser estimado por:

$$Gs_{P2} = Gs_{P1}\frac{1+s}{2} \tag{30}$$

Vale comentar que, sob a mesma intensidade de seleção, nas populações alógamas o ganho esperado, quando se pratica seleção em um só sexo, é igual à metade do progresso esperado com a seleção em ambos os sexos. Isso, nas mistas, já não é mais válido pois, conforme a Expressão 30 esse progresso em um só sexo corresponde à fração $(1 + s)/2$ do ganho esperado na seleção em ambos os sexos.

Posteriormente, Wright & Cockerham (1986) formularam os ganhos esperados, imediatos e permanentes, para vários tipos de seleção envolvendo testes de progênies. Foram consideradas as progênies: H = meias-irmãs; F = irmãs perfeitas; M = maternas; C = oriundas de cruzamentos de pares de plantas, sem exclusão de autofecundação; S = autofecundadas. A formulação do ganho esperado com a seleção, novamente, foi determinada em termos de covariância entre parentes, segundo os modelos e as pressuposições propostas por Cockerham & Weir (1984). Na Tabela 12 constam os coeficientes das componentes da variância que participam do ganho permanente. Por meio de avaliações numéricas, verificaram que a seleção baseada em progênies autofecundadas foi mais eficiente, enquanto que a baseada em progênies de meias-irmãs a menos eficiente. A seleção com base em progênies maternas foi melhor quando a taxa de autofecundação natural era alta.

TABELA 12. Coeficientes das componentes quadráticas das covariâncias, utilizadas na predição do progresso genético permanente.

$C(G_0, G_\infty)$	Componentes da Variância Genética		
	V_A	D_1	D_2^*
Seleção entre progênies S_1 com recombinação de sementes remanescentes de progênies S_1 ou M			
$Cov_{(S,S)}$ [1]	$\frac{2}{2-s}$	$\frac{(2+3s-s^2)}{(2-s)^2}$	$\frac{s(1+s)}{2(2-s)^2}$
$Cov_{(S,M)}$ [2]	$\frac{2(1+s)}{2(2-s)}$	$\frac{(1+s)(2+3s-s^2)}{2(2-s)^2}$	$\frac{s(1+s)^2}{4(2-s)^2}$
Seleção entre progênies M com recombinação de sementes remanescentes de progênies M ou S_1			
$Cov_{(M,M)}$ [1]	$\frac{(1+s)^2}{2(2-s)}$	$\frac{s(1+s)^2(3-s)}{2(2-s)^2}$	$\frac{s^2(1+s)^2}{4(2-s)^2}$
$Cov_{(M,S)}$ [2]	$\frac{1+s}{2-s}$	$\frac{s(3+2s-s^2)}{2(2-s)^2}$	$\frac{s^2(1+s)}{2(2-s)^2}$

[1]Wright & Cockerham (1986)
[2]Pereira (1989)

Com a finalidade de simplificar os esquemas de seleção de progênies sugeridos por Wright & Cockerham (1986) foram estudados outros esquemas por Pereira (1989), com base nas mesmas progênies, como visto no item anterior. As expressões dos coeficientes dos componentes quadráticos foram determinadas com base em Cockerham & Weir (1984) e as simulações e comparações dos diferentes processos de seleção efetuados empregando o modelo proposto por Wright & Cockerham (1985; 1986), acrescentando outros esquemas seletivos, como: a) obtenção e avaliação de progênies maternas e autofecundadas, com avaliação das plantas mãe; b) obtenção e avaliação de progênies maternas, autofecundadas e de irmãs perfeitas; c) obtenção de progênies autofecundadas e de irmãs perfeitas, com avaliações destas e das plantas mãe; d) obtenção e avaliação de progênies autofecundadas, de meias irmãs e de irmãs maternas. Foram estudados, também, diferentes processos seletivos com base em progênies, sendo eles: i) seleção entre e dentro de progênies; ii) seleção de indivíduos com base na progênie; iii) seleção massal após seleção entre progênies.

Em todas as situações estudadas, a seleção massal após a seleção entre progênies superou a seleção dentro de progênies, possuindo este método a vantagem adicional de a recombinação ser mais eficiente e fácil. Na seleção entre progênies, as combinações que apresentaram melhores resultados foram: a seleção pela média de progênies autofecundadas e maternas com recombinação de progênies autofecundadas e a seleção de progênies autofecundadas com recombinação de progênies autofecundadas. A melhor progênie para unidade de recombinação foi a autofecundada, a segunda foi a progênie materna, porém a vantagem da primeira sobre a segunda diminuiu com o aumento de s (Pereira, 1989).

No caso da seleção entre progênies, a endogamia também pode influenciar na avaliação das mesmas, já que em alguns tipos, como nas progênies S_1, maternas, ou cruzadas (sem exclusão da autofecundação), haverá uma variação no nível de endogamia entre progênies, o que irá influenciar as suas médias. Se o melhorista

usar progênies maternas, por exemplo, plantas mãe com menor número de autofecundações na sua genealogia (Tabela 2), produzirão progênies com menor endogamia, conseqüentemente com maiores médias. Caso haja variação genética para o sistema reprodutivo, a seleção irá produzir geração com maior ou menor taxa de cruzamento, sem necessariamente melhorar o caráter selecionado *per se*. Caso não haja variação genética para o sistema de reprodução, é provável que a seleção cause pouca alteração na população, já que estão sendo selecionados os mais heterozigóticos. Nestes casos o melhorista deve optar pelo uso de progênies que eliminem a endogamia, como progênies de meias-irmãs, ou de irmãs perfeitas, em que $F = 0$. Isso elimina o problema, mas é claro, implica em mais trabalho no controle das polinizações.

Uma outra possibilidade é usar dois tipos de progênies, por exemplo maternas e autofecundadas, conforme já abordado anteriormente. Em tal situação pode-se usar como critério de seleção, além das médias das progênies, a depressão pela endogamia estimada pela diferença entre as médias das progênies maternas e autofecundadas correspondentes. Como já enfatizado, as progênies selecionadas devem ser as com maiores médias e menores valores da depressão. Assim, seriam selecionadas progênies oriundas de plantas mais homozigóticas em locos com dominância, que portanto geraram progênies maternas e de autofecundação mais semelhantes, ou progênies isentas de genes prejudiciais, que mostram menor depressão por endogamia.

Devido às naturais dificuldades em estimar todos os componentes da variância genética em populações mistas, principalmente em espécies perenes, Resende *et al.* (1995) propuseram uma maneira de obter estimativa aproximada do progresso genético imediato. Esses autores utilizaram o modelo genético de Cockerham & Weir (1984) e a metodologia de Wright & Cockerham (1986) para fazer simulações desse ganho, considerando diferentes freqüências alélicas e graus de dominância, assim como diferentes processos de seleção, todos baseados em progênies maternas, uma vez que a obtenção e avaliação de outros tipos de progênies é impraticável em espécies perenes. Assim, para estimar esse ganho, esses autores recomendam os seguintes coeficientes multiplicadores da variância genética entre progênies maternas para obter os numeradores da expressão do ganho: $\frac{4}{(1+s)^2}$, $\frac{2(1+s)}{(1+s)^2}$, 1 e $\frac{4}{(1+s)^2}-1$ para os seguintes esquemas de seleção praticados em ambos os sexos: seleção individual; com teste de progênie; entre progênies maternas e dentro de progênies maternas, respectivamente. Segundo Resende[7], esses coeficientes estão sendo considerados em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. Os progressos assim estimados tendem a ser conservadores.

Vale lembrar que, no melhoramento via seleção recorrente, são praticados ciclos sem intervalos de gerações. Neste sistema, em populações mistas, o equilíbrio é permanentemente destruído e as covariâncias, assim como a variância populacional, são afetadas pelo desequilíbrio, implicando que as fórmulas empregadas para estimação dos progressos genéticos permanentes não podem ser aplicadas a ciclos subseqüentes. Portanto, a utilização de métodos de seleção recorrente em populações que possuem sistema reprodutivo misto deve ser analisada com cuidado e sua aplicabilidade depende muito do coeficiente s ser alto ou baixo, como já comentado.

[7]Resende, M.D.V. (Embrapa Florestas). Comunicação pessoal, 2000.

7. ESTIMAÇÃO DOS COMPONENTES DA VARIÂNCIA GENÉTICA

7.1 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

Considerando que, para a estimação dos componentes da variância genética, é preciso avaliar, simultaneamente, dois ou mais tipos de progênies em conjunto, a depender do delineamento genético, é interessante uma apreciação de alguns delineamentos experimentais que podem ser utilizados. Deve-se lembrar que, independentemente do delineamento empregado, os efeitos das plantas mãe ou de suas progênies, devem ser considerados aleatórios, já que representam o estado da população quanto à endogamia e quanto à variação genética, sendo por isso utilizadas para estimar os parâmetros populacionais. Os efeitos de tipos de progênies, por sua vez, devem ser considerados fixos, pela sua própria natureza.

Conforme já comentado anteriormente, uma situação muito favorável, se não necessária, é obter os diferentes tipos de progênies de cada planta mãe e não de mães diferentes. Assim sendo, o modelo do delineamento experimental contém os efeitos principais de plantas mãe (M), de tipos de progênies (P) e da interação desses efeitos (MP). Para interpretação genética das componentes da variância, é preciso usar modelo complementar contendo os efeitos de mães dentro de cada tipo de progênie e deve-se operar no sentido de estimar a covariância genética entre os tipos de progênies, tomados aos pares.

Alguns delineamentos experimentais são dados a seguir, subentendendo-se que eles são instalados com números adequados de repetições e plantas por parcela:

a) Experimentos independentes, um para cada tipo de progênie, instalados na mesma área experimental e na mesma época, ou seja, em condição ambiental suficientemente homogênea. Nesse caso é preciso ter testemunhas comuns em todos os ensaios, para se poder estimar adequadamente a depressão pela endogamia. Isso é evidente pois essa depressão será medida pelo contraste entre as médias de diferentes ensaios, que contém, quando não ajustadas, efeitos confundidos de ensaios;

b) Experimentos em parcelas subdivididas. Nesse delineamento as mães são sorteadas nas parcelas e os tipos de progênies nas subparcelas. A viabilidade desse delineamento dependerá do grau de depressão esperada nas progênies mais endogâmicas. Avaliando-se, por exemplo, progênies maternas e S_1, semeadas em linhas, estas ficam lado a lado o que pode mascarar os resultados devidos aos efeitos indesejados de competição;

c) Experimentos em faixas. Sendo uma variação do delienamento em parcelas subdivididas, esse tipo contorna o problema citado no item b, pois cada tipo de progênie ocupará uma faixa própria, dentro de cada repetição.

Outros delineamentos são possíveis. Convém lembrar que, nas situações em que o número de progênies (plantas mãe) é elevado, torna-se necessário adotar alguma estratégia de blocos incompletos, sempre lembrando da necessidade de se ter condições e mecanismos que permitam o ajuste das médias para os efeitos de blocos.

Por ter características bastante favoráveis, será considerado a seguir o delineamento em faixas, fornecendo os elementos básicos para estimação dos componentes da variância.

Considere-se que há I plantas mãe, cada uma representada por J tipos de progênies, avaliadas em K repetições com L plantas por parcela. O esquema da análise de variância com a esperança dos quadrados médios é dado na Tabela 13.

Na Tabela 13, têm-se que:

$$\sigma_d^2 = \frac{1}{J}\sum \sigma_j^2 \tag{31}$$

$$\sigma_e^2 = \frac{1}{2}(\sigma_a^2 + \sigma_e^2) \tag{32}$$

Todas as componentes da variância desta tabela são estimáveis. O método mais utilizado de estimação é o dos momentos, em que se opera com os quadrados médios de acordo com as respectivas esperanças matemáticas. Para exemplificar, adimita-se que há dois tipos de progênies ($J = 2$), as de autofecundação (S) com a variação genética entre elas representada por σ_{m1}^2 e as maternas (M) de polinização

TABELA 13. Esquema de análise de variância de experimento em faixas. Avaliação simultânea de diferentes tipos de progênies. Modelo Misto.

Fontes de Variação	G.L.	E (Q.M.)
Repetições	$K - 1$	
Plantas Mãe *(M)*	$I - 1$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2 + LJ\sigma_a^2 + LJK\sigma_m^2$
Resíduo *a*	$(I - 1)(K - 1)$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2 + LJ\sigma_a^2$
Tipos de Progênies *(T)*	$J - 1$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2 + LI\sigma_b^2 + LK\frac{J}{J-1}\sigma_{mt}^2 + LIKV_t$
Resíduo *b*	$(J - 1)(K - 1)$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2 + LJ\sigma_b^2$
Interação *M x T*	$(I - 1)(J - 1)$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2 + LK\sigma_{mt}^2$
Resíduo *c*	$(I - 1)(J - 1)(K - 1)$	$\sigma_d^2 + L\sigma_e^2$
Dentro de progênies	$IJK(L - 1)$	σ_d^2
Total	$IJKL - 1$	
Plantas mães		
Dentro de tipos		
M/T_1	$I - 1$	$\sigma_1^2 + L\sigma_e^2 + LK\sigma_{m1}^2$
M/T_2	$I - 1$	$\sigma_2^2 + L\sigma_e^2 + LK\sigma_{m2}^2$
⋮		
M/T_J	$I - 1$	$\sigma_J^2 + L\sigma_e^2 + LK\sigma_{mJ}^2$
Dentro de parcelas		
Tipos de progênies		
T_1	$IK(L - 1)$	σ_1^2
T_2	$IK(L - 1)$	σ_2^2
⋮		
T_J	$IK(L - 1)$	σ_J^2

livre com variação genética σ^2_{m2} . A variação fenotípica entre plantas dentro dessas progênies é σ^2_1 e σ^2_2 , respectivamente, cujas componente genéticas são V_{DS} e V_{DM}, respectivamente (Tabela 11).

O significado genético das diversas componentes da variância é:

$\sigma^2_{m1} = C_{SS}$: covariância genética entre irmãs autofecundadas;

$\sigma^2_{m2} = C_{MM}$: covariância genética entre irmãs de polinização livre;

$\sigma^2_m - \sigma^2_{mt} = C_{SM}$: covariância genética entre plantas S_i e as respectivas irmãs de polinização livre.

Antes de detalhar o conteúdo genético dessas componentes, é interessante referir-se à natureza da componente V_t que decorre do contraste entre as médias das progênies M e S_i. Supondo um só loco, esse contraste equivale a $p_i q_i d_i (1 - s) (1 + F)$. Para um conjunto de locos, sem epistase, equivale a $(1 - s) (1 + F) \Sigma p_i q_i d_i$. Desse modo a componente V_t corresponde a $V_t = (1/4) [(1 - s) (1 + F) \Sigma p_i q_i d_i]^2$. Considerando o conteúdo genético da componente H^2, pode-se relacioná-la com V_t, obtendo-se $H^2 = 4V_t / [(1 - 2) (2 - s)]^2$. O quadrado da soma da depressão endogâmica de cada loco (H^2) pode, pois, ser estimado através da componente V_t , sempre que $0 \leq s < 1$. O parâmetro H^2 também pode ser estimado diretamente pelo contraste entre as médias das progênies M e S_i, elevado ao quadrado e adequadamente corrigido para o viés devido ao erro experimental contido nessas médias (Crisóstomo, 1989; Ferreira, 2000). O método exposto, no entanto, de obter estimativa de H^2 via V_t é perfeitamente válido, sendo essa estimativa não só corrigida para o referido viés como também para os efeitos da interação, aqui mensurado pela componente σ^2_{mt} .

Para obter as estimativas das demais componentes o procedimento recomendado começa subtraindo-se de cada covariância ou variância a componente H^2, multiplicada pelo seu respectivo coeficiente. Admitindo-se dois alelos por loco segregante tem-se que $H^* = V_D$ e, assim, restam quatro componentes genéticas a estimar, a saber: V_A, V_D, D_1 e D_2^* . Isso requer o aproveitamento da variância genética dentro das progênies para obter número suficiente de equações. Tomando como σ^2_{ed} a variância ambiental (ou do erro) dentro de progênies e considerando que ela é a mesma nos dois tipos de progênies, resulta o seguinte sistema de equações: $Y = X\beta$ (*).

$$Y = \begin{vmatrix} C_{SS} - \frac{s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}\hat{H}^2 \\ C_{MM} - \frac{s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}\hat{H}^2 \\ C_{SM} - \frac{s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}\hat{H}^2 \\ \sigma^2_1 \\ \sigma^2_2 - \frac{s(1-s)(2+s)}{(2-s)(4-s)}\hat{H}^2 \end{vmatrix} ; X = \begin{vmatrix} \frac{2}{2-s} & \frac{2(1-s)}{(2-s)(4-s)} & \frac{2(1+s)}{2-s} & \frac{1+3s}{4(2-s)} & 0 \\ \frac{(1+s)^2}{2(2-s)} & \frac{2s^2(1-s)}{(4-s)(2-s)} & \frac{s(1+s)^2}{(2-s)} & \frac{s^2(1+3s)}{4(2-s)} & 0 \\ \frac{1+s}{2-s} & \frac{2s(1-s)}{(2-s)(4-s)} & \frac{(1+s)(1+3s)}{2(2-s)} & \frac{s(1+3s)}{4(2-s)} & 0 \\ \frac{1-s}{2-s} & \frac{1-s}{2-s} & \frac{2(1-s)}{2-s} & \frac{3(1-s)}{4(2-s)} & 1 \\ \frac{4-(1+s)^2}{2(2-s)} & \frac{(1-s)(16-8s^2+s^3)}{2(2-s)(4-s)} & \frac{4s-s(1+s)^2}{2-s} & \frac{4s-s(s+3s^2)}{4(2-s)} & 1 \end{vmatrix} \beta = \begin{vmatrix} \hat{V}_A \\ \hat{V}_D \\ \hat{D}_1 \\ \hat{D}_2^* \\ \hat{\sigma}^2_{ed} \end{vmatrix} \quad (33)$$

(*)Os coeficientes contidos nesta equação (33) constam da Tabela 11 sendo que σ^2_1 contém V_{DS} e σ^2_2 contém V_{DM}

As componentes contidas no vetor β podem ser estimadas pelo processo dos quadrados mínimos, resolvendo-se o sistema de equações normais $X' X \hat{\beta} = X' Y$.

Este procedimento tem o inconveniente de requerer a estimação das variâncias fenotípicas dentro das parcelas, o que exige a avaliação individual das plantas. Porém, apresenta a vantagem de levar a estimativas com dados obtidos em um só experimento. Quando o procedimento foi verificado, com base em valores simulados, como os dos modelos da Tabela 8, ele produziu estimativas corretamente, mas mostrou-se sensível a variações nos valores dos componentes utilizados na estimação. Requer, portanto, estimativas precisas de covariâncias e variâncias para fornecer estimativas confiáveis das componentes genéticas. Isso, porém, é também esperado com outros esquemas ou delineamentos genéticos.

Uma alternativa nesse processo é obter medidas fenotípicas das plantas mãe, para correlacioná-las com as das progênies, além do ensaio contendo as respectivas progênies S_1 e M. Este foi o processo empregado por Crisóstomo (1989) e Ferreira (2000). Simbolizando por A (ancestral) as mães dessas progênies, pode-se estimar as covariâncias entre o valor fenotípico dessas e as médias das progênies S_1, isto é, C_{AS} e entre o valor delas e as médias das respectivas progênies maternas, ou seja, C_{AM}. Sendo as mães e as progênies avaliadas em ambientes ou anos diferentes, os efeitos ambientais são não correlacionados e as covariâncias entre os valores fenotípicos são de natureza unicamente genética. Há inconveniente nisso, a saber: medidas em plantas individuais tendem a conter altos erros experimentais, principalmente se o caráter é de baixa herdabilidade; as covariâncias C_{AS} e C_{AM}, quando obtidas de mães desenvolvidas em diferentes anos agrícolas, são menos influenciadas pela interação de genótipos por anos, em comparação com as estimativas dos componentes obtidas em ensaios instalados num dado local e num dado ano.

De qualquer modo, utilizando dados das mães, em lugar de medidas individuais dentro das parcelas, as componentes genéticas são estimadas via $\hat{C}_{SS}, \hat{C}_{MM}, \hat{C}_{SM}, \hat{C}_{AS}$ e $\hat{C}_{AM}$. O sistema $Y = X\beta$ deve pois ser adaptado, alterando-se as duas últimas linhas e retirando-se a componente σ^2_{ed} do vetor β. No vetor Y os dois últimos termos passam a ser:

$$\hat{C}_{AS} - \frac{2s(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}\hat{H}^2 \quad \text{e} \quad \hat{C}_{AM} - \frac{2s^2(1-s)}{(2-s)^2(4-s)}\hat{H}^2 \tag{34}$$

e na matriz X os multiplicadores de V_A, V_D, D_1 e D_2^* são:

para C_{AS}: $\frac{2}{2-s}; \frac{4(1-s)}{(2-s)(4-s)}; \frac{1+3s}{2-s}; \frac{s}{2-s}$

para C_{AM}: $\frac{1+s}{2-s}; \frac{4s(1-s)}{(2-s)(4-s)}; \frac{2s(1+s)}{2-s}; \frac{s^2}{2-s}$, respectivamente.

7.2 EXEMPLOS ILUSTRATIVOS

Para exemplificar o uso dessas técnicas serão discutidos os resultados obtidos por Crisóstomo (1989), que estudou a estrutura e o potencial genético de uma população de algodão (cultivar CNPA 3H), cuja taxa de autofecundação foi de

0,714, tendo um coeficiente de endogamia (F) igual a 0,555, admitindo equilíbrio. A população caracterizou-se como mista quanto ao sistema reprodutivo. Foram estudados vários caracteres, entre eles a porcentagem de fibras, que será usado como exemplo. Para o estudo foram avaliadas as plantas mãe, suas progênies maternas (M) e suas progênies autofecundadas (S_1), cujos resultados estão na Tabela 14.

Com esses resultados foi possível obter as estimativas das variâncias: $\hat{\sigma}^2_p$ = 1,3886, $\hat{\sigma}^2_e$ = 1,2299 e $\hat{\sigma}^2_d$ = 3,5925 para as progênies M e $\hat{\sigma}^2_p$ = 1,4523, $\hat{\sigma}^2_e$ = 0,7197 e $\hat{\sigma}^2_d$ = 3,1243 para as progênies S_1. A depressão endogâmica observada, estimada pela diferença entre as médias das progênies M e S_1, foi de 0,64, valor não significativo pelo teste t. Mesmo assim foi estimado o valor da componente H, através das Expressões 23 e 24, obtendo-se o valor $\hat{H}^2$ = 8,5301. Além desses valores foram obtidas as outras covariâncias entre parentes, as quais juntamente com os respectivos coeficientes dos componentes da variância genética de acordo com o parentesco, são mostradas na Tabela 15.

TABELA 14. Resumo da análise de variância da porcentagem de fibra, em 54 progênies maternas (M) e respectivas progênies autofecundadas (S_1) oriundas da variedade de algodoeiro CNPA 3H, plantadas em três ensaios, em blocos ao acaso, com quatro repetições para as progênies maternas e duas para as progênies S_1, e quatro plantas por parcela.

Fontes de variação	G L (M)	Q M (M)	G L (S_1)	QM (S_1)	E(QM)
Ensaios	2	1166,9062	2	241,1657	
Repetição/Ensaio	9	86,7112	3	32,6600	
Progênies/Ensaio	51	30,7292**	51	17,6211**	$\sigma^2_d + n\sigma^2_e + nr\sigma^2_p$
Resíduo/Ensaio	153	8,5120	51	6,0029	$\sigma^2_d + n\sigma^2_e$
Dentro/Ensaio	648	3,5925	324	3,1243	σ^2_d
Médias		36,34		35,70	
C.V.%		4,00		3,43	

n= número de plantas por parcela e r= número de repetições por ensaio.
Fonte: Crisóstomo (1989)

TABELA 15. Estimativas das covariâncias entre parentes e coeficientes dos componentes quadráticos, supondo $V_D = H^*$ e s = 0,714, para o caráter porcentagem de fibra em algodão.

Covariância	Valor	Coeficientes dos componentes quadráticos				
		$\hat{V}_A$	$\hat{V}_D$	$\hat{D}_1$	D^*_2	$\hat{H}^2$
Mãe-filha S_1 ($\hat{C}_{AS}$)	1,3501	1,5552	0,2707	2,4432	0,5552	0,0752
Mãe-filha M ($\hat{C}_{AM}$)	1,2529	1,3328	0,1933	1,9033	0,3964	0,0537
Irmãs S_1 ($\hat{C}_{SS}$)	1,4523	1,5552	0,1354	2,6656	0,6108	0,0376
Irmãs M ($\hat{C}_{MM}$)	1,3886	1,1422	0,0690	1,6311	0,3114	0,0192
Irmãs S_1 e M ($\hat{C}_{SM}$)	0,8007	1,3328	0,0966	2,0939	0,4361	0,0268

Fonte: Crisóstomo (1989)

Resolvendo o sistema de equações formado pelas linhas e colunas da Tabela 15, com base na Expressão 33, obtiveram-se as estimativas das componentes: $\hat{V}_A$ = 17,18, $\hat{V}_D$ = -16,73, $\hat{D}_1$ = -20,48, $\hat{D}_2^*$ = 51,17, com as devidas substituições. Com esses valores foi estimado o progresso genético permanente esperado com a seleção. Se for considerada uma seleção fenotípica nos dois sexos, de acordo com a Expressão 26, tem-se que:

$$\hat{C}_{P2} = 1{,}5552\,\hat{V}_A + 1{,}9739\,\hat{D}_1 + 0{,}3083\,\hat{D}_2^* = 2{,}0798 \qquad (35)$$

e um progresso genético permanente igual a:

$$\hat{G}s_{P2} = k\frac{C_{P2}}{S_F} = k\,\frac{(2{,}0686)}{2{,}4922} = 0{,}8345\,k \qquad (36)$$

No caso, obteve-se S_F = 2,4922 = (1,3886 + 1,2299 + 3,5925)^{0,5}

O resultado da expressão 36 ilustra a influência da componente D_1 no processo de seleção. No caso, mesmo sendo negativa essa componente, o progresso esperado não foi desprezível.

Por outro lado, ao considerar uma seleção com base na média das progênies S_1, obteve-se que:

$$\hat{C}_{SS} = 1{,}5552\,\hat{V}_A + 2{,}1963\,\hat{D}_1 + 0{,}3700\,\hat{D}_2^* = 0{,}6849 \qquad (37)$$

Assim, o progresso permanente esperado foi igual a:

$$\hat{G}s_{P(SS)} = k\frac{C_{SS}}{S_{FS1}} = k\,\frac{0{,}6710}{1{,}4841} = 0{,}4615\,k \qquad (38)$$

No caso, S_{FS1} = (17,6211/8)^{0,5}

Esses resultados servem para apontar as novas possibilidades que se apresentam no estudo dessas populações. Crisóstomo (1989) também analisou outros caracteres na mesma população e afirmou que, na avaliação de populações de algodoeiros, o uso de dois tipos de progênies proporciona um melhor conhecimento das suas propriedades genéticas e do seu potencial para a seleção. Sugeriu, portanto, o uso de dois tipos de progênies no início dos programas de melhoramento, pois isso proporciona ao melhorista um conhecimento mais detalhado do potencial da população usada, facilitando a avaliação dos diferentes critérios e estratégias de seleção e do progresso genético potencial.

Ferreira (2000) ao empregar o mesmo esquema genético aplicado por Crisóstomo (1989), ou seja, de avaliação das plantas mãe, progênies M e S_1, em uma população mista de melancia ($\hat{s}$ = 0,235 e $\hat{F}$ = 0,091), também estimou os componentes da variância genética, assim como os progressos genéticos imediatos e permanentes de acordo com as metodologias de Wright & Cockerham (1986) e Resende *et al.* (1995). Na Tabela 16 consta o resumo da análise de variância agrupada, de acordo com o delineamento em faixas, referente a 64 progênies M e respectivas irmãs S_1, as quais foram avaliadas em dois experimentos, com três repetições e cinco plantas por parcela.

De acordo com as esperanças dos quadrados médios foram estimadas as variâncias entre as progênies M e entre as progênies S_1, que correspondem às covariâncias C_{MM} e C_{SS}, respectivamente, bem como a covariância entre esses dois tipos de famílias, que equivale à covariância C_{SM}. As covariâncias entre as plantas mãe e as respectivas filhas (C_{AS} e C_{AM}) foram estimadas de modo usual. O importante é frisar que essas covariâncias já são de natureza genética, uma vez que os respectivos erros experimentais não são correlacionados, já que as plantas mãe foram avaliadas em condições experimentais independentes, como já enfatizado. Com base nos graus de parentesco envolvidos, esperava-se, em situação de equilíbrio, a seguinte ordem de grandeza: $\hat{C}_{SS} > \hat{C}_{SM} > \hat{C}_{MM}$. Entretanto, foi observado que, em relação ao caráter NP, a covariância $\hat{C}_{SS}$ foi menor que a covariância $\hat{C}_{MM}$ e $\hat{C}_{SM}$ e que nos demais caracteres a covariância $\hat{C}_{SM}$ foi menor que a $\hat{C}_{MM}$ com exceção do caráter PF. Verificou-se, ainda, que a covariância $\hat{C}_{SS}$ foi superior à covariância $\hat{C}_{MM}$, em relação a todos os caracteres, com exceção de NP, enquadrando-se ao esperado geneticamente, pois o aumento da endogamia resulta em um incremento na variância genética entre as progênies S_1. Contudo, em termos de magnitude, observou-se que as diferenças entre as progênies S_1 e M não foram tão acentuadas, provavelmente em decorrência de estas últimas apresentarem algum grau de endogamia devido ao próprio sistema misto de reprodução. Em relação às covariâncias entre as plantas maternas e as progênies S_1 e M, constatou-se que as estimativas estavam coerentes com o esperado em termos genéticos para todos os caracteres avaliados, exceto para NP, pois a covariância $\hat{C}_{AM}$ foi maior do que a covariância $\hat{C}_{AS}$ (Tabela 17).

Com base nas Expressões 23, 24 e 33 com as devidas substituições foram estimados os componentes da variância genética, cujos resultados constam na Tabela

TABELA 16. Resumo da análise de variância agrupada, de acordo com o delineamento em faixas e o modelo misto, dos caracteres de melancia produção de frutos por planta (PP), peso de fruto (PF), número de frutos por planta (NP), cor da polpa (C) e teor de sólidos solúveis (TS) com respectivas médias gerais.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		PP	PF	NP	CP	TS
Experimentos	1	1163,8108	9,0279	3,9144	16,5399	0,0709
Repetições/Exp.	4	213,9665	1,6229	91,1616	0,1559	2,5850
Famílias (P)/Exp	62	68,7637**	4,3247**	33,0839**	2,6574**	3,9910**
Resíduo *a*/Exp.	124	62,5580	0,5381	10,4325	0,2109	0,3137
Tipos Progênies (T)/Exp.	2	46,0351ns	5,2116**	58,0410ns	2,4236**	3,9652**
Resíduo *b*/Exp.	4	25,1535	0,2218	0,2861	0,0973	0,1520
Interação P x T	62	35,7665ns	0,8288**	10,0883 ns	0,6685**	1,1106**
Resíduo *c*/Exp.	124	30,8680	0,4380	11,6879	0,2134	0,2985
Desdobramento do efeito de famílias mais da interação P x T						
Progênies/M	63	59,7621**	1,8789**	23,5317**	1,5097**	1,8821**
Progênies/S_1	63	61,6817**	3,3466**	19,1155**	2,0436**	3,1688**
Resíduo *d*/Exp	248	46,7130	0,4881	11,0602	0,2122	0,3061
Médias						
Progênies M		17,18	3,15	7,89	3,45	7,27
Progênies S_1		16,24	3,47	6,82	3,25	7,53

Significativo ao nível de 1% de probabilidade (**),ao nível de 5% (*) e não significativo ao nível de 5% de probabilidade (ns), pelo teste F.
Fonte: Ferreira (2000)

18. Esses componentes foram estimados considerando-se duas situações: a) população em equilíbrio com endogamia, sendo consideradas as taxas $\hat{s}$ =0,235 e $\hat{F}=\hat{s}/(2-\hat{s})$=0,133 (Cockerham & Weir, 1984); b) população em desequilíbrio com endogamia, sendo consideradas as taxas obtidas pela análise molecular $\hat{s}$ =0,235 e $\hat{F}$=0,091 (Coelho & Vencovsky[8]).

Em geral, houve um predomínio das componentes V_A e D_2^*, o que é interessante para esquemas de seleção recorrente. Porém, ao comparar as estimativas das variâncias V_A com as das componentes D_1 e D_2^* em valor absoluto, verificou-se que, em relação ao caráter PP, a componente D_1 foi maior que a variância V_A e que na maioria dos caracteres, a variância D_2^* também foi superior à variância aditiva. A componente D_1 não foi desprezível, sendo negativa em todos os caracteres. Apesar dessa negatividade de D_1 ser esperada teoricamente, naturalmente é desinteressante para o melhorista, pois essa componente participa tanto do progresso genético imediato quanto do permanente, como visto. Quanto à componente de dominância (V_D), as estimativas também foram negativas e não desprezíveis em grandeza, na maioria dos caracteres, o que não é esperado geneticamente. Em relação à estimativa do

TABELA 17. Estimativas das covariâncias entre parentes referentes aos caracteres produção de frutos por planta (PP), peso de fruto (PF), número de frutos por planta (NP), cor da polpa (CP) e teor de sólidos solúveis (TS), avaliados em uma população mista de melancia.

Caracteres	$\hat{C}_{AS}$	$\hat{C}_{AM}$	$\hat{C}_{SS}$	$\hat{C}_{MM}$	$\hat{C}_{SM}$
PP	8,1597	7,4564	4,9896	4,3497	0,2179
PF	0,7493	0,5309	0,9529	0,4636	0,5660
NP	0,7589	3,4874	2,6851	4,1572	4,0418
CP	0,4356	0,3514	0,6105	0,4325	0,3319
TS	0,9995	0,7344	0,9542	0,5253	0,4790

Fonte: Ferreira (2000)

TABELA 18. Estimativas dos componentes quadráticos da variância genética, referentes aos caracteres produção de frutos por planta (PP), peso de fruto (PF), número de frutos por planta (NP), cor da polpa (CP) e teor de sólidos solúveis (TS), avaliados em uma população mista de melancia, considerando a situação em que a população se encontra em equilíbrio e desequilíbrio com endogamia e $V_D=H^*$.

Caracteres	$\hat{V}_A$	$\hat{V}_D$	$\hat{D}_1$	$\hat{D}_2^*$	$\hat{H}^2$
Considerando equilíbrio com endogamia					
PP	23,2454	4,1001	-40,6822	143,2905	2,1133
PF	0,9969	-0,7587	-0,2691	1,5184	0,5180
NP	9,1626	-16,0295	-1,3931	-8,8665	5,4812
CP	0,9488	-0,8074	-0,7116	2,9568	0,2012
TS	1,6492	-0,1835	-1,6561	5,9621	0,3429
Considerando desequilíbrio					
PP	21,0994	7,5478	-38,7612	144,0622	2,2797
PF	0,9898	-0,6669	-0,1858	1,2712	0,5588
NP	9,1400	-16,3341	-0,5700	-13,5233	5,9128
CP	0,8887	-0,6902	-0,5542	2,4732	0,2170
TS	1,5726	-0,0206	-1,5321	5,8060	0,3699

Fonte: Ferreira (2000)

[8]Coelho, A.S.G. (Universidade Federal de Goiás); Vencovsky, R. (Universidade de São Paulo). Comunicação pessoal, 2000.

componente H^2, os valores obtidos confirmam a existência de depressão endogâmica nessa população mista de melancia. Conforme mostrado na Tabela 18, o relaxamento da condição de equilíbrio de endogamia não trouxe grandes alterações nas estimativas das variâncias. Sob desequilíbrio, as estimativas de V_D foram ligeiramente menos negativas em todos os caracteres.

De acordo com as avaliações numéricas realizadas por Cockerham & Weir (1984), os valores das componentes D_1 e D_2^* são maiores do que aqueles referentes à variância V_A, somente quando a freqüência alélica (p) é superior a 0,9, ou seja, em casos extremamente raros e não compatíveis com a população mista de melancia estudada, como observado por Ferreira (2000). Esta população proveio de um híbrido intervarietal de genitores contrastantes e assim dificilmente poderia ter predomínio de locos com freqüências alélicas tão elevadas. Nessas avaliações numéricas foi verificado, ainda, que as componentes D_1 e D_2^* são iguais a zero apenas quando a freqüência alélica é igual a 0,5 em todos os locos (ou $\bar{p} = 0,5$) resultados não verificados no presente estudo, uma vez que essas componentes foram diferentes de zero. Pereira (1989) e Crisóstomo (1989), também verificaram valores absolutos de D_1 e D_2^* superiores aos das variâncias aditivas, assim como estimativas negativas de D_1. No estudo de Crisóstomo (1989), além disso também foram observados valores negativos das estimativas das componentes V_A, em alguns caracteres.

Diante dos resultados obtidos e mediante as comparações efetuadas, foi verificado que não houve adequação dos modelos estudados aos dados experimentais obtidos. Essa não adequação dos modelos, não pode ser detectada com precisão, porém acredita-se que alguns fatores podem ter causado essa inadequação, como por exemplo: a) a variação observada nas estimativas das taxas t ou s entre as plantas andromonóicas e monóicas; b) o fato de as plantas mãe terem sido avaliadas em um ano diferente do das filhas, bem como a tomada de dados em apenas uma planta, resultando em um sistema de equações composto por covariâncias que apresentam menor grau de interações com ano (covariâncias mães-filhas) e por outras que contêm essa interação (covariâncias entre irmãs), além do que os erros associados aos dados das mães serem mais elevados; c) a existência de colinearidade na matriz dos coeficientes X do sistema de equações que resulta em má conformação da mesma e conseqüentemente em problemas na estimação dos parâmetros.

Em relação as estimativas dos progressos genéticos, imediatos e permanentes (Tabela 19), devem ser consideradas com cautela e apenas como referencial para o melhoramento, em decorrência da inadequação comentada anteriormente. Para exemplificar o cálculo dessas estimativas, considere-se o caráter TS. A estimativa do progresso genético imediato com base na metodologia de Resende *et al.* (1995), foi igual a:

$$\hat{G}s_I = K \times \frac{C_{MM}}{\sqrt{V_{FM}}} = 1,4\,\frac{0,5253}{\sqrt{0,6274}} = 0,93 \qquad (39)$$

ou

$$\hat{G}s_I\,(\%) = \frac{Gs_I}{\bar{X}_M}\,100 = \frac{0,93}{7,27}\,100 = 12,8\,\% \qquad (40)$$

sendo:

K = a intensidade de seleção; foi considerada uma intensidade de seleção de 20%, de mdo que K = 1,4;

$\bar{X}_M$ = média das progênies M.

V_{FM}= variância fenotípica entre as médias das progênies maternas (M), estimada por:

$$V_{FM} = \frac{QM_M}{r} = \frac{1,8821}{3} = 0,6274 \quad (41)$$

Já a estimativa do progresso genético permanente com base na metodologia de Wright & Cockerham (1986), considerando, por exemplo, a seleção e recombinação de progênies M, foi obtida pela expressão:

$$Gs_{P(M,M)} = K \times \frac{[(1+s)^2/2(2-s)]V_A + [s(1+s)^2(3-s)/2(2-s)^2]\hat{D}_1 + [s^2(1+s)^2/4(2-s)^2]\hat{D}_2^*}{\sqrt{V_{FM}}} \quad (42)$$

cujos coeficientes dos componentes da variância genética constam na Tabela 12.

Os caracteres PF, NP, CP e TS apresentaram ganhos genéticos imediatos superiores a 10%, ao passo que no caráter PP esse progresso foi de 8%. É bom lembrar que o progresso genético imediato corresponde ao ganho na geração imediatamente após a seleção, podendo ser perdido com o avanço das gerações de seleção. Em relação ao progresso genético permanente também foram observados ganhos positivos em relação a todos os caracteres avaliados. Ao ser considerada a seleção e recombinação de progênies M, todos os caracteres apresentaram ganhos superiores a 12%. Enquanto que o progresso genético permanente estimado com base na seleção de progênies M, porém com recombinação de progênies S_1, foi superior em relação ao ganho relatado anteriormente, pois para todos os caracteres foram

TABELA 19. Estimativas do progresso genético imediato conforme metodologia de Resende *et al.* (1995), considerando seleção e recombinação de progênies M e do progresso genético permanente de acordo com Wright & Cockerham (1986), considerando seleção entre progênies M, com recombinação de sementes remanescentes M ou S_1, em relação aos caracteres produção de frutos por planta (PP), peso de fruto (PF), número de frutos por planta (NP), cor da polpa (CP) e teor de sólidos solúveis (TS), avaliados em uma população mista de melancia.

Caracteres	Média (M)	$\hat{G}s_{I(M,M)}$[1]		$\hat{G}s_{P(M,M)}$[2]		$\hat{G}s_{P(M,S)}$[2]	
		Gs	*Gs* (%)	*Gs*	*Gs* (%)	*Gs*	*Gs* (%)
PP	17,19	1,36	7,9	1,42	18,3	3,95	23,0
PF	3,15	0,82	26,1	0,70	22,4	1,20	38,2
NP	7,89	2,08	26,3	1,84	23,3	3,07	38,9
CP	3,45	0,85	24,8	0,63	18,1	1,19	34,6
TS	7,27	0,93	12,8	0,87	11,9	1,78	24,5

[1]Progresso imediato (Resende *et al.*, 1995); [2]Progresso permanente (Wright & Cockerham, 1986). Fonte: Ferreira (2000)

verificados ganhos superiores a 23%, como era de se esperar. Pode-se dizer que os ganhos calculados, mesmo sendo aproximados, são animadores para um programa de melhoramento por seleção recorrente na população mista de melancia. Quanto ao viés dessas estimativas de ganho, não é simples fazer comentários concretos. Sabe-se que no procedimento de Resende *et al.* (1995) as estimativas tendem a ser conservadoras (ganho real maior do que o estimado), mas nesse procedimento foi considerado que as populações estavam em equilíbrio de endogamia. Em geral, o sinal do viés nesse caso, se positivo ou negativo, dependerá do parentesco prevalecente entre as unidades de seleção, de recombinação e as plantas no ciclo seguinte; e isso é difícil de mensurar em casos específicos como este.

As estimativas dos progressos genéticos permanentes foram positivas em virtude da magnitude da componente aditiva (V_A) detectada e pela importância dessa componente na covariância genética responsável pelo ganho seletivo. Convém lembrar que progressos permanentes negativos podem ocorrer, como por exemplo observado por Crisóstomo (1989), em decorrência da negatividade e magnitude relativa da componente D_1. Em torno desse assunto, para se ter uma idéia, no caso de seleção e recombinação de progênies M, a participação de cada uma das componentes da variância genética no ganho é, na condição de equilíbrio e $\hat{s} = 0{,}235$, de 0,4321 V_A, 0,1591 D_1 e 0,0068 D_2^*. Na situação de seleção baseada em progênies M, com recombinação de sementes remanescentes S_1, essas participações são: 0,6997 V_A, 0,1288 D_1 e 0,0109 D_2^*. Percebe-se claramente o predomínio da variância V_A.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A exposição feita neste capítulo, baseada em fundamentos teóricos e em exemplos de aplicação, foi suficiente para realçar alguns aspectos que são do interesse direto do melhorista de plantas.

As populações mistas têm uma estrutura genética mais complexa do que as alógamas e autógamas, uma vez que são formadas por indivíduos que apresentam diferentes níveis de endogamia. Além disso, em condições naturais, a taxa de autofecundação ou de fecundação cruzada varia entre os indivíduos e ao longo das gerações, o que conflita com o modelo genético disponível para estudar tais populações. Outro ponto importante consiste no fato de essas populações atingirem o equilíbrio lentamente. Estes aspectos levam a uma série de conseqüências tanto para o melhoramento genético quanto na estimação de parâmetros quantitativos.

No que diz respeito à condução de programas de melhoramento é evidente a necessidade de evitar contaminação genética durante a execução de processos seletivos, bem como na multiplicação de cultivares, devendo-se isolar criteriosamente as estruturas florais, tal como se procede no caso do melhoramento de populações alógamas. Esses cuidados também devem ser respeitados na multiplicação e regeneração de acessos de germoplasma.

Na obtenção e lançamento de cultivares de polinização aberta é preciso levar em conta que as populações mistas devem estar em equilíbrio com respeito ao sistema reprodutivo (equilíbrio de Wright), o que requer um número maior de gerações de reprodução natural do que as alógamas. Caso isto seja desconsiderado, essas cultivares poderão se descaracterizar geneticamente ao longo das gerações o que pode ocasionar

perdas em relação aos caracteres de importância econômica. É conveniente lembrar que cultivares constituídas de mistura de linhagens endogâmicas não estão em equilíbrio de Wright.

Em termos de estimação de parâmetros quantitativos foi visto que existem dificuldades adicionais, em comparação com as alógamas e autógamas, tais como: a) a necessidade de obter estimativas consistentes da taxa de autofecundação ou de fecundação cruzada; b) o fato de o modelo genético disponível pressupor que a população está em equilíbrio e que a taxa de autofecundação é constante entre os indivíduos e ao longo das gerações; c) a existência de colinearidade na matriz X dos coeficientes no sistema de equações, devido, em parte, à própria natureza de algumas componentes da variância genética.

No caso dos delineamentos genéticos que envolvem medidas fenotípicas das plantas mãe, o sistema de equações será composto por estimativas de covariâncias influenciadas em grau diferente pela interação genótipos x ambientes, além de estas medidas conterem erros experimentais mais elevados, principalmente em caracteres de baixa herdabilidade.

As dificuldades mencionadas comprometem a estimação dos componentes da variância genética e conseqüentemente do progresso genético. Isso é ainda mais patente se for considerado que, além da variância aditiva, é necessário estimar outros componentes, como por exemplo D_1 e D_2^*, que tem participação importante no progresso permanente com a seleção recorrente.

Pelo exposto, torna-se essencial a determinação consistente da taxa de autofecundação e do coeficiente de endogamia das populações mistas que se pretende explorar. Nesse caso, o emprego de marcadores genéticos bioquímicos ou moleculares, de fácil aplicação e de baixo custo, constitui uma ferramenta preponderante em virtude de possibilitar a quantificação desses parâmetros populacionais. Entretanto, existe a necessidade de aprimorar os modelos e programas computacionais disponíveis para tal fim.

Outro ponto crucial é ampliar ainda mais a abrangência do modelo genético de modo que possibilite o estudo de populações em desequilíbrio e que inclua delineamentos genéticos mais próximos da realidade do melhorista, isto é, que envolva progênies de fácil obtenção. Contornar esses problemas será uma grande contribuição para a genética quantitativa de populações mistas.

Apesar dessas desvantagens e limitações discutidas, as populações mistas têm outras propriedades que são positivas para o melhoramento genético. Uma dessas propriedades consiste no fato de a ocorrência natural tanto de cruzamentos quanto de autofecundações proporcionar, naturalmente, a recombinação e a redução da carga genética. Isso possibilita a seleção de indivíduos segregantes para caracteres de interesse que apresentam pouco ou nenhuma depressão endogâmica. Como é sabido, nas populações alógamas a recombinação é maximizada, porém a depressão tende a ser alta. Nas autógamas, por outro lado, não ocorre depressão em decorrência da endogamia, mas a recombinação só é possível através de polinizações artificiais.

Outro aspecto vantajoso das populações mistas é permitir duas opções ao melhorista na elaboração de suas estratégias. Dependendo da magnitude da taxa de autofecundação é possível dirigir o programa tanto para uma seleção recorrente como

para obtenção de linhagens homozigóticas. Fica evidente, dessa forma, que o melhorista precisa conhecer a grandeza da taxa *s*. Caso essa taxa seja elevada haverá dificuldade de recombinações naturais, o que afetará a resposta à seleção em ciclos subseqüentes, pois a variabilidade poderá ser reduzida ou exaurida após alguns ciclos seletivos. Em tal situação, será mais vantajoso ter como objetivo principal a obtenção de linhagens endogâmicas, para compor uma variedade multilinha, desde que respeitada a questão do equilíbrio de Wright. Por outro lado, se a taxa *s* for baixa, isso favorecerá a ocorrência de recombinações naturais e permitirá a manutenção do ganho genético ao longo dos ciclos seletivos, podendo o melhorista optar por um programa de seleção recorrente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Principios do melhoramento genético das plantas cultivadas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 381p.

ALLARD, R.W.; JAIN, S.K.; WORKMAN, P.L. Genetics of inbreending populations. **Advances in Genetics**, v.14, p.55-131, 1968.

ANTONOVICS, J. Evolution in closely adjacent plant populations. V. Evolution of self-fertility. **Heredity**, v.23, p.219-238, 1968.

ASSIS, J.G. de A. Caracterização isoenzimática e variabilidade genética de populações de melancia (*Citrullus lanatus*) do nordeste brasileiro. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 76p. Tese, Doutorado.

ASSIS, J.G. de A. Estudos genéticos no gênero Citrullus. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1994. 99p. Dissertação, Mestrado.

BORGES, R.M.E.; FERREIRA, M.A.J. da F.; QUEIRÓZ, M.A. de; VENCOVSKY, R. Avaliação da expressão sexual em uma população base de melancia originada do cruzamento interpopulacional entre P14 e Crimson Sweet. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 14., Recife, 1999. **Resumos**. Recife: SBG, 1999. p.68.

BROW, B.A.; CLEGG, M.T. Influence of flower color polymorphism on genetic transmission in a natural population of the common morning glory, Ipomoea purpurea. **Evolution**, v.38, p.796-803, 1984.

CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **BioScience**, v.30, p.814-818, 1980.

COCKERHAM, C.C. Additive by additive variance with inbreeding and linkage. **Genetics**, v.108, p.487-500, 1984.

COCKERHAM, C.C. Estimation of genetic variances. In: HANSON, W.D.; ROBINSON, H.F. (Ed.) **Statistical genetics and plant breeding**. Washington: National Academy of Sciences, 1963. (NAS-NRC Publication 982)

COCKERHAM, C.C. Higher order probability functions of identity of alleles by descent. **Genetics**, v.69, p.235-246, 1971.

COCKERHAM, C.C.; MATZINGER, D.F. Selection response based on selfed progenies. **Crop Science**, v.25, p.483-488, 1985.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. **Biometrics**, v.40, p.157-164, 1984.

CRISÓSTOMO, J.R. Avaliação da estrutura e do potencial genético de uma população de algodoeiro (*G.hirsutum* L.) parcialmente autógama. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 191p. Tese, Doutorado.

DIAS, R. de C.S.; QUEIRÓZ, M.A. de; MENEZES, M. Fontes de resistência em melancia a *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.15-18, 1996.

ENNOS, R.A.; CLEGG, M.T. Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. **Heredity**, v.48, p.283-292, 1982.

EPPERSON, E.; CLEGG, M. Frequency-dependent variation for outcrossing rate among flower-color morphs of *Ipomoea purpurea*. **Evolution**, v.41, p.1302-1311, 1987.

FERREIRA, M.A.J. da F. Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento genético de uma população de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. Piracicaba: ESALQ/USP, 2000. 148p. Tese, Doutorado.

FERREIRA, M.A.J. da F.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C.; QUEIROZ, M.A. de. Outcrossing rate and implications for the improvement of a segragating population of watermelon. **Acta Horticulturae**, n.510, p.47-54, 2000.

FERREIRA, M.A J. da F. Análise dialélica em melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1996. 75p. Dissertação, Mestrado.

FERREIRA, M.A.J. da F.; BRAZ, L.T., QUEIRÓZ, M.A. de. Expressão Sexual em Melancia (*Citrullus lanatus* Thunb Mansf.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 35.; CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HORTICULTURA, 7., Foz do Iguaçu, 1995. **Resumos**. Foz do Iguaçu: SOB, 1995. p.81.

FISHER, R.A. The correlations between relatives on the supposition of mendelian inheritance. **Transation of Royal Society of Edinburg**, v.52, p.399-433, 1918.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination mechanisms, reprodution and plant breeding**. Berlin:Springer-Verlag, 1977. 281p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG; CNPq, 1993. 64p.

GAIOTTO, F.A. Estimativa de recombinação e estrutura genética em uma população de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* com marcadores RAPD e AFLP. Botucatu: FCA/UNESP, 1996. 91p. Dissertação, Mestrado.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoetical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849, 1997.

GHAI, G.L. Covariances among relatives in populations under mixed self-fertilization and random mating. **Biometrics**, v.38, p.87-92, 1982.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468p.

HARRIS, D.L. Gonotipic covariances between inbred relatives. **Genetics**, v.50, p.1319-1348, 1964.

KEMPTHORNE, O. **An introduction to genetic statistics**. New York: Wiley, 1973. 545p.

KEMPTHORNE, O. The correlations between relatives in random mating populations. **Proceedings of Royal Society of London**, v.143, p.103-113, 1954.

KEMPTHORNE, O. The correlation between relatives in inbred populations. **Genetics**, v.40, p.681-691, 1955a.

KEMPTHORNE, O. The theoretical values of correlations between relatives in random mating populations. **Genetics**, v.40, p.153-167, 1955b.

KEMPTHORNE, O.; FOLKS, L. **Probability, statistics, and data analysis**. Ames: The Iowa States University Press, 1971. 555p.

LANDE, R.; SCHEMSKE, D.W. The evolution of sef-fertilization and inbreeding depression in plants; I. Genetic models. **Evolution**, v.39, p.24-40, 1985.

MIRANDA FILHO, J.B. Avaliação teórica do potencial genético de um método de seleção de híbridos. Piracicaba: ESALQ/USP, 1978. 93p. Tese, Livre-Docência.

PEREIRA, M.B. Progresso imediato e fixação de genes em um método de seleção. Piracicaba: ESALQ/USP, 1980. 125p. Dissertação, Mestrado.

PEREIRA, M.B. Comparação de métodos de seleção em populações parcialmente autógamas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 149p. Tese, Doutorado.

PEREIRA, M.B.; VENCOVSKY, R. Limites da seleção recorrent: I. Fatores que afetam o acréscimo das freqüências alélicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.769-780, 1988.

PEREIRA, M.B.; VENCOVSKY,R.; FREIRE, E.C. Número de gerações necessário para uma população de sistema reprodutivo intermediário atingir o equilíbrio. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 38., Curitiba, 1986. **Resumos**. Curitiba, 1986. p.919.

QUEIRÓZ, M.A. de. Cucurbitáceas no semi-árido do Nordeste brasileiro: resgate, conservação e uso. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 15., Piracicaba, 1998. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, USP, 1998. p.1-12.

QUEIRÓZ, M.A. de. Potencial de germoplasma de cucurbitáceas no nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.7-9, 1993.

QUEIRÓZ, M.A. de; DIAS, R. de C.S.; SOUZA, F. da F; FERREIRA, M.A.J. da F.; ASSIS, J.G. de A.; BORGES, R.M.E.; ROMÃO, R.L.; RAMOS, S.R.R.; COSTA, M.S.V.; MOURA, M. de C.C.L. Recursos genéticos e melhoramento de melancia no nordeste brasileiro. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticose Biotecnologia, 1999. <http:\\www.cpatsa.embrapa.br>

QUEIROZ, M.A. de; DIAS, R. de C.S.; SOUZA, F. de F.; FERREIRA, M.A.J. da F.; BORGES, R.M.E. Watermelon breeding in Brazil. **Acta Horticulturae**, n.510, p.105-112, 2000.

QUEIRÓZ, M.A. de; ROMÃO, R.L.; DIAS, R. de C.S.; ASSIS, J.G. de A.; BORGES, R.M.E.; FERREIRA, M.A.J. da F.; RAMOS, S.R.R.; COSTA, M.S.V.; MOURA, M. de C.C.L. Watermelon germplasm bank for the Northeast of Brazil. An integrated approach. In: THE EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETICS AND BREEDING, 6., Malaga, 1996. **Proceedings**. Malaga: European Association for Research on Plant Breeding, 1996. p.97-103.

RAMALHO M.A.P. Eficiência relativas de alguns processos de seleção intrapopulacional no milho baseados em famílias não endógamas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1977. 122p. Tese, Doutorado.

RAWLINGS, J.O. **Applied regression analysis**. Pacific Grove: Wadswotlth, 1988. 653p.

RESENDE, M.D.V. de; VENCOVSKY, R.; FERNANDES, J.S.C. Selection and genetic in populations of *Eucalyptus* with mixed mating system. In: CONFERENCE ON EUCALYPT PLANTATIONS: IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. **Anais**. Hobart: IUFRO, 1995. p.191-193.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. London: George allen & Unwin, 1986.

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v.81, p.235-237, 1990.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using *n* independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

ROMÃO, R.L. Dinâmica evolutiva e variabilidade de populações de melancia *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. em três regiões do nordeste brasieiro. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 75p. Dissertação, Mestrado.

RONFORT, J.; COUVET, D. A stochastic model of selection on selfing rates in structured populations. **Genetical Research**, v.65, p.209-222, 1995.

ROSS, H.A. Estimation of mating system parameters in plant populations using marker loci with null alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.322-327, 1986.

SCHEMSKE, W. D.; LANDE, R. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants: II. Empirical observations. **Evolution**, v.39, p.41-52, 1985.

SCHOEN, D. J.; CLEGG, M.T. Monte Carlo studies of plant mating system estimation models: the one-pollen parent and mixed mating models. **Genetics**, v.112, p.927-945, 1986.

SCHOEN, D.J.; CLEGG, M.T. Estimation of mating system parameters when outcrossing events are correlated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p.5258-5262, 1984.

SHAW, D.V.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, p.1298-1302, 1981.

SOUZA JR., C.L. Variabilidade genética em milho (*Zea mayz* L.) e relações com a seleção recorrente intra e interpopulacional. Piracicaba: ESALQ/USP, 1983. 151p. Tese, Doutorado.

STEBBINS, G L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia University Press, 1957. 633p.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Two-locus theory in quantitative genetics. In: POLLAK, E.; KEMPTHORNE, O.; BAILEY JR., T.B. (Ed.) **Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics**. Ames: Iowa State University Press, 1977. p.247-269.

WELL, H. Self-fertiliation; advantageous or deleterious? **Evolution**, v.33, p.252-255, 1979.

WRIGHT A.J.; COCKERHAM, C.C. Selection with partial selfing: I. Mass Seletion. **Genetics**, v.109, p.585-597, 1985.

WRIGHT A.J.; COCKERHAM, C.C. Selection with partial selfing: II. Family Seletion. **Crop Science** v.26, p.261-268, 1986.

WRIGHT, S. Coeficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, v.56, p.330-338, 1922.

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v.6, p.111-178, 1921.

11

MELHORAMENTO DE ESPÉCIES DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

AFONSO CELSO CANDEIRA VALOIS[1]
JOÃO RODRIGUES DE PAIVA[2]
FRANCISCO RICARDO FERREIRA[3]
WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO[4]
JORGE LUIZ LOYOLA DANTAS[4]

[1]Embrapa Sede, C.P. 040315 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.
[2]Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita, 2.270, Bairro Pici - CEP: 60511-110 - Fortaleza, CE.
[3]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 0232 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.
[4]Embrapa Mandioca e Fruticultura, R. Embrapa, s/n - CEP: 44380-000 - Cruz das Almas, BA.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas envolve um conjunto de procedimentos, com fundamentação científica, visando a alteração de características das cultivares, de modo que os novos genótipos obtidos possibilitem aumento na produtividade e qualidade do produto final. Dentre os objetivos pretendidos destacam-se o aumento da produtividade e qualidade do produto agrícola, tolerância ao estresse hídrico, adaptação a elevados teores de elementos tóxicos no solo, tolerância/resistência a doenças, tolerância a pragas, redução do porte das plantas, precocidade de produção, mudanças no comprimento do ciclo de frutificação, de modo que o resultado final signifique maior lucratividade para o investidor e maior satisfação para o consumidor.

Embora a conceituação do melhoramento genético como a arte e a ciência de transformar geneticamente as plantas em proveito do homem, com o avanço do conhecimento da genética, juntamente com outras ciências relacionadas, como a botânica, estatística, bioquímica, citogenética, fisiologia, fitopatologia, ciências do solo, entre outras, o melhoramento tornou-se, na verdade, mais ciência e menos arte. A habilidade do melhorista *per se*, entretanto, não deve ser negligenciada, principalmente no tocante a uma rápida identificação da diversidade e escolha dos indivíduos que, a partir de um competente planejamento científico e da correta manipulação e direcionamento das características herdáveis de interesse, possam permitir que se alcance, de forma segura, o estabelecimento de novas variedades.

O conjunto de conhecimentos, métodos e técnicas desenvolvidos ou aperfeiçoados no século XX na área de melhoramento genético propiciou avanços espetaculares na modificação das plantas, tanto em relação a espécies de ciclo curto como perenes. Particularmente em alguns casos, a exemplo do que ocorre com as espécies perenes, a carência de informações é função do reduzido número de melhoristas envolvidos, do longo ciclo reprodutivo, do pouco tempo dedicado a atividades diretamente relacionadas ao melhoramento genético em si e da conseqüente escassez de resultados alcançados.

Muitas espécies vegetais podem ser propagadas vegetativamente, possibilitando a fiel multiplicação de seus genótipos. Suas variedades em geral são altamente heterozigóticas e quando em reprodução sexual exibem ampla segregação. Na natureza, esta estratégia tem vantagens adaptativas, principalmente na colonização de novos ambientes, onde indivíduos que possuem combinações genéticas favoráveis podem rapidamente ocupar esses nichos ecológicos. Na propagação comercial, a clonagem de uma variedade também se distingue por sua inquestionável importância, não obstante a existência de riscos devidos à uniformidade genética.

A propagação assexuada via semente, ou seja, a obtenção de clones nucelares, tem uma importância muito grande, principalmente na cultura dos citros, onde é possível obter plantas clonadas (nucelares) livres de viroses como a sorose, exocorte e xiloporose.

2. MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

A propagação vegetativa ou assexuada é de grande importância para a fixação do conteúdo genético das plantas, pois possibilita a formação de clones. Um clone pode ser definido como um conjunto de indivíduos geneticamente uniforme, derivado de uma só planta e que se propaga de modo exclusivo por meios vegetativos, tais como estacas, garfos e gemas, entre outros. Plantas de um mesmo clone são, portanto, geneticamente idênticas entre si e à planta que lhes deu origem.

No caso específico de fruteiras propagadas vegetativamente, o melhoramento genético vem sendo realizado universalmente há muito tempo. Porém, em grande parte das espécies, a maioria das variedades cultivadas é oriunda de seleção da variabilidade existente na natureza ou de seleção clonal e não de programas de melhoramento convencional por hibridação, a exemplo do que se verifica em abacaxi (*Ananas comosus*), banana (*Musa* spp.), citros (*Citrus* spp., *Poncirus* sp., *Fortunella* spp., *Microcitrus* spp., *Eremocitrus* sp., *Clymenia* sp.), manga (*Mangifera indica*), entre outras fruteiras. Mourão Filho (1997) explica que a heterozigose, poliploidia, perda de vigor por hibridação, poliembrionia nucelar ocasionada pela apomixia, auto e interincompatibilidade e longo período juvenil são citados como principais dificuldades encontradas no melhoramento convencional dessas espécies. No entanto, o desenvolvimento e a incorporação de novas técnicas - biotecnológicas - vêm contribuindo para superar essas limitações.

Entre os principais processos de propagação vegetativa comercial em plantas perenes destacam-se a alporquia, a estaquia e a enxertia.

A alporquia ou mergulhia aérea consiste em envolver parte de um ramo da planta com um invólucro contendo substrato apropriado, visando induzir a formação de raízes. Após a formação destas, o segmento de ramo submetido a esse tratamento é cortado, passando a constituir uma nova planta. Trata-se de um processo de multiplicação vegetativa bastante rudimentar, usado em espécies frutícolas e ornamentais. Permite reproduzir fielmente as características da planta matriz desde que o ramo utilizado não tenha sofrido mutação.

A propagação por estacas baseia-se na capacidade de regeneração dos tecidos e na emissão de raízes. A estaca, contendo no mínimo uma gema, é destacada da planta-mãe e colocada em substrato adequado ao seu enraizamento. As estacas podem ser obtidas de órgãos aéreos (folhas e ramos herbáceos ou lenhosos) ou subterrâneos (raízes).

A enxertia é um processo de propagação que consiste em se obter uma planta a partir da combinação de partes de duas plantas distintas denominadas de enxerto e porta-enxerto. A gema ou garfo retirado da planta que se pretende propagar é justaposto ao porta-enxerto, de modo a originar, após o pegamento, uma nova planta. O porta-enxerto fornece o sistema radicular e a gema ou garfo a parte aérea da nova planta. Em espécies perenes os métodos de enxertia por borbulhia e garfagem são os mais utilizados. Existem muitas variações de tipos de enxertia para cada um desses métodos, visando uma melhor adaptação a cada espécie em particular.

Os diferentes métodos de propagação vegetativa de plantas, além de permitirem a manutenção das características genéticas da planta matriz, via de regra reduzem o porte da planta, promovem a precocidade e uniformidade de frutificação e possibilitam a renovação e/ou recuperação de plantas senis, debilitadas ou doentes.

3. VARIABILIDADE GENÉTICA

A fonte básica da variabilidade genética disponível ao melhoramento de plantas cultivadas relaciona-se, em princípio, a cultivares primitivas ou avançadas e aos ancestrais selvagens das espécies comerciais. O entendimento da forma como essa variabilidade se distribui entre os diversos grupos populacionais, em seus habitats naturais, é necessário como "ferramenta" auxiliar nos trabalhos de melhoramento genético.

O melhoramento, por sua vez, está intimamente correlacionado com a variabilidade genética, que tem papel fundamental nos programas de cruzamento e seleção de genótipos melhorados.

O Brasil com suas dimensões continentais, aliadas a uma ampla diversidade edafoclimática, tem contribuído com parcela relevante da base de variabilidade genética de diversas culturas. A Tabela 1 mostra os centros de diversidade genética de espécies frutíferas que se destacam por seu valor comercial, de acordo com dados compilados de Zohary (1970) e Giacometti & Ferreira (1987), onde o Brasil aparece como centro de origem de frutas como o abacaxi (*Ananas comosus*), caju (*Anacardium occidentale*), goiaba (*Psidium guajava*) e maracujá (*Passiflora* spp.).

A domesticação de plantas é o resultado da inteligência humana em conduzir o processo evolutivo dirigido ao habitat que o homem criou (Ford-Lloyd & Jackson, 1986). Durante o processo de domesticação, as plantas cultivadas, diferentemente dos sistemas naturais, tornaram-se dependentes do homem para sua reprodução e desenvolvimento.

A variabilidade genética era inicialmente explorada pela intuição. Com base nos conhecimentos acumulados ao longo de gerações, este patrimônio genético passou a ser cada vez mais utilizado, o que provocou amplas mudanças fenotípicas, de maneira que as plantas atendessem as necessidades do homem (Wet & Harlan, 1975).

A estrutura populacional de uma espécie, isto é, o conjunto de suas características genéticas, é o resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (Martins, 1987). Atualmente, os estudos desenvolvidos nessa área consideram os princípios teóricos da genética de populações, relativos às alterações de freqüências alélicas e genotípicas, associados aos princípios teóricos da ecologia de populações, que se preocupam em entender as relações de causa e efeito na regulação do número de indivíduos. Portanto, é essencial a obtenção de dados sobre a estrutura e comportamento reprodutivo das populações, pois os padrões de distribuição da variabilidade genética estão correlacionados com os sistemas reprodutivos.

Por outro lado, conforme Kageyama (1987), a tentativa de sistematização das avaliações de variabilidade genética em populações naturais de espécies de plantas, usando o avanço de técnicas bioquímicas, principalmente de eletroforese, tem permitido uma melhor interpretação da estrutura genética das populações. Evidentemente que também é necessária a canalização de esforços nos estudos conduzidos em ambientes tropicais, visando ao entendimento das complexas interações existentes entre as plantas e o meio ambiente.

Em contraste com as populações naturais, as cultivares modernas são extremamente uniformes. Neste contexto, se por um lado a cultivar responde em termos de maior produtividade, por outro seu valor adaptativo fica comprometido,

TABELA 1. Centros mundiais de diversidade genética de espécies frutíferas.

CENTROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA	ESPÉCIE FRUTÍFERA
Centro Chinês	Damasco - *Prunus armeniaca*
	Pêssego - *P. persica*
	Laranja - *Citrus sinensis*
Centro Asiático Central	Pera - *Pyrus comunis*
	Maçã - *Malus domestica*
	Noz - *Juglans regia*
Centro Asiático Oriental (Japão)	Caqui - *Diospyros kaki*
	Nêspera - *Eriobotria*
Centro Indo-Malaio	Toranja - *Citrus maxima*
	Limão-galego - *C.aurantifolia*
	Tangerina - *C. reticulata*
	Banana - *Musa acuminata*
	Banana - *M. balbisiana*
	Coco - *Cocos nucifera*
	Manga - *Mangifera indica*
Centro Oriente Médio	Amêndoa - *communis*
	Figo - *Ficus carica*
	Uva - *Vitis vinifera*
	Pistáquio - *Pistacia vera*
	Damasco - *Prunus armeniaca*
Centro Mediterrâneo	Oliveira - *Olea europea*
	Tâmara - *Phoenix dactilifera*
Centro Norte-americano	Uva 'Izabel' - *Vitis labrusca*
	Pecã - *illinoensis*
Centro Meso-americano	Abacate - *Persea americana*
	Sapoti - Manilkara sapota
	Pinha - *Annona squamosa*
	Graviola - *A. muricata*
Centro Sul-americano (Brasil, Paraguai e Andes)	Abacaxi - *Ananas comosus*
	Cherimoia - *Annona cherimoia*
	Pupunha - Bactris gasipaes
	Mamão - *Carica papaya*
	Cupuaçu - *Theobroma grandiflorum*
	Goiaba - *Psidium guajava*
	Jabuticaba - *Myrciaria cauliflora*
	Maracujá - *Passiflora edulis*
	Lulo - *Solanum quitoense*
	Caju - *Anacardium occidentale*

Fonte: Zohary (1970) e Giacometti & Ferreira (1987)

devido a uma maior vulnerabilidade a mudanças ambientais, embora a diversidade de ambientes ocupados pelas cultivares modernas seja maior que aquela dos ambientes relacionados aos centros de origem da espécie.

Uma das alternativas para contornar os problemas advindos de alterações bruscas de ambiente, durante o período de cultivo, que podem destruir parcial ou totalmente uma cultura uniforme, é o uso de variedades sintéticas e multilíneas (Jensen, 1952), que são fenotipicamente uniformes, porém geneticamente heterogêneas, podendo essa mistura de genótipos suportar variações de ambientes de modo mais efetivo do que as cultivares normais.

O conhecimento e entendimento dos padrões de formação e distribuição da variabilidade genética, podem ser utilizados no melhoramento genético de algumas espécies que já foram ou estão sendo domesticadas. Cabe destacar que em um programa de melhoramento genético uma das primeiras etapas é a definição do critério de seleção, sendo que a intensidade e extensão da seleção dependem do padrão de variabilidade existente entre e dentro de populações.

4. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Do ponto de vista do melhoramento genético de plantas a propagação vegetativa oferece vantagens e desvantagens para o melhorista. A maior vantagem é que, em qualquer fase de um programa de melhoramento, plantas que apresentem características favoráveis, tanto de ordem qualitativa como quantitativa, podem ser fixadas geneticamente e, a partir daí, reproduzidas indefinidamente. Por outro lado, esta vantagem, de certo modo, induz o melhorista à procura constante de um ideotipo de planta para, então, fazer sua clonagem. Este procedimento, comumente, induz o melhorista ao não aproveitamento de níveis intermediários relativamente à expressão de características de difícil mensuração, além do que a perda de variabilidade genética na população trabalhada é muito grande.

Para algumas espécies vegetais a propagação vegetativa apresenta vantagens em relação à propagação sexuada, por ser um processo rápido, de mais fácil aplicação e, algumas vezes, mais econômico. A propagação vegetativa, além de reproduzir exatamente as características genéticas de um dado indivíduo, pode permitir a multiplicação, em larga escala, de qualquer genótipo que tenha características desejáveis sob o ponto de vista do melhoramento genético.

O melhoramento clonal, exclusividade das espécies que se propagam vegetativamente, via de regra, explora o vigor heterótico de híbridos oriundos tanto de cruzamentos artificiais como naturais. A fixação dessas combinações genéticas favoráveis é facilitada pelo processo de propagação vegetativa da espécie, agilizando a obtenção de ganhos genéticos independentemente do método de melhoramento utilizado, constituindo-se em uma grande vantagem em espécies de ciclo longo.

As espécies que possuem ambos os sistemas de reprodução, sexuado e assexuado, oferecem vantagens adicionais ao melhorista na exploração dos mesmos. Esta situação é bastante evidente no caso dos citros, grupo de plantas no qual muitas variedades comerciais, a par da possibilidade de utilização em hibridações controladas, apresentam sementes poliembriônicas, que originam indivíduos apogâmicos, de origem nucelar, geneticamente idênticos, portanto, à planta-mãe. A respeito do melhoramento genético dos citros, Soares Filho *et al.* (1997) enfatizam a importância do emprego de técnicas biotecnológicas, envolvendo diversas áreas do conhecimento científico – fisiologia, biologia molecular, cultura de tecidos, entre outras – no sentido de agilizar a obtenção de resultados finais consistentes, quais sejam, novas variedades. Essa estratégia pode ser adotada no melhoramento de outras espécies, particularmente as perenes.

Em seringueira (*Hevea brasiliensis*), Paiva & Gonçalves (1989), reportando-se a nove anos de pesquisas com melhoramento genético na Região Amazônica,

comentam sobre a importância desse programa, bem como sobre os avanços obtidos, principalmente no tocante ao manejo e preservação de recursos genéticos relacionados à cultura, em um ambiente extremamente favorável à manifestação de doenças.

O melhoramento genético de espécies cuja forma de estabelecimento de plantios comerciais baseia-se na propagação vegetativa condiciona os melhoristas a procurarem, tanto em populações naturais como artificiais, combinações gênicas ideais, responsáveis por características favoráveis reunidas em um só indivíduo, visando posteriormente fixá-las com a clonagem. Normalmente, este caminho tende à uniformidade genética, ao contrário do que ocorre em populações naturais, onde o nível de variabilidade genética tem um significado biológico importante no equilíbrio do ecossistema, principalmente em regiões tropicais.

5. ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

A escolha do método ou da estratégia na condução de um programa de melhoramento genético está diretamente relacionada com a biologia reprodutiva da espécie, ou seja, é importante conhecer se a espécie é alógama, intermediária ou autógama. Em cajueiro e mandioca, por exemplo, espécies onde predomina a fecundação cruzada, apesar da escolha do método de melhoramento a ser empregado dever ser coerente com a biologia floral desse grupo de plantas, a viabilidade de propagação vegetativa permite que enfoques alternativos sejam considerados, uma vez que existe a possibilidade de propagação de um determinado indivíduo, em qualquer etapa do processo. Esta situação, cabe acrescentar, é comum a outras espécies cultivadas de propagação vegetativa, a exemplo do abacaxi, banana, citros, manga entre outras, independentemente da biologia reprodutiva da espécie.

Os procedimentos comumente adotados no melhoramento de plantas de propagação assexuada ou vegetativa são a introdução de germoplasma, a seleção clonal e a hibridação. Além destes, outros métodos auxiliares têm sido utilizados com sucesso, como a indução de mutações, indução de poliploidia, além daqueles apoiados na cultura de tecidos, a exemplo da fusão de protoplastos.

A introdução de plantas, como método de melhoramento genético de espécies passíveis de serem propagadas vegetativamente, a exemplo do que ocorre em fruteiras perenes, tem sido a principal fonte de seleção de novos genótipos adequados à exploração comercial. O sucesso dos processos de seleção depende, evidentemente, da presença de indivíduos portadores de características agronômicas superiores, os quais darão formação a clones visando avaliações posteriores em estudos de competição. Assim, o êxito do processo de seleção de clones depende da variabilidade genética existente na população base, seja ela obtida a partir da introdução de germoplasma, seja a partir de programas de hibridação.

Quando se utiliza a técnica de indução de mutação deve-se ter em mente que as mutações ocorrem ao acaso, constituem-se em eventos unicelulares e que quando se aplica um mutagênico em estruturas pluricelulares há a ocorrência de quimerismo. É importante, portanto, determinar inicialmente a sensitividade do material ao mutagênico. No caso de plantas propagadas vegetativamente, determina-se a sobrevivência e altura das plantas após o tratamento com doses crescentes do mutagênico, anotando-se também o número de brotações (no tratamento de estacas),

pegamento de enxertos (no tratamento de borbulhas) etc. Na aplicação de mutagênicos *in vitro*, de acordo com o material tratado, analisa-se a porcentagem de regeneração, número de embriões somáticos, porcentagem de novos brotos, viabilidade de protoplastos etc. (Tulmann Neto & Ando, 1997).

As diferenças ecológicas peculiares a cada região do Brasil onde são desenvolvidas pesquisas com melhoramento genético, associadas ao nível de tecnologia utilizado nos plantios comerciais, são fatores que determinam uma abordagem diferencial dos problemas de pesquisa.

Face às limitações de baixa produtividade apresentadas por variedades de muitas espécies cultivadas, principalmente em regiões tropicais, devidas em grande parte a pressões ambientais desfavoráveis determinadas tanto por agentes bióticos como abióticos, paralelamente à identificação de indivíduos promissores a partir de bancos ativos de germoplasma, alguns programas de hibridação têm sido conduzidos, consistindo suas estratégias básicas no cruzamento entre genótipos que apresentem características favoráveis relacionadas à produtividade e resistência/tolerância a doenças e a fatores adversos de clima e solo, como a tolerância à seca e à toxicidade de alumínio, seguida da avaliação de progênies e clonagem de plantas identificadas como superiores.

As perspectivas de progresso na seleção de clones produtivos são maiores em regiões onde as pressões ambientais negativas ao desenvolvimento de uma dada cultura são mais baixas. A esse respeito, pode-se citar como exemplo o programa de melhoramento genético de seringueira desenvolvido no Planalto Paulista pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), cujas possibilidades de obtenção de progressos genéticos são tão grandes quanto aqueles verificados na Malásia.

Para o melhorista a propagação assexuada constitui uma "ferramenta" de trabalho muito atraente na obtenção de rápido progresso genético no material selecionado. Tanto é que no melhoramento de espécies passíveis de serem propagadas vegetativamente o maior esforço da pesquisa é centralizado na identificação de plantas que reúnem o maior número possível de características favoráveis, para em seguida fixá-las mediante clonagem. Particularmente no tocante a espécies frutíferas perenes onde ainda não estão estabelecidas técnicas de propagação vegetativa em larga escala, os esforços de pesquisa têm sido direcionados ao estabelecimento desses métodos. Tão logo mostrem-se disponíveis, são incorporados aos programas de melhoramento como uma estratégia auxiliar na obtenção de indivíduos produtivos e melhor adaptados aos sistemas de produção aos quais se destinam.

A prática da clonagem em plantas de propagação vegetativa, apesar de permitir saltos significativos tanto em produtividade como em qualidade do produto, com reflexos positivos no rendimento econômico do negócio agrícola, implica, freqüentemente, em uma drástica redução na variabilidade genética presente em plantios comerciais, expondo os cultivos a maiores riscos frente a mudanças ambientais, conforme já enfatizado. Esses riscos são mais evidentes em ambientes sujeitos a estresses, a exemplo do que se verifica sob condições tropicais, nas quais a ocorrência de doenças e pragas é bastante acentuada. Assim, sob condições ecológicas sujeitas a pressões ambientais desfavoráveis à cultura, deve-se atentar para a necessidade de emprego de variedades comerciais que, isoladamente ou em conjunto, compreendam uma diversidade genética suficiente para impedir ou ao menos restringir o máximo

possível sua vulnerabilidade a estresses, constituindo as chamadas multilíneas e variedades sintéticas exemplos adequados a esse propósito. Além disso, a associação de técnicas de manejo cultural convenientes contribuirão para a sustentabilidade dos cultivos em regiões com maior potencial de riscos de natureza ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. **Plant genetic resources:** an introduction to their conservation and use. Baltimore: Maryland Edward Arnold, 1986. 146p.

GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. **Organização e uso de bancos de germoplasma de frutíferas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTI-CULTURA, 9., Campinas, 1987. **Anais**. Campinas, 1987. p.11-17.

JENSEN, N.F. Intra-varietal diversification in oat-breeding. **Agronomy Journal**, v.44, p.30-34, 1952.

KAGEYAMA, P.Y. Conservação in situ de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, v.35, p.7-37, 1987.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. **IPEF**, v.35, p.71-78, 1987.

MOURÃO FILHO, F.A.A. Uso da biotecnologia no melhoramento de frutíferas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., Jaboticabal 1997. **Anais**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1997. p.48-50.

PAIVA, J.R.; GONÇALVES, P.S. **Eficiência do programa de melhoramento de seringueira no Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê:** nove anos de pesquisa. Manaus: EMBRAPA, CNPSD, 1989. 41p. (Boletim de Pesquisa, 2).

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A.D.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; OLIVEIRA, A.A.R.; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J.L.; MORAIS, L.S.; CASTRO NETO, M.T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; OLIVEIRA, R.P. de. **Programa de melhoramento genético de citros da EMBRAPA- CNPMF:** obtenção de híbridos. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1997. 17p. (Documentos, 74).

TULMANN NETO, A.; ANDO, A. **Uso da energia nuclear no melhoramento de frutíferas.** Jaboticabal: UNESP, FCAVJ, 1997. p.31-33.

WET, J.M.J.; HARLAN, J.R. Weeds and domesticates: evolution in the man made habitat. **Economy Botanic**, v.29, p.99-107, 1975.

ZOHARY, D. Centers of diversity and centers of origin. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) **Genetic resources in plants.** London : International Biological Programme, 1970. p.33-42.

12

MELHORAMENTO DE HORTALIÇAS

ANTONIO ISMAEL INÁCIO CARDOSO

Depto. de Produção Vegetal - FCA/UNESP, C.P. 237 - CEP: 18603-970 - Botucatu, SP.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro registro sobre a exploração de hortaliças para fins alimentares no Brasil data de 1500 e consta da carta de Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal, relatando o uso do inhame na alimentação dos nativos (Ming, 1997), apesar de alguns pesquisadores relatarem que era, na verdade, mandioca (Melo, 2000). Relatos subseqüentes através dos séculos mencionam as cucurbitáceas, leguminosas, brassicáceas e muitas outras, como integrantes do cardápio dos brasileiros. No século XIX a imigração européia não ibérica trouxe consigo a expansão da produção de hortaliças, com a introdução de novas espécies e a ampliação da produção daquelas já cultivadas anteriormente. Mas foi com a imigração japonesa, a partir de 1920, que a produção de hortaliças tomou um grande impulso, tornando-se um grupo de culturas de considerável valor econômico e social.

Após uma etapa em que predominou a grande produção de hortaliças para consumo *in natura*, entrou-se, na última década, com a perspectiva de uma grande expansão da agroindustrialização, assegurando a definitiva inclusão das principais hortaliças no rol das mais importantes culturas do Brasil.

A produção de hortaliças é, por natureza, intensiva em mão-de-obra, contribuindo significativamente para o mercado de trabalho. Também representam um componente essencial da alimentação humana, constituindo-se na principal fonte de algumas vitaminas e sais minerais indispensáveis.

Geralmente costuma-se classificar as espécies oleráceas em grupos. Assim têm-se as hortaliças tuberosas, herbáceas e as hortaliças fruto. Entretanto, o melhor critério para agrupar as culturas oleráceas considera a classificação taxonômica (Tabela 1).

O melhoramento genético de hortaliças no Brasil começou na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), no Instituto de Genética, com o Professor Brieger, na década de 40. Nesta época o melhoramento foi representado pela pesquisa em produção de sementes, objetivando reduzir a dependência externa, que era de 100% das sementes utilizadas no Brasil. Porém, só recomendava a obtenção de sementes das melhores plantas, caracterizando o melhoramento genético (seleção massal). Entretanto, os primeiros trabalhos de melhoramento genético mais elaborados iniciaram-se no final da década de 40 com o Professor Marcílio Dias, considerado o "pai" do melhoramento de hortaliças no Brasil. Atualmente, a maioria das hortaliças já apresenta cultivares e/ou híbridos resultantes do melhoramento genético realizado no Brasil.

2. MELHORAMENTO GENÉTICO E A PRODUÇÃO DE SEMENTES DE HORTALIÇAS

Historicamente o Brasil tem dependido da importação de sementes para suprir as necessidades do sistema produtivo de sementes, sendo que ainda importa de diversos países, dentre eles, Estados Unidos, Japão, França, Holanda e Chile. Porém, a

TABELA 1. Classificação taxonômica das principais hortaliças.

Família	Nome popular	Nome científico
Alliaceae	Alho	*Allium sativum*
	Cebola	*Allium cepa*
	Cebolinha	*Allium schoenoprasum*
Apiaceae	Cenoura	*Daucus carota*
	Coentro	*Coriandrum sativum*
	Mandioquinha-salsa	*Arracacia xanthorrhiza*
	Salsa	*Petroselinum crispum*
Araceae	Inhame	*Colocasia esculenta*
Brassicaceae	Agrião d'água	*Nasturtium officinale*
	Couve-brócolos	*Brassica oleracea var. italica*
	Couve-flor	*Brassica oleracea var.*
	Couve-de-folhas	*Brassica oleracea var. acephala*
	Rabanete	*sativus*
	Repolho	*Brassica oleracea var. capitata*
	Rúcula	*Eruca sativa*
Chenopodiaceae	Beterraba	*Beta vulgaris*
Convolvulaceae	Batata-doce	*Ipomoea batatas*
Cucurbitaceae	Abobrinha	*Cucurbita pepo, C. moschata*
	Abóbora	*Cucurbita maxima, C. moschata*
	Chuchu	*Sechium edule*
	Melancia	*Citrullus lanatus*
	Melão	*Cucumis melo*
	Pepino	*Cucumis sativus*
Fabaceae	Ervilha	*Pisum sativum*
	Feijão-de-vagem	*Phaseolus vulgaris*
Malvaceae	Quiabo	*Abelmoschus esculentus*
Poaceae	Milho-verde/milho-doce	*Zea mays*
Rosaceae	Morango	*Fragaria x ananassa*
Solanaceae	Batata	*Solanum tuberosum*
	Berinjela	*Solanum melongena*
	Pimentão/Pimenta	*Capsicum* spp.
	Tomate	*Lycopersicon esculentum*

dependência externa de sementes caiu de 62,9% em 1981, para 23,8% em 1989, com uma queda de 4,9% ao ano nas importações, resultante de vários fatores, entre eles o aumento da produção interna, que evoluiu, no período, de 353 t produzidas em 1981, para 1.656 t em 1989 (Buso & Nascimento, 1994). Além da quantidade de sementes, já há diversidade na produção interna pois, em 1989, foram produzidas sementes de 29 espécies de hortaliças. A produção concentra-se nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

Três fatores vêm contribuindo para o aumento da produção de sementes de hortaliças em nosso país: o desenvolvimento de tecnologias adequadas à produção de sementes, a abertura de novas áreas mais apropriadas à produção de sementes olerícolas e a criação de cultivares melhor adaptadas às nossas condições edafoclimáticas. Para várias espécies, o Brasil já dispõe de tecnologia adequada, verificando-se altas produtividades e alta qualidade de sementes.

Além da quantidade, deve-se ressaltar a grande diversidade de cultivares, pois existe a tendência do mercado de hortaliças se segmentar, por preferências dos mercados consumidores e da diversidade de condições edafoclimáticas e de cultivo existentes no Brasil.

A grande mudança no conceito de produção de sementes de hortaliças ocorreu com a chegada dos híbridos, principalmente aqueles cujas sementes são obtidas através de polinizações manuais. Em geral, são produtos cujo custo ultrapassa muitas vezes o das cultivares de polinização aberta, mas nem por isso deixam de ser avidamente procurados pelos agricultores mais tecnificados e que sabem como extrair de uma semente todo o seu potencial genético. Não é difícil encontrar sementes de híbridos com preço superior a 20 mil dólares o quilo ao nível do varejo, fazendo deste um mercado altamente valorizado (Alencar, 1993).

Toda esta nova roupagem que a semente adquiriu nos últimos anos mudou por completo a estrutura mundial de produção desse insumo. Esta atividade não tem mais fronteiras e em certas regiões estão concentradas as produções de sementes que abastecem todo o mundo. Decididamente não há mais, em qualquer país, a auto-suficiência de sementes de hortaliças. O custo de distribuição não é relevante em função do valor do produto e, salvo raríssimas exceções, o comércio entre nações é livre, havendo restrições única e exclusivamente de ordem fitossanitária.

Acredita-se que em breve o país, visto as suas características próprias para a produção de sementes de muitas espécies olerícolas, poderá passar de um tradicional importador a um grande exportador de sementes de hortaliças.

Com relação ao custo de produção das sementes, não deve ser fator limitante na escolha da área para produção das sementes híbridas de hortaliças. Por ser a semente um insumo que participa com muito pouco do valor das despesas totais de formação de lavouras de hortaliças (cerca de 3% para a maioria das espécies), sua qualidade e seu potencial genético são o que de fato importam (Viggiano, 1994).

3. ORIGEM E CENTROS DE DIVERSIDADE

A pessoa que mais contribuiu ao conhecimento da origem das plantas cultivadas foi, sem dúvida, Nikolai Ivanovich Vavilov. A enorme quantidade de material reunido pelo instituto por ele dirigido durante cerca de 20 anos, desde 1916, levou Vavilov a se convencer que a maioria da diversidade das espécies cultivadas concentrava-se em oito grandes centros de dispersão: China, Índia, Centro Índio-Malaio, Ásia Central, Oriente Médio, região Mediterrânea, Abissínia, América Central/México e a região centro-ocidental da América do Sul. Propôs que os centros de origem das espécies coincidiam com as zonas onde existia maior dispersão e diversidade destas espécies. Entretanto, é importante ressaltar que, enquanto os centros de diversidade são fatos biológicos, o termo "centro de origem" é somente uma interpretação. Vavilov também reconheceu os centros secundários de origem, onde também se encontram formas vegetais de grande valor para a conservação de germoplasma e para o melhoramento genético.

Na Tabela 2 tem-se, resumidamente, os centros de origem e de diversidade das principais espécies olerícolas.

TABELA 2. Centros de origem e de diversidade das principais espécies olerícolas.

Espécie	Centros de origem e/ou diversidade
Abóboras/abobrinhas (*Cucurbita* spp.)	Continente Americano
Alface (*Lactuca sativa*)	Região Mediterrânea
Batata (*Solanum tuberosum*)	Continente Americano
Batata-doce (*Ipomoea batatas*)	América do Sul
Berinjela (*Solanum melongena*)	Índia
Beterraba (*Beta vulgaris*)	Região Mediterrânea
Brássicas (*Brassica oleracea*)	Europa e Ásia Menor
Cebola (*Allium cepa*)	Oriente Médio e Ásia Central
Cenoura (*Daucus carota*)	Oriente Médio e Ásia Central
Ervilha (*Pisum sativum*)	Etiópia, região Mediterrânea e Ásia Central
Feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris*)	Continente Americano
Melancia (*Citrullus lanatus*)	Sul da África
Melão (*Cucumis melo*)	África, Índia
Morango (*Fragaria x ananassa*)	América do Sul
Pepino (*Cucumis sativus*)	Índia e Ásia Central
Pimenta/Pimentão (*Capsicum spp.*)	Continente Americano
Tomate (*Lycopersicon esculentum*)	América do Sul

Fonte: Simmonds (1976)

O conhecimento dos centros de origem e diversidade de uma espécie é de extrema importância no melhoramento genético, pois são nestas regiões onde normalmente se encontra a máxima diversidade, sendo importantes fontes de genes que podem ser úteis no melhoramento, tanto a curto quanto a longo prazo.

Harlan, citado por Allard (1971), expôs o perigo de uma possível extinção da variabilidade genética de algumas espécies: "A agricultura e tecnologia modernas se extendem rapidamente em todo o mundo. As novas variedades modernas uniformes que saem das estações experimentais estão substituindo as populações locais, com elevada variabilidade, que vinham sendo cultivadas há muito tempo... Agora nos encontramos com um problema difícil, que é o fato de que os países atrasados tecnicamente não podem conservar suas grandes riquezes varietais e nós não podemos permitir que elas desapareçam." Assim, mostra-se premente a coleta e manutenção desta variabilidade natural encontrada nos centros de origem e diversidade de cada espécie.

Segundo Casali (1997) em termos econômicos é bom refletir sobre o exemplo de duas espécies de tomates verdes silvestres encontrados no Peru na década de 60. Estas espécies contribuíram, via melhoramento genético, com genes já incorporados na espécie cultivada, responsáveis pelo acréscimo de pigmentação e teor de sólidos solúveis que valem aproximadamente US$ 5 milhões por ano à indústria processadora de tomate.

A domesticação de uma espécie, que é definida como a alteração genética das plantas devido à ação do homem, geralmente foi feita pelos povos nativos da região de origem da mesma, onde, muitas vezes, por seleção massal a espécie se transformou de selvagem a cultivada, com grandes ganhos acumulados através dos séculos.

Segundo Robinson & Decker-Walters (1999) "algumas cucurbitáceas são plantas daninhas esperando para se tornarem espécies cultivadas". Assim, a domesticação de diversas espécies desta família, trouxe grandes alterações, como aumento no tamanho dos frutos, eliminação do sabor amargo, melhoria na aparência geral dos frutos, precocidade e redução ou eliminação da dormência das sementes.

Segundo Ming (1997) da mesma forma que o ocorrido com o milho no novo mundo, as características botânicas e as preferências dos cultivadores nativos formaram, com o tempo, e preservaram até nossos dias, uma extraordinária variedade de formas de muitas espécies vegetais que são utilizadas hoje. Como exemplo, citam-se diversas espécies de cucurbitáceas, como abobrinhas e abóboras (*Cucurbita pepo, C. maxima*), chuchu (*Secchium* spp.), batata-doce (*Ipomoea batatas*), inhames (*Dioscorea* spp.), dentre outras.

Entretanto, existe um exemplo clássico de evolução fora do centro de origem com importantes implicações no melhoramento da espécie, que ocorreu com o tomateiro. Esta é uma espécie originada na América do Sul, mas durante o processo evolutivo foi levado para o México. Neste processo, o homem foi capaz de selecionar plantas com frutos maiores, preservando a alogamia como forma de multiplicação. Do México, foi levado pelos espanhóis, por ocasião do descobrimento, para a Europa. Como o tomateiro, na época, era considerada uma espécie tóxica, era cultivada como ornamental, sendo o seu plantio geralmente realizado com as plantas mantidas isoladamente e em ambientes fechados. Neste habitat, as plantas foram privadas da ação dos ventos e insetos, seus polinizadores naturais. Desta forma, só os acessos com maior taxa de autofecundação (estigma inserido no cone de anteras – Figura 1) deixavam descendentes. Assim, inconscientemente, o homem selecionou plantas autógamas (Rick, 1950). Entretanto, as demais características da flor não se alteraram, tanto que até hoje o tomateiro é uma das espécies autógamas com flores mais atrativas aos insetos, característica de espécies alógamas com polinização entomófila.

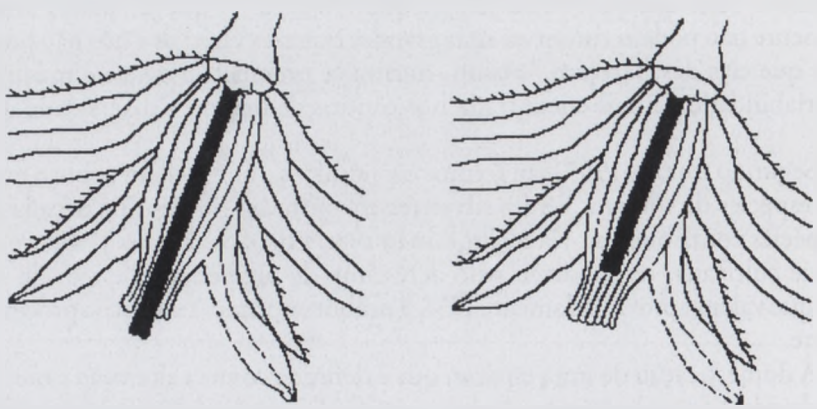


FIGURA 1. Esquema de flores de tomate (*Lycopersicon esculentum*) mostrando diferentes comprimentos de estilo/estigma.

4. BIOLOGIA REPRODUTIVA

4.1 INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NO FLORESCIMENTO

Em algumas hortaliças consome-se o fruto, que é um órgão reprodutivo. Entretanto, em diversas outras são consumidas partes vegetativas, não alcançando a fase reprodutiva no cultivo comercial. Nestas espécies, geralmente, a fase reprodutiva é induzida por fatores ambientais específicos.

Por exemplo, a cebola é uma espécie olerícola de ciclo vital bienal, compreendendo uma fase vegetativa, que culmina com a formação do bulbo, e uma reprodutiva, quando ocorre o florescimento e a produção de sementes (Melo & Ribeiro, 1990). Para a formação dos bulbos, os fatores que exercem maior influência são o fotoperíodo (espécie de dias longos) e a temperatura. Na passagem da fase vegetativa para a reprodutiva a temperatura (baixa) é o fator de maior importância. No melhoramento de cebola é comum se proceder a vernalização dos bulbos selecionados por um período de 30 a 40 dias a temperaturas de 4°C a 8°C.

As brássicas também necessitam de um período de baixas temperaturas para passarem da fase vegetativa para a reprodutiva (Nieuwhof, 1969). A maioria dos genótipos de cenoura também responde a ação de baixas temperaturas, entretanto existem alguns que são induzidos pelo fotoperíodo (dias longos) como é o caso da cultivar Tropical (Vieira & Casali, 1984).

Temperatura é o fator mais importante para indução do florescimento em alface. Temperaturas acima de 20°C estimulam o pendoamento, que é acentuado à medida que a temperatura se eleva. Dias longos, associados às temperaturas elevadas, aceleram o processo (Viggiano, 1990).

No entanto, a maioria das espécies olerícolas floresce independentemente da ação da temperatura e do comprimento do dia. Os fatores ambientais passam a ter apenas importância na proporção de flores femininas e masculinas (cucurbitáceas, por exemplo) ou apenas na aceleração ou retardamento do ciclo.

4.2 SISTEMAS REPRODUTIVOS

Do ponto de vista do melhoramento genético, existem dois sistemas reprodutivos nas espécies vegetais: autogamia e alogamia. O conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie é fundamental para se determinar o método de melhoramento a ser utilizado, embora, muitas vezes, sejam utilizados métodos preferencialmente de espécies autógamas em hortaliças alógamas.

As populações de espécies alógamas, geralmente, são extremamente variáveis, com grande parte dos locos gênicos em heterozigose e a endogamia em excesso geralmente acarreta grande perda de vigor. Por isto, deve-se, ao longo dos programas de melhoramento, manter-se esta heterozigose ou restabelecê-la ao final do mesmo. Entretanto, as cucurbitáceas em geral, principalmente as abóboras, não apresentam esta característica de depressão por endogamia tão pronunciada. Várias hipóteses têm sido levantadas com o fim de explicar este fenômeno. Alguns autores sugerem que devido estas espécies serem mantidas normalmente em pequenas populações e os agricultores, às vezes, utilizarem apenas um fruto para manter seu material, levou a endogamia pela restrição do tamanho da amostra e os genes deletérios foram sendo

eliminados por seleção natural. Entretanto, a falta de depressão por endogamia não significa ausência de heterose, que é largamente aproveitada na obtenção de híbridos em cucurbitáceas (Whitaker & Robinson, 1986).

4.2.1 MECANISMOS QUE FAVORECEM A ALOGAMIA

Existem diversos mecanismos que favorecem, embora nem sempre forcem, a ocorrência da polinização cruzada em espécies vegetais superiores, dentre os quais se destacam:

a) Dioicia

Caracteriza-se pela ocorrência de plantas que só produzem flores masculinas ou somente femininas. Conseqüentemente, é um mecanismo que força a ocorrência da alogamia, não permitindo, naturalmente, a ocorrência de autofecundação. Por isto, é considerado o mecanismo mais drástico que favorece a alogamia. O aspargo é a única espécie olerícola de importância que é dióica.

b) Monoicia

Caracteriza-se pela ocorrência de flores masculinas e femininas na mesma planta. Portanto, pode ocorrer certa taxa de autofecundação natural e, nos programas de melhoramento, muitas vezes se força a ocorrência desta autofecundação. Entre as hortaliças monóicas, destacam-se muitas cucurbitáceas, como as abóboras/abobrinhas e o pepino.

c) Macho-esterilidade

Caracteriza-se pela ausência de grão de pólen viável na planta, embora existam os órgãos masculinos e ocorra a androgênese. A ocorrência da macho-esterilidade em populações naturais é esporádica, mas sua utilização no melhoramento de algumas espécies, como cebola e cenoura, é de suma importância nos programas de produção de híbridos, pois como a planta não produz pólen viável, toda semente colhida sobre uma planta macho-estéril foi obtida por polinização cruzada. Existem três tipos de macho-esterilidade: a citoplasmática, a genética e a genético-citoplasmática, sendo esta última a mais comum nas espécies citadas.

d) Auto-incompatibilidade

Existem diversos tipos de auto-incompatibilidade em espécies com flores hermafroditas para forçar a polinização cruzada, que operam graças a incompatibilidade entre o pólen e o estilo da mesma planta. É um mecanismo muito comum nas brássicas, onde ocorre a incompatibilidade esporofítica (Thompson, 1957). A manifestação deste fenômeno consiste na não fecundação do óvulo por grãos de pólen da própria planta ou de outra portadora de alelos de incompatibilidade iguais, resultando na ausência ou na drástica redução do número de sementes por síliqua (Thompson & Taylor, 1971). A compreensão deste sistema e o início da sua utilização marcaram o surgimento dos primeiros híbridos comerciais no gênero *Brassica* (Ikuta, 1974; Giordano, 1983; Silva, 1985; Riggs, 1988).

e) Protandria e protoginia

Protoginia caracteriza-se pelo estigma de uma flor hermafrodita ficar receptivo antes de ocorrer a deiscência do pólen da mesma flor, enquanto que na protandria ocorre o inverso. Em hortaliças é comum a ocorrência de protandria em cebola (Currah & Ockendon, 1978) (Figura 2) e cenoura (Peterson & Simon, 1986) e uma ligeira protoginia em brássicas (Nieuwhof, 1969).

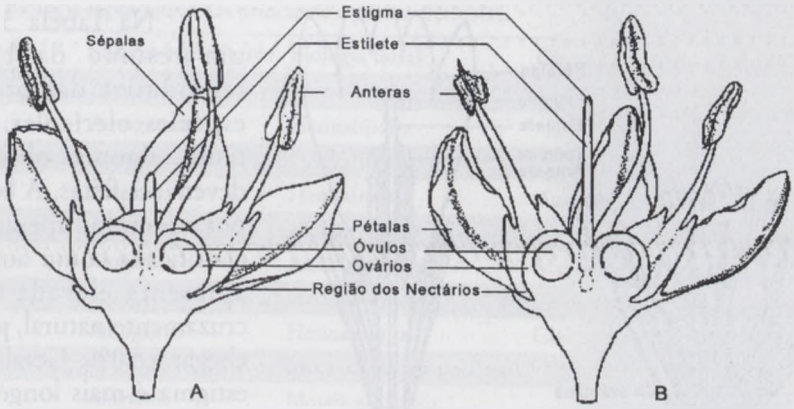


FIGURA 2. Esquema de uma flor de cebola (*Allium cepa*) mostrando as duas fases da protandria. A – estádio "masculino", com anteras liberando pólen, estilete curto e estigma não receptivo; B – estádio "feminino", com anteras não liberando mais pólen, estilete alongado e estigma receptivo.

4.2.2 MECANISMOS QUE FAVORECEM A AUTOGAMIA

Para que ocorra a autogamia, inicialmente a flor deve ser hermafrodita, entretanto somente isto não determina uma espécie ser de autofecundação. Existem alguns mecanismos que, aliados ao hermafroditismo, induzem a autogamia.

a) Cone de anteras

Mecanismo que ocorre em tomate (Figura 3), que caracteriza-se pela "soldadura" das anteras formando um cone que recobre o estigma da flor. O pólen é liberado pelas fendas laterais das anteras no interior do cone e, desde que as flores estejam pendentes (posição normal), é conduzido por gravidade para a boca do tubo formado pelas anteras onde fica o estigma, garantindo, dessa maneira, a autofecundação.

Em alface os estames se fundem formando um tubo e as anteras liberam pólen na superfície interior quando a flor se abre pela manhã (Figura 4). O estilete ao se elongar com os dois lobos estigmáticos, arrasta o pólen quando emerge do topo do tubo estamínico. Conseqüentemente, o estigma quando exposto já está completamente recoberto por pólen da própria flor, favorecendo a autofecundação.

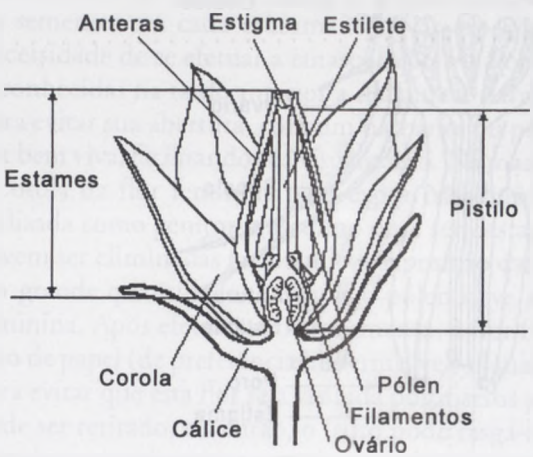


FIGURA 3. Esquema de uma flor de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

b) Cleistogamia

Em algumas espécies, como feijão-vagem, ervilha e outras fabáceas, ocorre a autofecundação ainda na fase de flor fechada. Quando ocorre a antese, a flor já está fecundada impossibilitando a polinização cruzada.

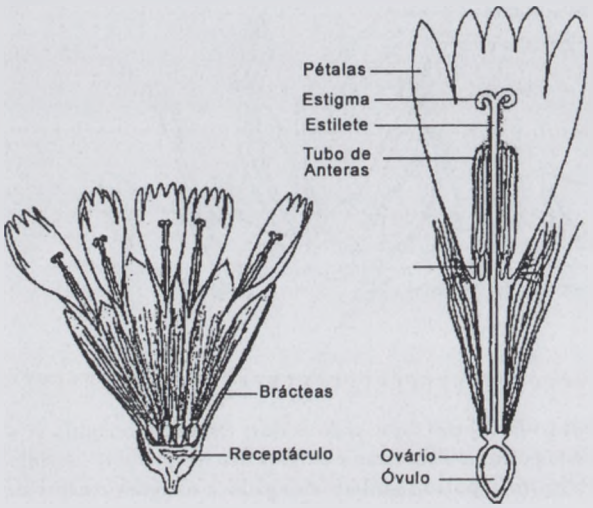


FIGURA 4. Esquema da flor de alface (*Lactuca sativa*).

Na Tabela 3 tem-se um resumo da biologia reprodutiva das principais espécies olerícolas. Entretanto, algumas observações devem ser feitas. A berinjela, por exemplo, apesar de ser classificada como autógama, apresenta elevada taxa de cruzamento natural, podendo chegar a 50%. Geralmente o estigma é mais longo que as anteras (Figura 5), permitindo, com isso, o cruzamento realizado por insetos. Também as espécies de pimentão e pimenta apresentam grande variabilidade quanto a taxa de cruzamento, apesar de serem classificadas como autógamas. As cultivares variam significativamente na taxa de fecundação cruzada, sendo a estrutura das flores o provável motivo desta variação (Greenleaf, 1986).

No caso do pepino, apesar da maioria das populações ser monóica, existe um grande número de híbridos ginóicos, cuja produção só é possível com a partenocarpia ou a mistura de uma cultivar ou híbrido monóico.

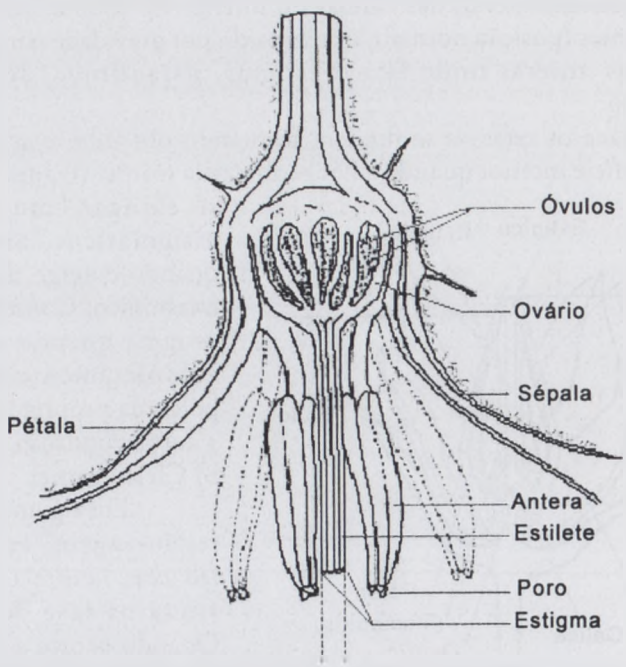


FIGURA 5. Secção longitudinal de uma flor de berinjela (*Solanum melongena*). Áreas pontilhadas indicam a variação no comprimento do estilete e a posição dos estames.

TABELA 3. Biologia reprodutiva das principais espécies olerícolas.

Espécie	Sistema reprodutivo	Biologia floral	Observações
Abóbora/abobrinha	Alogamia	Monóica	
Alface	Autogamia	Hermafrodita	
Berinjela	Autogamia	Hermafrodita	Alta taxa cruzamento
Brássicas	Alogamia	Hermafrodita	Auto-incompatibilidade
Cebola	Alogamia	Hermafrodita	Macho-esterilidade, protandria
Cenoura	Alogamia	Andromonóica	Macho-esterilidade, protandria
Ervilha	Autogamia	Hermafrodita	Cleistogamia
Feijão-vagem	Autogamia	Hermafrodita	Cleistogamia
Melancia/melão	Alogamia	Monóica, andromonóica	
Pepino	Alogamia	Monóica/ginóica	
Pimentão/Pimenta	Autogamia	Hermafrodita	
Tomate	Autogamia	Hermafrodita	Cone de anteras

4.3 POLINIZAÇÃO CONTROLADA

No melhoramento genético o primeiro passo é encontrar ou produzir variabilidade para que possa haver seleção de genótipos superiores ou desejáveis. Para se obter a variabilidade desejável, geralmente o melhorista faz uso de cruzamentos controlados entre genótipos que se complementam. A maioria das cultivares melhoradas é resultado de hibridações sexuais, seguidas de seleção dos melhores recombinantes genéticos. Em poucos casos, a seleção de mutantes naturais ou induzidos, tem possibilitado o desenvolvimento de novas cultivares.

Em algumas espécies esta polinização é fácil, entretanto em outras há grande dificuldade de ser efetuada. A seguir têm-se alguns exemplos de como se realizar polinização controlada em algumas espécies olerícolas.

a) Cucurbitáceas

A técnica de polinização controlada em cucurbitáceas é relativamente simples, pois as flores são grandes, fáceis de serem manipuladas e obtém-se grande quantidade de sementes em cada cruzamento. Nas espécies ou genótipos monóicos não há a necessidade de se efetuar a emasculação. As flores de plantas selecionadas devem ser reconhecidas na tarde anterior a sua antese para que se efetue o amarrio das pétalas, para evitar sua abertura, com um barbante ou preferencialmente um pedaço de lã de cor bem viva, facilitando sua visualização. Na manhã seguinte, abre-se cuidadosamente a corola da flor feminina para expor o estigma. A flor masculina da planta a ser utilizada como genitor masculino deve ser destacada da planta, suas pétalas também devem ser eliminadas facilitando a exposição das anteras que devem estar com pólen em grande quantidade. A seguir o pólen deve ser aplicado sobre o estigma da flor feminina. Após efetuar-se o cruzamento, a flor feminina deve ser protegida com um saco de papel (de preferência impermeável) o qual deve ser preso a base do pedúnculo, para evitar que esta flor seja visitada por insetos polinizadores. Após 3 a 7 dias o saco pode ser retirado, ou então, o fruto pode rasgá-lo ao crescer. No pedúnculo deve-se prender uma etiqueta contendo os dados do cruzamento, tais como, fonte do pólen (pai) e data. Nas espécies ou genótipos com flores hermafroditas ao invés de femininas

(andromonóicas, como o melão, por exemplo) deve-se, antes de se efetuar a polinização, proceder-se a emasculação da flor na tarde anterior a antese da mesma. As demais fases são as mesmas já descritas.

Recomenda-se, também, eliminar-se todas as flores femininas ou hermafroditas (dependendo da espécie) que já tenham sido polinizadas sem controle, pois geralmente os frutos em desenvolvimento inibem o pegamento de novos frutos (Lower & Edwards, 1986).

Ressalta-se que o pólen em cucurbitáceas apresenta pequena vida útil, não devendo ser armazenado por mais de alguns poucos dias. Neste caso, o armazenamento deve ser realizado sob baixa temperatura e alta umidade (Robinson & Decker-Walters, 1999). Alta temperatura e baixa umidade reduzem a receptividade do estigma e viabilidade do pólen, reduzindo o sucesso da polinização controlada.

b) Solanáceas

O cruzamento deve ser feito na fase de botão floral, antes de ocorrer a autopolinização, a fim de evitar-se contaminação com o próprio pólen. Um ou dois dias antes da antese, o botão já é suficientemente grande para se efetuar a emasculação. No tomate, por exemplo, as pétalas, nesta fase, ainda estão esbranquiçadas, não apresentando tonalidade amarela, sendo que o estigma da flor já está receptivo, mas a deiscência das anteras ainda não ocorreu. Com uma pinça, ou mesmo com os dedos, puxam-se as pétalas para cima, sendo que a corola mais o cone de anteras se destacam facilmente, deixando exposto o estigma, que é, então, polinizado com pólen do genitor masculino. A seguir, deve-se proteger a flor, por garantia, com um pequeno saco para evitar qualquer contaminação com pólen estranho trazido por algum inseto. No caso do tomate, apenas as flores polinizadas devem ser deixadas na penca, eliminando-se as demais, para que não haja confusão por ocasião da colheita. Em pimentão e berinjela o processo é semelhante, apenas facilitado pelo maior tamanho das flores.

c) Brássicas

Em brássicas é muito comum a ocorrência de auto-incompatibilidade. No cruzamento controlado as plantas auto-incompatíveis não necessitam de emasculação, entretanto, na dúvida esta operação deve ser realizada na fase de botão com o auxílio de uma pinça. O cruzamento, com pólen de outra planta escolhida, pode ser realizado imediatamente após a emasculação. Devem ser utilizados apenas os botões mais vigorosos, eliminando-se os demais botões do ramo. A seguir, deve-se proteger o ramo contendo as flores polinizadas com um saco de papel (de preferência impermeável), para se evitar contaminação com pólen indesejável, e etiquetá-lo. No caso de plantas auto-incompatíveis, a autofecundação deve ser realizada obrigatoriamente na fase de botão, enquanto que nas autocompatíveis pode ser realizada na fase de flor aberta, desde que esta esteja protegida de polinizações indesejáveis. No caso de espécies do gênero *Brassica*, a auto-incompatibilidade só se manifesta quando as flores já estão abertas. Por isso, para a obtenção de linhagens endogâmicas auto-incompatíveis para a produção de híbridos é necessário que a incompatibilidade seja superada pela polinização manual das flores na fase de botão, antes que o mecanismo esteja operante (Watts, 1963; Ikuta, 1969).

d) Cebola

A polinização controlada em cebola é muito difícil de ser realizada, visto que cada inflorescência (umbela) é constituída por centenas de pequenas flores hermafroditas. Assim, o melhorista tem duas alternativas (Pike, 1986): fazer a emasculação manual de uma planta do genitor feminino, que é uma atividade extremamente difícil, pois as flores abrem-se, em uma única umbela, por um período de duas ou mais semanas. Portanto, o processo rende poucas sementes. A segunda alternativa é realizar o cruzamento entre dois materiais férteis, isolados dentro de uma gaiola, polinizados manualmente ou com a utilização de insetos, como a mosca doméstica. Este método só pode ser eficientemente utilizado se os materiais forem suficientemente diferentes de tal maneira que as plantas da hibridação (F_1) forem passíveis de diferenciação do genitor feminino. A autofecundação é mais fácil, basta isolar uma planta dentro de uma gaiola de pano com insetos, principalmente moscas (adultos e pupas), e colher as sementes. Ressalta-se que a cebola apresenta grande depressão por endogamia, restringindo a utilização da autofecundação, apenas em programas para obtenção de linhagens na produção de híbridos.

e) Alface

Esta é, provavelmente, a espécie olerícola de importância comercial com polinização controlada mais difícil de ser realizada. Inicialmente deve-se lavar o pólen que estiver depositado sobre o estigma quando este emerge acima do tubo de anteras, através de um jato fino de água. Quando esta despolinização é bem feita, pode-se obter taxas de cruzamento superiores a 50%. Depois, deve-se secar, com uma suave corrente de ar, as flores a serem polinizadas. A seguir, deve-se depositar o pólen do genitor masculino por sobre o estigma e etiquetar as flores polinizadas. Assim como nos casos anteriores, as flores cruzadas devem ser protegidas de polinizações indesejáveis e marcadas. Apesar de se realizar a polinização com todo o cuidado não se pode ter certeza de que ocorreu 100% de cruzamento, por isto recomenda-se a utilização de algum tipo de marcador morfológico ou molecular para se identificar os contaminantes decorrentes de autofecundação da planta mãe.

Um método desenvolvido por Ryder & Johnson (1974) possibilitou aproximadamente 90% de taxa de cruzamento. Consiste no tratamento de toda a panícula com uma fina nebulização por 1 a 2 minutos, com intervalos de 10 minutos. Este procedimento deve continuar até que todas as flores estejam abertas e os estigmas tiverem emergido acima dos estames. Desse modo, o pólen é continuamente lavado durante o processo de deiscência das anteras. As flores são secas por uma suave corrente de ar, polinizadas e etiquetadas.

5. PRINCIPAIS OBJETIVOS NO MELHORAMENTO DE HORTALIÇAS

É importante destacar que o sucesso de um programa de melhoramento genético depende de uma série de fatores, sendo a definição dos objetivos e metas de fundamental importância para economia de tempo e recursos. Do mesmo modo, deve-se escolher criteriosamente o método mais eficiente, levando-se em conta a base genética do(s) caráter(es) a ser(em) melhorado(s). Entretanto, por princípio, o processo de melhoramento só poderá ser bem sucedido se a população que estiver sendo melhorada possuir variabilidade genética para o(s) caráter(es) sob seleção.

O melhoramento não cria variabilidade, apenas atua sobre a existente, a qual resulta da segregação gênica e da interação de genes. Esse princípio é considerado básico no melhoramento genético das espécies.

Nos programas de melhoramento genético de espécies oleráceas os principais objetivos estão relacionados com o aumento de produtividade e qualidade do produto, ou com redução no custo ou risco de produção. Para atingir seus objetivos, o melhorista precisa de, além de habilidade inata na arte de selecionar, uma completa compreensão e aplicação dos princípios da genética e de outros ramos da ciência agronômica, intimamente relacionados. Esses conhecimentos constituem as ferramentas fundamentais com as quais o melhorista desenvolve suas atividades. De outro lado, as fontes de germoplasma de que dispõe constituem a sua matéria-prima (Melo, 1989).

5.1 RESISTÊNCIA OU TOLERÂNCIA A PATÓGENOS

Entre os fatores limitantes para o cultivo das hortaliças, destacam-se os patógenos e insetos. O tomateiro se destaca como a espécie com maior número de trabalhos na área e, sem dúvida, a maior contribuição do melhoramento genético nesta espécie tem sido a incorporação de resistência genética nas cultivares desenvolvidas. Para certos microrganismos, principalmente patógenos de solo, o cultivo desta espécie seria praticamente impossível sem a resistência genética. Entretanto, o melhoramento para resistência continua sendo o grande objetivo pois novas doenças ou novas raças dos patógenos tornam-se importantes. A resistência genética a vários patógenos tem sido incorporada a partir de espécies não domesticadas, por retrocruzamentos. Por exemplo, a resistência a murcha verticilar foi incorporada a partir de *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*. A murcha de *fusarium*, raças 1 e 2, a partir de *L. pimpinellifolium*, ao vírus TMV e nematóides do gênero *Meloidogyne* a partir de *L. peruvianum*, dentre outros exemplos. Genes maiores dominantes controlam resistência a diversas doenças (Tabela 4). Isso facilita a obtenção de híbridos F_1 com resistência múltipla a doenças (Melo, 1989).

Alguns exemplos de cultivares com resistências múltiplas são o Agrocica Botu 7, 9 e 13, todos resistentes a murcha de *Fusarium* (raça 1) e *Verticillium* (raça 1) e a mancha bacteriana pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), resistências monogênicas e medianamente resistentes à mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), com herança quantitativa (Kurozawa *et al.*, 1990). 'Jumbo AG-592' também é uma cultivar com resistência múltipla ao cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis*), murcha de *Fusarium* e *Verticillium* e mancha de *Stemphylium* (Carrijo, 1991).

TABELA 4. Exemplos de genes de resistência a patógenos em tomateiro.

Gene	Patógeno
Cf (Cf_2, Cf_5,...)	Resistência a algumas raças de *Cladosporium fulvum*
I, I_2	Resistência às raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum f.*sp. *lycopersici*
Mi	Resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne*
Pto	Resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
Sm	Resistência ao *Stemphylium solani*
Ve	Resistência à murcha de *Verticillium*

Também em pepino os maiores ganhos no melhoramento genético têm sido em relação a resistência genética a patógenos. Existem cultivares que possuem resistência a pelo menos oito patógenos, muitos deles responsáveis pela destruição da cultura em um dado ambiente antes da incorporação da resistência (Lower & Edwards, 1986). Muitas destas resistências são conferidas por genes simples. Procedimentos para seleção de plântulas têm sido desenvolvidos para pelo menos oito patógenos, sendo cinco fungos (*Colletotrichum lagenarium, Pseudoperonospora cubensis, Fusarium oxysporum, Cladosporium cucumerinum* e *Sphaeroteca fuliginea*), duas bactérias (*Erwinia tracheiphila* e *Pseudomonas lachrymans*) e um vírus (CMV - *Cucumber mosaic virus*). Com exceção da murcha de *Fusarium*, do oídio e do CMV, todas as inoculações podem ser feitas no estádio cotiledonar da plântula e avaliadas uma semana após (Lower & Edwards, 1986). Há a possibilidade de se avaliar a resistência a vários patógenos na mesma plântula.

Em alface, um dos principais problemas sempre foram as viroses. O mosaico comum da alface (LMV) pode ser controlado pela incorporação de um gene recessivo (*mo*). A resistência ao míldio é determinada por um gene dominante (*Dm*) (Ryder, 1986).

No Brasil, vários programas de melhoramento se destacaram pela incorporação de resistência, múltipla ou não, a patógenos. Nesta linha se notabilizou o Dr. Hiroshi Nagai, do Instituto Agronômico de Campinas. Em tomate foram desenvolvidas as cultivares Ângela Hiper e Santa Clara, com frutos maiores que as cultivares existentes no mercado na época e, principalmente, resistência múltipla a patógenos. Em pimentão desenvolveu as cultivares Agronômico 9 e 10, com resistência ao vírus Y, o mais destrutivo nesta cultura, em um programa conduzido por 9 anos consecutivos (1961 a 1970). Em alface desenvolveu a cultivar Brasil 48, resistente ao mosaico (LMV). Todas estas populações obtidas pelo Dr. Nagai foram, e ainda são, largamente utilizadas como fontes de resistência a patógenos nos programas de melhoramento destas espécies no Brasil.

5.2 HETEROSE EM HORTALIÇAS

A heterose, ou vigor de híbrido, é outro objetivo almejado pelos melhoristas de hortaliças. Berinjela é uma espécie onde a heterose vem sendo explorada economicamente há mais tempo no Brasil. Isso se deve, principalmente, à freqüência com que ocorre o vigor de híbrido na primeira geração (F_1) e também devido a facilidade na obtenção de sementes híbridas, pois apresenta órgãos florais grandes, facilitando o trabalho de castração e polinização controlada. O híbrido F_1 'F100', produzido pelo Instituto de Genética da ESALQ/USP, foi o exemplo clássico, que dominou o mercado por mais de uma década. Este híbrido foi produzido pelo cruzamento de linhagens obtidas das cultivares Campineira x Florida Market (Pinto & Costa, 1977).

Em couve-flor a utilização de populações híbridas também é comum por apresentarem estabilidade de resposta fenotípica a oscilações climáticas (homeostase genética), maior produção, uniformidade e qualidade superior das "cabeças" (Ikuta, 1969; Maluf & Corte, 1990). No Brasil, os híbridos correspondem a mais de 90 % dos plantios comerciais de verão.

Estes são apenas alguns exemplos clássicos na olericultura brasileira. Este assunto, heterose em hortaliças, é assunto de outro capítulo neste livro.

5.3 ADAPTAÇÃO A FATORES AMBIENTAIS ADVERSOS

Cada espécie apresenta uma adaptação a determinadas condições ambientais de acordo com as suas características fisiológicas. O Brasil possui condições edafoclimáticas e de cultivo bastante variadas ao longo de seu imenso território. Não se pode supor que uma determinada cultivar apresente excelente desempenho sobre tamanhas diferenças.

A alface, por exemplo, é uma espécie originariamente adaptada a condições de temperaturas amenas. Além de não se adaptar ao calor, ainda ocorria o problema com o pendoamento precoce sob condições de temperatura elevada e fotoperíodo longo. Atualmente existem diversas cultivares adaptadas a estas condições, que podem ser plantadas o ano todo.

No Brasil o cultivo de couve-flor iniciou-se com cultivares trazidas de países de clima temperado, sendo estas cultivares adaptadas exclusivamente ao cultivo de inverno. A obtenção de cultivares de verão, que permitem ampliar o período de colheita, foi feita na ESALQ, a partir da década de 40, onde se iniciaram as pesquisas para o desenvolvimento de cultivares tropicais. Do cruzamento entre uma cultivar local de inverno e a cultivar indiana tropical 'Early Market', obteve-se a cultivar Piracicaba Precoce nº 1, com resistência a podridão negra e ao calor, adaptada ao plantio no verão. Utilizando-se esta cultivar, outras de verão foram posteriormente selecionadas, além dos híbridos, com maior estabilidade fenotípica, heterose, uniformidade e qualidade de "cabeças" (Ikuta, 1969).

A cenoura é uma cultura muito sensível às condições ambientais, sendo estas determinantes para a recomendação de cultivares de acordo com o local e época de cultivo. As principais cultivares nacionais são muito suscetíveis ao florescimento prematuro sob condições de baixa temperatura. Esta característica, apesar de ser avaliada como um caráter qualitativo, é quantitativo, trata-se de uma característica de umbral (Cardoso & Della Vecchia, 1995). Atualmente já existem cultivares com maior resistência ao florescimento prematuro, como a 'Prima' e 'Carandaí'.

A região Nordeste do Brasil passou a ser um importante polo de produção de hortaliças, dentre elas o tomate para processamento industrial. Os programas de melhoramento para esta região têm como um dos principais objetivos a capacidade de pegamento de fruto sob condições de temperatura elevada, resultando em uma série de novas cultivares (série IPA).

Utilizando-se, entre outras, populações de cebola adaptadas às condições do Sul e Sudeste, que apresentavam problema com bulbificação prematura quando cultivadas nas condições de fotoperíodo e temperatura elevada no Nordeste, foi possível a obtenção de cultivares melhor adaptadas a estas condições climáticas adversas à cultura.

5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Às vezes a simples alteração da morfologia da planta, ou parte dela, são suficientes para obter-se uma nova população com maior potencial produtivo ou melhor aceitação no mercado. No gênero *Cucurbita* (abóboras e abobrinhas) o caráter

"moita" tem sido bastante estudado, devido à sua importância econômica. Em *C. pepo* todos os híbridos e cultivares de importância econômica no Brasil são do tipo moita. Em *C. maxima* o gene *bush* (*Bu*) foi incorporado na moranga híbrida Alice. Em *C. moschata* a cultivar Menina Brasileira por apresentar tolerância ao mosaico e tipo de fruto diferenciado, sempre teve seu mercado cativo. Entretanto, tem o inconveniente de apresentar hábito de crescimento rasteiro, necessitando de grandes áreas para seu cultivo. A partir da incorporação do gene *Bu* de *C. pepo*, foi lançada a cultivar Piramoita, que possibilita o adensamento de plantio, devido aos entrenós mais curtos.

Em tomateiro, o gene *self-pruning* (*sf*), ou autopoda, condiciona hábito de crescimento determinado, permitindo plantios mais adensados e colheitas mais concentradas nas cultivares visando à produção para a indústria de processamento.

Em ervilha existem cultivares áfilas, em que os folíolos são modificados em gavinhas e com as estípulas reduzidas, aparentando não ter folhas e apresentando o genótipo *afafstst* (Gritton, 1986). O fenótipo semi-áfila é representado pelo genótipo *afafSt__*. O fenótipo áfila favorece a colheita mecanizada.

Em feijão-vagem há predominância de cultivares com crescimento indeterminado, cujas plantas devem ser estaqueadas. Entretanto, existe o fenótipo com porte determinado, com plantas eretas e florescimento concentrado, que é uma opção para o produtor que apresenta restrição quanto à disponibilidade de mão-de-obra para o estaqueamento e à realização de colheitas múltiplas.

Outra característica morfológica importante é a aparência do produto comercial. A aceitação de uma cultivar ou híbrido depende, em grande parte, da sua aparência, principalmente formato e coloração.

Na cultura da cebola, a preferência da maior parte do mercado brasileiro é por bulbos arredondados, de coloração amarela, com casca escura. Apenas alguns mercados específicos do Nordeste e Minas Gerais, há preferência por bulbos roxos. Um único gene dominante, *C*, é necessário para ter-se a coloração arroxeada ou amarela. Todas as plantas com o genótipo *cc* tem bulbos brancos, independentemente de outros genes. O alelo dominante *R*, na presença de *C*, condiciona a coloração arroxeada ao bulbo. Seu alelo recessivo em homozigose, *rr*, com o alelo *C*, produz a coloração amarela. O gene inibidor de cor *I* é incompletamente dominante sobre *i*, sendo que cultivares com o genótipo *II* tem bulbos brancos, independentemente dos genes *C* e *R* (Clarke *et al.*, 1944). Entretanto, segundo Pike (1986), devem existir muitos genes complementares com ação aditiva envolvidos na determinação da coloração dos bulbos.

Existe uma grande variedade de coloração externa de frutos no gênero *Cucurbita*, tais como verde, branco, amarelo e alaranjado, que podem variar na tonalidade e intensidade. Existem cultivares de abobrinha de moita (*C. pepo*) com frutos de diferentes formatos e colorações, sendo mais cultivadas aquelas com frutos cilíndricos de coloração verde-rajada (Cardoso, 1998). Esta coloração rajada é determinada por um gene (*St*) dominante sobre a lisa.

Em pimentão existem fenótipos com frutos verdes, vermelhos, amarelos, creme, roxo, dentre outras colorações. Quanto ao formato, o fruto pode ser quadrado, retangular ou cônico, curtos ou alongados. Entretanto, o melhorista tem que definir a escolha dos genitores de acordo com a exigência do mercado consumidor, quanto

a coloração e formato dos frutos. O mercado brasileiro prefere frutos de coloração verde, quando imaturo e, quando maduro, vermelho, mas também existe mercado para as demais colorações de fruto.

Cada cultura apresenta suas características próprias quanto à morfologia de planta e produto comercial. O melhorista, inicialmente, deve realizar um estudo do mercado para poder definir seus objetivos e, conseqüentemente, escolher os genitores a serem utilizados. O conhecimento da herança genética vai orientá-lo na escolha da metodologia a utilizar no programa do melhoramento.

6. PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS NO MELHORAMENTO DE HORTALIÇAS

Em hortaliças pode-se utilizar qualquer dos métodos de melhoramento existentes. A seguir serão citados alguns que estão entre os mais utilizados.

6.1 INTRODUÇÃO

A introdução de cultivares ou híbridos de outras regiões ou países tem contribuído sobremaneira para a expansão da olericultura no Brasil. Essas introduções são avaliadas para características de interesse e as que se destacam, são recomendadas para cultivo imediato. Ainda hoje, a maioria dos híbridos de repolho é importada, assim como as cultivares de beterraba, rabanete, rúcula, cenoura para o inverno, pepino do tipo japonês, dentre outras espécies.

Entretanto, ressalta-se que a introdução de novas populações, mesmo cultivares e híbridos comerciais, é importante para o estabelecimento de programas de melhoramento, sendo as melhores introduções utilizadas como genitores para a obtenção de novas cultivares. Também pode-se realizar seleção de plantas individuais dentro de introduções que mostrem variabilidade genética, e obter-se novas cultivares.

6.2 RETROCRUZAMENTO

É o método mais utilizado quando se deseja incorporar uma característica mono ou oligogênica em uma cultivar já adaptada. É pouco eficiente para caracteres quantitativos, de baixa herdabilidade. É muito utilizado principalmente para incorporar resistência a patógenos. Assim foi obtido o tomate 'Nemadoro', do cruzamento entre as cultivares Rio Grande e IPA-5 (resistente aos nematóides das galhas), sendo o resultado de quatro retrocruzamentos sucessivos para a cultivar Rio Grande (Pessoa *et al.*, 1988a). O melão 'Eldorado-300' foi obtido após três retrocruzamentos sucessivos para a cultivar Amarelo, em cruzamento com a linhagem W-6, resistente ao oídio (Pessoa *et al.*, 1988b).

Também é muito utilizado na incorporação de genes entre espécies. A incorporação do gene *Bush* (moita) em *C. moschata*, foi realizada a partir de um híbrido de *C. pepo*, após 4 retrocruzamentos com a cultivar de hábito de crescimento rasteiro 'Menina Brasileira', obtendo-se a cultivar Piramoita (Pinto & Costa, 1977). Em tomate, vários genes para resistência a patógenos foram incorporados de espécies não domesticadas (ver item 5.1). Outras características de interesse também foram incorporadas de outras espécies, como o caráter *jointless* (incorporado de *L. cheesmanii*), sempre pelo retrocruzamento com a espécie domesticada.

6.3 MÉTODO GENEALÓGICO (PEDIGREE)

É um dos métodos mais utilizados na obtenção de novas cultivares ou linhagens para produção de híbridos, não só em espécies autógamas, mas também em alógamas. A partir da hibridação obtêm-se populações segregantes, que são autofecundadas sucessivamente para avanço de gerações, com seleção entre e dentro de linhagens, com objetivo de obter-se produtividade e qualidade, com uniformidade. Por ser baseada no comportamento das progênies é um método bastante eficaz, entretanto é um método trabalhoso e dependente de grande quantidade de área e mão-de-obra.

A cultivar de alface 'Elisa' foi selecionada através do método genealógico, a partir do cruzamento entre a cultivar Áurea e uma única planta selecionada do germoplasma que deu origem a cultivar Regina 440. Corresponde a multiplicação, em escala comercial, da linhagem S_7M_1, ou seja, sete gerações de autofecundação (Della Vecchia *et al.*, 1992). Também a cultivar Vera foi obtida por este método após 10 gerações de autofecundação da população obtida pelo cruzamento entre as cultivares Verônica e Slow Bolting (Della Vecchia *et al.*, 1999).

'Jumbo AG-592' é uma cultivar de tomate derivada do cruzamento entre as cultivares Principe Gigante AG-590, Bulgarian 12 e Santa Clara I-5300, obtida após oito gerações de autofecundação (Carrijo, 1991). Também a cultivar de feijão-vagem Andra foi obtida após seleção de uma população segregante pelo método genealógico (Leal, 1990).

Mesmo em uma espécie alógama obtêm-se novas cultivares pelo método genealógico, como é o caso da moranga 'Alice' (*Cucurbita maxima*), selecionada por este método, após cinco gerações de autofecundação de uma população F_6 (Della Vecchia *et al.*, 1991).

6.4 SELEÇÃO MASSAL

Método baseado no desempenho fenotípico de plantas individuais, que se selecionadas são intercruzadas. É mais eficiente quando a seleção ocorre antes do florescimento, como é o caso da cebola. Assim foi obtida a 'Baia Periforme Precoce Piracicaba' selecionada a partir da cultivar local 'Baia Periforme Precoce Lacides', cultivada no Rio Grande do Sul. A cebola 'Alfa Tropical', lançada pela EMBRAPA, foi originada após 11 ciclos de seleção, sendo os quatro primeiros com progênies de meios-irmãos e os seguintes por seleção massal.

Também o repolho 'União' foi obtido por seleção massal a partir de uma população obtida do cruzamento entre diversas cultivares e híbridos (Giordano *et al.*, 1988).

6.5 SELEÇÃO RECORRENTE BASEADA EM PROGÊNIES

Método muito utilizado em espécies alógamas com pronunciada depressão por endogamia, como cebola, cenoura e brássicas.

O método da seleção recorrente baseado no desempenho de progênies de meios-irmãos tem apresentado bons resultados na cultura da cenoura, resultando nas cultivares Kuronan e Brasília (Vieira & Casali, 1984).

Já a cultivar de couve-brócolos Ramoso de Brasília foi obtida após seis ciclos

de seleção entre e dentro de progênies de irmãos germanos a partir de uma população local de Itapecerica da Serra, SP (Melo & Giordano, 1999).

Em cebola, devido à elevada depressão por endogamia, Pike (1986) sugere no máximo duas gerações de autofecundação sucessivas, que devem ser seguidas pelo agrupamento de três a cinco plantas de cada progênie, formando novas progênies "endogâmicas" (*mass*). A cultivar de cenoura Prima foi obtida após quatro gerações de seleção recorrente baseada em progênies de meios-irmãos, seguida de três gerações destas progênies endogâmicas (Cardoso *et al.*, 1992).

6.6 SINGLE SEED DESCENT (SSD)

Método que possibilita a realização de vários ciclos em menor intervalo de tempo, com rápida obtenção de homozigose. Exige menor espaço físico e é menos trabalhoso. Entretanto, não possibilita o intercruzamento de genótipos superiores como na seleção recorrente.

A combinação de seleção pelo método genealógico, em gerações precoces, com SSD, nas subseqüentes, tem mostrado maior eficiência, tanto em tempo quanto em progresso genético, do que o emprego desses métodos isoladamente (Tigchelaar, 1986).

'Tx 401-08' é uma linhagem F_7 de tomateiro oriunda de população segregando para resistência a doenças, caráter *jointless*, cor, firmeza e teor de sólidos solúveis, obtida através do método SSD (Giordano *et al.*, 1997).

6.7 OBTENÇÃO DE LINHAS PURAS POR CULTURA DE ANTERAS

As plantas e tecidos haplóides oferecem um importante instrumento em estudos de citogenética, ação gênica, embriogênese, evolução e melhoramento de plantas. Em melhoramento genético, não só o encurtamento de tempo necessário para a obtenção de homozigose provoca interesse. Segundo diversos pesquisadores da área, o uso de haplóides é vantajoso em relação aos métodos convencionais pela maior confiabilidade da pureza (homozigose) da linhagem que, teoricamente, nunca é obtida totalmente por autofecundações sucessivas, embora se aproxime muito dela.

Os problemas que surgem na produção de haplóides duplicados são a obtenção de indivíduos haplóides e a duplicação dos cromossomos. Com respeito à produção de haplóides, estes podem ser obtidos basicamente de duas maneiras: naturalmente ou por indução artificial.

A baixa freqüência dos haplóides naturais, aliada às dificuldades de sua identificação, têm feito com que os métodos de indução artificial gerem mais expectativas, devido ao maior controle que podem proporcionar.

A obtenção de haplóides tem sido feita de maneira induzida artificialmente, através da cultura de anteras, principalmente. A formulação dos meios, o ambiente para a cultura de antera, o estádio citológico dos micrósporos e o genótipo da espécie cultivada, entre outros, influenciam a produção de plantas haplóides e devem ser considerados ao se procurar obter plantas haplóides de quaisquer espécies.

Him Him (1987) observou grande influência do genótipo da planta doadora, quando trabalhou com diferentes populações F_1 e F_2 de tomateiro. Também em tomate, Jaramillo & Summers (1991) relataram grande influência do genótipo da planta doadora e sua interação com o meio de cultura.

Normalmente flores e plantas relativamente jovens são mais adequadas que os botões florais de plantas que estão no fim de seu período de crescimento. Em geral, não só a idade como também as condições fisiológicas da planta doadora influenciam consideravelmente a eficiência da androgênese.

Outro fator crítico é a seleção de anteras em um estádio apropriado de desenvolvimento. Anteras que variam entre os estádios de tétradas a binucleados respondem melhor a cultura.

Em tomateiro, Him Him (1987) observou que para quaisquer dos genótipos utilizados, o tamanho do botão floral de 5,0 a 6,9 mm foi o que apresentou maior freqüência de indução e formação de calos, tanto para os diferentes híbridos (6,36% a 22,72%), como para as populações F_2 (22,73% a 35,45%). Este tamanho do botão floral corresponde ao estádio de antera com pólen uninucleado. Já Summers *et al.* (1992) relataram que anteras com micrósporos na fase de prófase I eram as que apresentavam maior freqüência de produção de calos, e que quanto mais avançado o estádio de desenvolvimento da antera, menor a freqüência e menor o tamanho dos calos produzidos. Também concluíram que o horário de coleta das anteras (manhã *vs.* tarde) não afetava a produção de calos em tomateiro.

A composição do meio é um dos fatores importantes no sucesso da cultura de anteras. Segundo Moraes Fernandes (1990) não existe uma recomendação geral, e as variações dependem de ajustes para a espécie e até para o genótipo.

Existem diversos meios básicos, sendo que Reinert & Bajaj (1977) apresentaram a composição de alguns destes meios básicos. Na maioria das espécies, a androgênese se verifica em meio que contém sais minerais, sacarose, vitaminas, ágar e também faz-se a adição de reguladores de crescimento balanceados entre auxinas e citocininas.

Porém, deve-se ressaltar que a maior parte dos trabalhos envolvendo a cultura de anteras, com exceções, tem apresentado um nível de freqüência de haplóides bastante baixa, além de se verificar o aparecimento de poliplóides, aneuplóides e indivíduos albinos.

Em geral, as plantas haplóides são estéreis e a manutenção dessa linhagem para produção de sementes, para a manipulação genética e para sua utilização em programas de melhoramento, exige o restabelecimento da condição diplóide.

Os métodos empregados para a duplicação dos cromossomos são variados. Geralmente ocorre a duplicação espontânea ou esta pode ser provocada pela utilização de determinadas substâncias que promovem a duplicação.

Apesar de sua larga utilização, a colchicina apresenta algumas limitações como a mutagenicidade e aparecimento de plantas com altos níveis de ploidia (Burk *et al.*, 1972).

A obtenção de linhagens puras pelo método de cultura de anteras é uma técnica interessante, que pode ajudar o melhorista a ganhar tempo no seu programa. Porém, a grande barreira a esta técnica é a pequena eficiência. Para se obter um número suficiente de plantas haplóides duplicadas, é necessário se cultivar um número exageradamente grande de anteras, e isto pode gerar custos muito elevados, além da possível perda de genótipos interessantes que não sejam facilmente regeneráveis por esta técnica.

Em comparação às metodologias tradicionais, sem contar o fator acima citado, em espécies autógamas pode ser muito útil, tanto que são nestas que se têm relatado

os maiores sucessos, principalmente em arroz, trigo e cevada. Entretanto, ainda apresenta mais uma limitação, para as características onde a ligação gênica é importante, pois é uma técnica que não favorece o aumento da freqüência de indivíduos recombinantes.

Em relação às alógamas, apresenta a grande restrição de, por não possibilitar nenhum tipo de seleção, natural ou artificial, durante o processo de obtenção das linhagens, acarretar acentuada depressão por endogamia, além da já citada redução da freqüência de indivíduos recombinantes. Porém, estes dois problemas poderiam ser reduzidos se, ao invés de se tentar obter plantas haplóides duplicadas diretamente das gerações F_1 ou F_2 (como normalmente é feito), fossem trabalhadas populações sob seleção recorrente. Este tipo de população é apropriada para se obter linhagens, pois a carga genética é reduzida, a freqüência de alelos favoráveis é aumentada e a recombinação entre os genótipos superiores é favorecida.

Portanto, para que esta técnica seja de aplicabilidade rotineira um problema deve ser resolvido, ou seja, maior eficiência na obtenção de plantas haplóides duplicadas, com conseqüente redução dos custos.

7. PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS EM HORTALIÇAS

Para a obtenção de híbridos em hortaliças, diversas metodologias são utilizadas, algumas delas dependentes da incorporação de genes, ou citoplasmas, específicos. A seguir serão brevemente explicadas as principais metodologias utilizadas.

7.1 UTILIZAÇÃO DE MACHO-ESTERILIDADE

Em cebola, a produção de sementes híbridas é baseada na macho-esterilidade genético citoplasmática. Para ser macho-estéril a planta deve possuir o fator citoplasmático S (herança exclusivamente materna) e o genótipo *msms*, ou seja, ausência do gene para restauração da fertilidade *Ms*. A linhagem materna será S *msms* e o polinizador (linhagem paterna) deve ser macho fértil e, preferencialmente N *msms*, a fim de impedir a possibilidade de obtenção de sementes F_2. Para manutenção da linhagem macho-estéril há a necessidade de uma linhagem isogênica a esta materna, inclusive quanto ao loco *ms*, apenas com o fator citoplasmático N, que condiciona a macho fertilidade, denominada linhagem mantenedora – N *msms* (Melo & Ribeiro, 1990). Ultimamente, tem sido divulgado o uso de técnicas de propagação vegetativa *in vitro* na manutenção e multiplicação das linhagens macho-estéreis, sem a necessidade de linhagens mantenedoras. Esse procedimento, à medida que for empregado em maior escala, poderá encurtar, significativamente, o tempo normalmente requerido no desenvolvimento de híbridos em cebola pelo esquema tradicional. A metodologia de identificação das linhagens materna e mantenedora estão descritas por Pike (1986) e Melo & Ribeiro (1990).

Em cenoura a produção de híbridos também é feita com a utilização de macho-esterilidade genético citoplasmática. Apenas a herança genética é um pouco diferente do que ocorre em cebola, envolvendo um maior número de genes restauradores da fertilidade (Thompson, 1962; Hansche & Gabelman, 1963). O esquema é semelhante, existindo três linhagens: a materna, a paterna e a mantenedora da esterilidade.

Em brássicas também existem estudos sobre a utilização de macho-esterilidade citoplasmática incorporada a partir de *Brassica nigra* (citoplasma N) e *Raphanus sativus* (citoplasma R) (Ogura, 1968; Pearson, 1972). Entretanto, a auto-incompatibilidade ainda é o processo utilizado em larga escala para produção de sementes de híbridos neste grupo de culturas.

7.2 UTILIZAÇÃO DE AUTO-INCOMPATIBILIDADE

É um mecanismo muito comum nas brássicas, onde ocorre a incompatibilidade esporofítica (Thompson, 1957). A auto-incompatibilidade em brássicas é condicionada por um loco gênico (S), com alelismo múltiplo. A manifestação deste fenômeno consiste na não fecundação do óvulo por grãos de pólen da própria planta ou de outra portadora de alelos de incompatibilidade iguais, resultando na ausência ou na drástica redução do número de sementes por síliqua (Thompson & Taylor, 1971). A compreensão deste sistema e o início da sua utilização marcaram o surgimento dos primeiros híbridos comerciais no gênero *Brassica* (Ikuta, 1974; Giordano, 1983; Silva, 1985; Riggs, 1988).

Para estabelecer um programa de híbridos em brássicas através deste mecanismo é necessário seguir as seguintes etapas (Ikuta, 1969): a) identificação de plantas auto-incompatíveis S_0; b) obtenção e reconhecimento de linhagens homozigotas para este loco gênico; c) manutenção das linhagens auto-incompatíveis; d) produção do híbrido F_1 entre linhagens. Uma vez obtida(s) a(s) linhagem(ns) homozigótica(s) para auto-incompatibilidade, o híbrido é produzido plantando-se em fileiras intercaladas as linhagens genitoras e as sementes colhidas nas plantas da linhagem auto-incompatível serão sementes híbridas. Se ambas as linhagens forem auto-incompatíveis, mas compatíveis entre si, ou seja, com alelos que conferem auto-incompatibilidade diferentes, obtêm-se dois híbridos recíprocos, cujas sementes poderão ser misturadas, ou não, a critério da empresa responsável pela produção (Maluf & Corte, 1990).

7.3 UTILIZAÇÃO DE GINOICISMO

Este é o método utilizado na produção de sementes híbridas de pepino, e consiste no plantio de uma linhagem materna ginóica, ou seja, que só produz flores femininas, que será polinizada por uma outra linhagem, geralmente monóica (flores masculinas e femininas). Também pode ser utilizada uma linhagem polinizadora ginóica, mas, neste caso, deve-se aplicar algum fitorregulador para induzir a formação de flores masculinas nesta linhagem polinizadora.

O problema neste sistema é a manutenção da linhagem ginóica, pois ela não produz flores masculinas. Esta manutenção depende da indução de flores masculinas, o que é obtido utilizando-se, principalmente, solução de tiossulfato de prata ou ácido giberélico. Segundo Tolla & Peterson (1979) o uso de sais com o íon prata é mais efetivo que o ácido giberélico, pois nem todas as plantas respondem igualmente, sendo o tratamento com este fitorregulador (ácido giberélico) mais efetivo nas plantas com maior tendência masculina e, portanto, haveria uma seleção negativa contra a estabilidade do ginoicismo da linhagem tratada.

Estes produtos também devem ser utilizados para a reversão sexual de todas as plantas da linhagem paterna, quando esta for ginóica (no caso de híbridos entre

duas linhagens ginóicas), para que produzam flores masculinas em abundância para polinização da linhagem materna e obtenção da semente híbrida.

Ressalta-se que a expressão sexual em pepino é controlada por três locos gênicos principais (Lower & Edwards, 1986), sendo que para ser ginóica a planta deve apresentar o genótipo m^+m^+ FF __, enquanto que a monóica apresenta o genótipo m^+m^+ F^+F^+ __. O terceiro loco gênico (a^+, a) é responsável pelo fenótipo plantas andróicas (somente flores masculinas) e somente se manifesta na presença do genótipo m_ F^+F^+.

7.4 INDUÇÃO DO GINOICISMO

Em algumas cucurbitáceas monóicas, principalmente abobrinha e pepino, a produção de híbridos pode ser feita com a aplicação de fitorreguladores para indução do ginoicismo. Se o tratamento for efetivo, basta tratar as plantas da linhagem materna e obtém-se, assim, uma linhagem temporariamente ginóica, que deve ser polinizada por uma linhagem paterna monóica.

Embora as flores nas cultivares monóicas sejam estaminadas ou pistiladas, as gemas florais embrionárias são bissexuais. Durante o desenvolvimento da flor ocorre uma supressão no desenvolvimento do pistilo ou estame, resultando em flores unissexuais (Frankel & Galun, 1977). Este mecanismo de determinação do sexo é o resultado de fatores genéticos e ambientais que atuam nos primórdios florais e ocorre devido ao balanço hormonal na planta (Galun *et al.*, 1963). Friedlander *et al.* (1977) sugerem que o etileno participa da regulação endógena da expressão sexual, favorecendo a feminilidade, cuja intensidade depende dos níveis de etileno, da constituição genética da planta e das condições ambientais (Loy, 1971).

O ethephon é um regulador de crescimento que, quando aplicado em diversas cucurbitáceas, promove a liberação de etileno nos tecidos das plantas tratadas. Sabe-se que os melhores resultados para a indução de ginoicismo, visando à produção de sementes híbridas, têm sido obtidos com a aplicação de ethephon nos estádios de 1ª a 5ª folha definitiva, em concentrações do produto variando de 100 a 600 ppm (Lower & Miller, 1969; Robinson *et al.*, 1970; Nagai, 1975; Shannon & Robinson, 1979; Peixoto *et al.*, 1989; George, 1999). Entretanto, o efeito do ethephon depende do genótipo utilizado (Peixoto *et al.*, 1989), sendo que a tecnologia de aplicação deve ser ajustada para cada linhagem pelo produtor de sementes (Whitaker & Robinson, 1986).

7.5 POLINIZAÇÃO E/OU EMASCULAÇÃO MANUAL

Em cucurbitáceas é um método usado quando o ginoicismo inexiste ou é de utilização inviável. É utilizado principalmente na produção de sementes de híbridos interespecíficos de *C. maxima x C. moschata*, abóbora, abobrinha, melão, melancia e pepino monóico. Quando a flor for hermafrodita, por exemplo melão andromonóico, é feita a eliminação dos órgãos masculinos, na fase de botão, para depois realizar-se a polinização manual (explicada no item 4.3 a). Quando a espécie for monóica a emasculação é realizada eliminando-se todos os botões florais masculinos. Neste caso, a polinização manual passa a ser desnecessária, visto que com a eliminação de todos os botões florais masculinos do genitor materno, este se comportará como uma planta ginóica.

No caso das solanáceas, praticamente 100% das sementes híbridas são obtidas por polinizações manuais, visto serem espécies autógamas (ver item 4.2.2) com flores hermafroditas. A metodologia de polinização manual é a mesma já descrita no item 4.3 b. Quanto ao valor unitário, são as sementes mais valorizadas, podendo alcançar cifras acima de 20 mil dólares o quilo. Para a produção destas sementes híbridas há a necessidade de mão-de-obra altamente qualificada, necessária para que se obtenha bons rendimentos e segurança de qualidade genética (ausência de contaminantes). Em tomate são necessárias cerca de 16.000 polinizações manuais para se obter um quilo de sementes híbridas (Alencar, 1993).

7.6 OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS TRIPLÓIDES EM MELANCIA

Existem melancias que produzem frutos sem sementes. São todas híbridas triplóides. As sementes destes híbridos triplóides são obtidas pelo cruzamento entre uma linhagem materna tetraplóide e uma paterna diplóide. As linhagens tetraplóides são obtidas pelo tratamento de diplóides com colchicina (0,2% a 0,4%), resultando na duplicação do número de cromossomos. O triplóide resultante é estéril e não produz sementes viáveis (Maynard & Elmstrom, 1992).

A fertilidade e, conseqüentemente, a produção de sementes, desta linhagem tetraplóide é reduzida, encarecendo a produção de sementes. Normalmente toda a polinização é realizada manualmente, transferindo-se o pólen de plantas da linhagem paterna diplóide para as flores femininas da linhagem materna tetraplóide.

Embora as plantas triplóides sejam estéreis, suas flores femininas podem produzir frutos se forem polinizadas por pólen viável. Por isto há a necessidade de uma cultivar ou híbrido diplóide como polinizador no campo de produção da melancia sem semente. Embora não haja produção de sementes com esta polinização, pois os óvulos não se desenvolvem pela esterilidade provocada pela condição triplóide (Lower & Johnson, 1969) ela é necessária para que ocorra indução do crescimento do fruto, pela liberação de reguladores de crescimento pelos grãos de pólen viáveis. Esta cultivar ou híbrido polinizador deve apresentar frutos com características morfológicas distintas do híbrido triplóide, para que possam ser distinguidos na colheita.

8. UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM HORTALIÇAS

O melhoramento genético de plantas tem sido praticado empiricamente desde os primórdios da civilização. Em geral, melhoramento genético pode ser alcançado a partir do momento em que exista variabilidade genética e que o efeito ambiental não a mascare por completo. Desta forma a seleção de genótipos superiores pode ser realizada com o fim de se eleger as melhores plantas, das quais serão retirados propágulos para o próximo plantio.

Com a redescoberta das leis de Mendel, no início do século XX, grande atenção tem sido voltada para a compreensão dos mecanismos básicos que propiciam a obtenção de materiais melhorados. O acúmulo de informações nesta área tem sido relacionado ao uso de técnicas que aceleram e/ou tornam mais eficiente a avaliação, seleção e recombinação de genótipos superiores.

A palavra marcadores tem sido utilizada para designar características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou genéticas passíveis de serem identificadas e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênies. A identificação de marcadores morfológicos apropriados e o estudo comparativo de genótipos de ervilha e de suas progênies permitiram Mendel lançar os fundamentos da Genética. A aplicação de marcadores na investigação científica precede, pois, o conhecimento da própria genética.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995) marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Existem, atualmente, vários tipos de marcadores de DNA, que são geralmente conhecidos por suas siglas. Por exemplo, marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) são polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA's*) são DNAs polimórficos amplificados ao acaso, SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) são regiões amplificadas de seqüências caracterizadas.

As técnicas modernas de biologia molecular permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como na prática de melhoramento de plantas.

8.1 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NOS ESTUDOS DE EVOLUÇÃO E TAXONOMIA

Melhoramento, classificação de espécies e estudos de evolução são baseados na variabilidade genética. Em populações de plantas, variabilidade e parentesco têm sido tradicionalmente baseados em características morfológicas como coloração de flores, tamanho e forma de folhas e flores, altura de plantas, dentre outras. Recentemente, a facilidade e rapidez em obter dados com os marcadores moleculares fez destas técnicas ferramentas úteis no estudo da variabilidade genética em várias culturas hortícolas, em estudos evolutivos e de taxonomia. Na Tabela 5 têm-se alguns exemplos de utilização de marcadores moleculares nestas linhas de pesquisa, onde se destacam os estudos com as brassicáceas e solanáceas.

TABELA 5. Exemplos de utilização de marcadores moleculares em estudos de taxonomia e evolução de hortaliças

Espécie / gênero	Referência
Alface	Kesseli *et al.* (1991); Wa[illegible] & Fort (1994)
Allium spp.	Havey (1992); Wilkie *et al.* (1993); Maab & Klaas (1995)
Berinjela	Karihaloo *et al.* (1995)
Beterraba	Jung *et al.* (1993)
Brássicas	Quiros *et al.* (1991); Demeke *et al.* (1992); Dias *et al.* (1992); Maluszynska & Heslop-Herrison (1993); Nienhuis *et al.* (1993)
Ervilha x Lentilha	Weeden *et al.* (1992)
Pimenta	Panda *et al.* (1986); Prince *et al.* (1992)
Tomate	Klein-Lankhorst *et al.* (1991); Williams & StClair (1993)
Tomate x pimentão	Prince *et al.* (1993)
Tomate x pimentão x berinjela	Tanksley (1983)

8.2 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO MAPEAMENTO GENÉTICO

Um completo mapeamento do genoma de uma espécie (construção de mapas saturados) pode servir não só para a localização de genes específicos ou grupos de ligação para seleção assistida, como também para possibilitar a clonagem de genes de interesse. Na Tabela 6 têm-se alguns exemplos de utilização de marcadores moleculares na construção de mapas genéticos e identificação de grupos de ligação em espécies olerícolas, onde, novamente, destacam-se as solanáceas.

8.3 MARCADORES ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE IMEDIATO NO MELHORAMENTO

Em geral, a metodologia utilizada para detectar ligação entre marcadores moleculares e locos de herança simples ou QTL (*Quantitative Trait Loci*), envolve análises de populações F_2 ou retrocruzamentos que segregam para a expressão do caráter e para as marcas. A maioria dos estudos parte de supostas ligações, buscando genótipos contrastantes no caráter de interesse e em loco de marcador molecular. Na Tabela 7 têm-se alguns exemplos de utilização de marcadores moleculares associados a características de interesse imediato no melhoramento de hortaliças, onde se destaca a cultura do tomateiro, com grande número de trabalhos já publicados.

8.4 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES

A determinação da pureza genética de linhagens ou híbridos no controle de qualidade dos lotes de sementes é de grande importância no melhoramento, produção e comercialização de sementes, não só pela qualidade em si da semente, como também para se explorar todo o potencial do híbrido. Os contaminantes geralmente são sementes originadas da autofecundação de flores do genitor feminino (ou cruzamento entre plantas deste) e, geralmente, apresentam menor vigor.

As firmas produtoras de sementes devem monitorar a pureza genética de seus híbridos antes de vender os lotes de semente plantando-as e verificando a ocorrência de plantas atípicas. Entretanto, isto requer grande quantidade de mão-de-obra, tempo e espaço.

TABELA 6. Exemplos de mapas genéticos e grupos de ligação obtidos com marcadores moleculares em hortaliças.

Espécie	Referência
Aipo	Yang & Quiros (1995)
Alface	Landry *et al.* (1987); Kesseli *et al.* (1994)
Brássicas	Figdore *et al.* (1988); Kennard *et al.* (1994b)
Cenoura	Schulz *et al.* (1994)
Ervilha	Dirlewanger *et al.* (1994)
Pepino	Kennard *et al.* (1994a)
Pimentão/Pimenta	Pochard & Vaulx (1982); Prince *et al.* (1993); Lefebvre *et al.* (1995)
Tomate/Batata	Miller & Tanksley (1990); Tanksley *et al.* (1992); Weide *et al.* (1993)

TABELA 7. Exemplos de características associadas a marcadores moleculares em hortaliças.

Espécie	Característica	Referência
Abóbora	Resistência a WMV-2	Weeden *et al.* (1984)
Alface	Resistência a míldio	Farrara *et al.* (1987); Witsenboer *et al.* (1995)
Beterraba	Pendoamento lento	Boudry *et al.* (1994)
Ervilha	Resistência a diversas doenças	Dirlewanger *et al.* (1994)
Melancia	Resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*	Biles *et al.* (1989)
Melancia	Cor da polpa e sabor	Navot *et al.* (1990)
Melancia	Resistência a ZYMV e tolerância ao frio	Provvidenti (1991)
Melão	Resistência a oídio	Reuveni & Bothma (1985)
Tomate	Resistência a nematóides (*Meloidogyne* spp.)	Medina Filho (1983); Messeguer *et al.* (1991)
Tomate	Resistência a *Verticilium dahliae*	Reuveni & Ferreira (1984)
Tomate	Resistência a TMV	Young *et al.* (1988)
Tomate	Resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	Bournival *et al.* (1989); Ori *et al.* (1994)
Tomate	Resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	Martin *et al.* (1991); Martin (1994)
Tomate	Teor de sólidos solúveis	Garvey & Hewitt (1992)
Tomate	Tolerância à salinidade	Foolad & Jones (1993)
Tomate	Gene j (*jointless*)	Wing *et al.* (1994)
Tomate	Tomate "longa vida" (genes *rin* e *nor*)	Giovannoni *et al.* (1995)
Tomate	Peso de fruto e de sementes	Goldman *et al.* (1995)

Isoenzimas vêm sendo utilizadas nas brássicas para identificar híbridos e checar pureza genética de lotes de sementes. Arús *et al.* (1982) obtiveram valores de contaminação em híbridos de diferentes *Brassica oleracea* (couve-flor, couve-brócolos e repolho) variando de 1,5% a 40,1%. Assim, concluíram que os melhoristas devem buscar alelos de incompatibilidade (método usual de produção de híbridos nesta espécie) mais estáveis ou, então, macho-esterilidade para reduzir estas contaminações.

Já Nienhuis *et al.* (1993) avaliaram a pureza genética em diferentes híbridos de *Brassica oleracea* utilizando marcadores RFLP, também obtendo resultados satisfatórios na diferenciação dos híbridos e seus genitores.

Atualmente muitas companhias produtoras de sementes de hortaliças no Brasil já estão utilizando, pelo menos parcialmente, estas técnicas no controle de qualidade (pureza genética) de seus lotes de sementes híbridas, que já são maioria, quando comparados às cultivares de polinização aberta, e com tendência a aumentar.

A competição pelo mercado brasileiro de sementes de hortaliças tem-se tornado mais acirrada nos últimos anos. Algumas empresas multinacionais já instalaram aqui suas filiais, enquanto outras estão em fase de estudos para a implantação de suas bases no Brasil. Nesta competição a qualidade do híbrido é fundamental para que a empresa ganhe credibilidade e, conseqüentemente, mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. Produção mundial de sementes de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.191-192, 1993.

ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento de plantas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 301p.

ARÚS, P.; TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J.; JONES, R.A. Electrophoretic variability as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties in *Brassica oleracea*. **Euphytica**, v.31, p.417-428, 1982.

BILES, C.L.; MARTIN, R.D.; WILSON, H.D. Isozymes and general proteins from various watermelon cultivars and tissue types. **HortScience**, v.24, p.810-812, 1989.

BOUDRY, P.; WIEBER, R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; PILLEN, K.; Van DIJK, H.; JUNG, C. Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene B and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.852-858, 1994.

BOURNIVAL, B.L.; SCOTT, J.W.; VALLEJOS, C.E. An isozyme maker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.489-494, 1989.

BURK, L.G.; GWYNN, G.R.; CHAPLIN, J.F. Diploidized haploids from asseptically cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. **Journal of Heredity**, v.63, p.355-360, 1972.

BUSO, J.A.; NASCIMENTO, W.M. O papel das instituições oficiais de pesquisa e desenvolvimento na indústria de sementes de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.244-250, 1994.

CARDOSO, A.I.I. A cultura da abobrinha de moita. In: GOTO, R.; TIVELLI, S.W. (Ed.) **Produção de hortaliças em ambiente protegido**: condições subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da Unesp, 1998. p.105-135.

CARDOSO, A.I.I.; DELLA VECCHIA, P.T. Considerações sobre o florescimento prematuro e suas implicações para o melhoramento de cenoura para primavera. **Horticultura Brasileira**, v.13, p.146-149, 1995.

CARDOSO, A.I.I.; DELLA VECCHIA, P.T.; TAKAZAKI, P.E.; TERENCIANO, A. 'Prima': nova cultivar de cenoura resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, v.10, p.44-45, 1992.

CARRIJO, I.V. 'Jumbo AG-592': nova cultivar de tomate. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.97, 1991.

CASALI, V.W.D. O impacto da lei de propriedade industrial e de proteção de cultivares na olericultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.154-156, 1997. Suplemento.

CLARKE, A.E.; JONES, H.A.; LITTLE, T.M. Inheritance of bulb color in the onion. **Genetics**, v.29, p.569-575, 1944.

CURRAH, L.; OCKENDON, D.J. Protandry and the sequence of flower opening in the onion (*Allium cepa* L.). **New Phytologist**, v.81, p.419-428, 1978.

DELLA VECCHIA, P.T.; KOCH, P.S.; KIKUCHI, M. Vera: noa cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, v.10, p.44, 1992.

DELLA VECCHIA, P.T.; TAKAZAKI, P.E.; KIKUCHI, M.; TERENCIANO SOBRINHO, P. Elisa: nova cultivar de alface para cultivo no verão. **Horticultura Brasileira**, v.17, p.171, 1999.

DELLA VECCHIA, P.T.; TAKAZAKI, P.E.; TERENCIANO, A.; COSTA, C.P. 'Alice': nova cultivar de moranga com hábito de crescimento moita. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.27, 1991.

DEMEKE, T.; ADAMS, R.P.; CHIBBAR, R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.990-994, 1992.

DIAS, J.S.; LIMA, M.B.; SONG, K.M.; MONTEIRO, A.A.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Molecular taxonomy of Portuguese tronchuda cabbage and kale landraces using nuclear RFLPs. **Euphytica**, v.58, p.221-229, 1992.

DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P.G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R.; de VIENNE, D. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.17-27, 1994.

FARRARA, B.F.; ILOTT, T.W.; MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). **Plant Pathology**, v.36, p.499-514, 1987.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.

FIGDORE, S.S.; KENNARD, W.C.; SONG, K.M.; SLOCUM, M.K.; OSBORN, T.C. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.833-840, 1988.

FOOLAD, M.R.; JONES, R.A.; Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait based marker analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.184-192, 1993.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Monographs on theorethical and applied genetics**: 2. Pollination mechanisms, reproduction, and plant breeding. New York: Springer-Verlag, 1977. 281p.

FRIEDLANDER, M.; ATSMON, D.; GALUN, E. The effect of grafting on sex expression in cucumber. **Plant and Cell Phisiology**, v.18, p.1343-1350, 1977.

GALUN, E.; JUNG, Y.; LANG, A. Morphogenesis of floral buds of cucumber cultured *in vitro*. **Developmental Biology**, v.6, p.370-387, 1963.

GARVEY, T.C.; HEWITT, J.D. Use of molecular markers to locate quantitative trait linked to high soluble solids content in a hybrid of *Lycopersicon cheesmanii*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.117, p.497-499, 1992.

GEORGE, R.A.T. **Vegetable seed production**. Cambridge: CAB Publishing, 1999. 328p.

GIORDANO, L.B. Macho-esterilidade e sua utilização na produção de sementes híbridas de Brássicas. **Horticultura Brasileira**, v.1, p.11-13, 1983.

GIORDANO, L.B.; SILVA, N.; BUSO, J.A. União: nova cultivar de repolho para o verão. **Horticultura Brasileira**, v.6, p.39, 1988.

GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; SANTOS, J.R.M.; CHARCHAR, J.M.; LOPES, C.A. 'Tx 401-08': linhagem de tomate para processamento industrial, com resistência múltipla a doenças. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.123-126, 1997.

GIOVANNONI, J.J.; NOENSIE, E.N.; RUEZINSKY, D.M.; LU, X.H.; TRACY, S.L.; GANAL, M.W.; MARTIN, G.B.; PILLEN, K.; ALPERT, K.; TANKSLEY, S.D. Molecular genetic analysis of the ripening inhibitor and non ripening loci of tomato: a first step in genetic map based cloning of fruit ripening genes. **Molecular and General Genetics**, v.248, p.195-206, 1995.

GOLDMAN, I.L.; PARAN, I.; ZAMIR, D. Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *L. cheemanii* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.925-932, 1995.

GREENLEAF, W.H. Pepper breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.3, p.69-134.

GRITTON, E.T. Pea breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.8, p.283-319.

HANSCHE, P. E.; GABELMAN, W. H. Phenotypic stability of pollen sterile carrots, *Daucus carota* L. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.82, p.341-350, 1963.

HAVEY, M.J. Restriction enzyme analysis of the nuclear 45S ribosomal DNA of six cultivated alliums (Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.181, p.45-55, 1992.

HIM HIM, P.V. Determinação de metodologias para cultura de anteras de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 129p. Tese, Doutorado.

IKUTA, H. Utilização da auto-incompatibilidade na variedade de couve-flor de verão 'Piracicaba Precoce nº 1' para produção de sementes híbridas F_1. **Relatório Científico do Depto. de Genética**, Piracicaba, p.71-73, 1969.

IKUTA, H. Híbridos F_1 de couve-flor 'Piracicaba' x 'Gigante de Teresópolis'. **Relatório Científico do Depto. de Genética**, Piracicaba, p.76-77, 1974.

JARAMILLO, J.; SUMMERS, W.L. Dark light treatments influence induction of tomato anther culture. **HortScience**, v.26, p.915-916, 1991.

JUNG, C.; PILLEN, K.; FRESE, L.; FÄHR, S.; MELCHINGER, A.E. Phylogenetic relationships between cultivated and wild species of the genus *Beta* revealed by DNA "fingerprinting". **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.449-457, 1993.

KARIHALOO, J.L.; BRAUNER, S.; GOTTLIEB, L.D. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanacea). **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.767-770, 1995.

KENNARD, W.C.; POETTNER, K.; DIJKHUIZEN, A.; MEGLIC, V.; STAUB, J.E.; HAVEY, M.J. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.42-48, 1994a.

KENNARD, W.C.; SLOCUM, M.K.; FIGDORE, S.S.; OSBORN, T.C. Genetic analysis of morphological variation in *Brassica oleracea* using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.721-732, 1994b.

KESSELI, R.; PARAN,I.; MICHELMORE, R.W. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* L. (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. **Genetics**, v.136, p.1435-1446, 1994.

KESSELI, R.; OCHOA, O.; MICHELMORE, R. Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). **Genome**, v.34, p.430-436, 1991.

KLEIN-LANKHORST, R.M.; VERMUNT, A.; WEIDE, R.; LIHARSKA, T.; ZABEL, P. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.108-114, 1991.

KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; KIMOTO, T.; REGO, G.D.O. Agrocica Botu 7, 9 e 13: novas cultivares de tomate para indústria. **Horticultura Brasileira**, v.8, p.34-36, 1990.

LANDRY, B.S.; KESSELI, R.V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R.W. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Genetics**, v.116, p.331-337, 1987.

LEAL, N.R. Andra: nova cultivar de feijão-de-vagem. **Horticultura Brasileira**, v.8, p.29, 1990.

LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; POCHARD, E. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. **Genome**, v.38, p.112-121, 1995.

LOWER, R.L.; MILLER, C.H. Ethrel (2-chloroethanephosphonic acid): a tool for plant hybridizers. **Nature**, n.222, p.1072-1073, 1969.

LOWER, R.L.; EDWARDS, M.D. Cucumber breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport:: Avi Publishing, 1986. cap.5, p.173-207.

LOWER, R.L.; JOHNSON, K.W. Observations on sterility of induced autotetraploid watermelons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.94, p.367-369, 1969.

LOY, J.B. Effects of 2-chloroethylphosphonic acid and succinic acid-2,2-dimethylhydrazide on sex expression in muskmelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.96, p.641-644, 1971.

MAAB, H.I.; KLAAS, M. Infraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.89-97, 1995.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D. Produção de sementes de couve-flor. In: CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. p.77-93.

MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HERRISON, J.S. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. **Genome**, v. 36, p.774-781, 1993.

MARTIN, G.B. Analysis of the molecular basis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistance in tomato. **Euphytica**, v.79, p.187-193, 1994.

MARTIN, G.B.; WILLIAMS, G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato using random primers and near isogenic lines. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, v.88, p.2336-2340, 1991.

MAYNARD, D.N.; ELMSTROM, G.W. Triploid watermelon production practices and varieties. **Acta Horticulturae**, n.318, p.169-178, 1992.

MEDINA FILHO, H.P. **Eletroforese em gel de amido**: aplicações em genética e melhoramento de plantas. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 15p.

MELO, P.C.T. **Melhoramento genético do tomateiro** (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Campinas,1989. 55p.

MELO, P.C.T. Hortaliças no Brasil: 500 anos de sabor, aroma e saúde. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.42-43, 2000. Suplemento.

MELO, P.C.T.; RIBEIRO, A. Produção de sementes de cebola: cultivares de polinização aberta e híbridos. In: CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV, FUNEP, 1990. p.15-59.

MELO, P.E.; GIORDANO, L.B. 'Ramoso de Brasília': nova cultivar de couve-brócolos. **Horticultura Brasileira**, v.17, p.172-173, 1999.

MESSEGUER, R.; GANAL, M.; VICENTE, M.C.de; YOUNG, N.D.; BOLKAN, H.; TANKSLEY, S.D. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (Mi) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.529-536, 1991.

MILLER, J.C.; TANKSLEY, S.D. Effect of different restriction enzymes, probe source, and probe length on detecting restriction fragment length polymorphism in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.385-389, 1990.

MING, L.C. O reconhecimento do papel das populações tradicionais no melhoramento e conservação de espécies vegetais. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.145-148, 1997. Suplemento

MORAES FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/CNPH, 1990. p.311-332.

NAGAI, H. Efeito do "ethrel" e de ambiente sobre floração de abobrinha. **Revista de Olericultura**, v.15, p.108-110, 1975.

NAVOT, N.; SARFATTI, M.; ZAMIR, D. Linkage relationship of genes affecting bitterness and flesh color in watermelons. **Journal of Heredity**, v.81, p.162-165, 1990.

NIENHUIS, J.; SLOCUM, M.K.; DeVOS, D.A.; MUREN, R. Genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes as measured by restriction fragment length polymorphism. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, p.298-303, 1993.

NIEUWHOF, M. **Cole crops**. London: World Crops Books, 1969. 353p.

OGURA, H. Studies on the new male sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this sterility toward practical raising of hybrid seeds. **Mem. Fac. Agric. Kagoshima University**, v.6, p.39-78, 1968.

ORI, N.; PARAN, I.; AVIV, D.; ESHED, Y.; TANKSLEY, S.D.; ZAMIR, D.; FLUHR, R. A genomic search for the gene conferring resistance to *Fusarium* wilt in tomato. **Euphytica**, v.79, p.201-204, 1994.

PANDA, R.C.; KUMAR, O.A.; RAO, K.G.R. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationships in Chili pepper (*Capsicum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.665-670, 1986.

PEARSON, O.J. Cytoplasmically inherited male sterility characters and flavor components for the species cross *Brassica nigra x B. oleracea*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.97, p.397-420, 1972.

PEIXOTO, N.; CASALI, V.W.D.; ALMEIDA, A.H.B.; SERAPHIN, J.C. Efeito do ethephon na expressão sexual de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v.7, p.20-21, 1989.

PESSOA, H.B.S.V.; ÁVILA, A.C.; DELLA VECCHIA, P.T.; ARAÚJO, J.P.; OLIVEIRA, L.O.B. Eldorado-300: melão resistente ao vírus do mosaico da melancia, WMV-1. **Horticultura Brasileira**, v.6, p.40-41, 1988b.

PESSOA, H.B.S.V.; MIRANDA, J.E.C.; MALUF, W.R.; HUANG, S.P. Nemadoro: tomate para indústria, resistente ao nematóide das galhas. **Horticultura Brasileira**, v.6, p.41-42, 1988a.

PETERSON, C.E.; SIMON, P.W. Carrot breeding. In: BASSET, M.J. (ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.9, p.321-356.

PIKE, L. Onion breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.10, p.357-394.

PINTO, C.A.B.P.; COSTA, C.P. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: Depto. Genética ESALQ/USP, 1977. 317p. /Apostila/

POCHARD, E.; VAULX, R.D. Localization of vy2 and fa genes by trisomic analysis. **Capsicum Newsletter**, v.11, p.11-18, 1982.

PRINCE, J.P.; FIGUEROA, F.L.; TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. **Genome**, v.35, p.726-732, 1992.

PRINCE, J.P.; POCHARD, E.; TANKSLEY, S.D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**, v.36, p.404-417, 1993.

PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to the Florida strain of Zucchini Yellow Virus in watermelon. **HortScience**, v.26, p.407-408, 1991.

QUIROS, C.F.; HU, J.; THIS, P.; CHEVRE, A.M.; DELSENY, M. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.627-632, 1991.

REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Spring-Verlag, 1977. 803p.

REUVENI, R.; BOTHMA, G.C. The relationship between peroxidases activity and resistance to *Sphaeroteca fuliginea* in melons. **Phytopathology**, v.114, p.260-267, 1985.

REUVENI, R.; FERREIRA, J.F. The relationship between peroxidase and the resistance of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) to *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v.112, p.193-197, 1984.

RICK, C.M. Pollination relation of *Lycopersicon esculentum* in native and foreign regions. **Evolution**, v.4, p.110-122, 1950.

RIGGS, T.J. Breeding F1 hybrid varieties of vegetable. **Journal of Horticultural Science**, v.63, p.369-382, 1988.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. **Cucurbits**. Cambridge: CAB Publishing, 1999. 226p.

ROBINSON, R.W.; WHITAKER, T.W.; BOHN, G.W. Promotion of pistillate flowering in *Cucurbita* by 2-chloroethylphosphonic acid. **Euphytica**, v.19, p.180-182, 1970.

RYDER, E.J. Lettuce breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.12, p.433-474.

RYDER, E.J.; JOHNSON, A.S. Mist depollination of lettuce flowers. **HortScience**, v.9, p.584, 1974.

SCHULZ, B.; WESTPHAL, L.; WRICKE, G. Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota* L. *sativus*). **Euphytica**, v.74, p.67-76, 1994.

SHANNON, S.; ROBINSON, R.W. The use of ethephon to regulate sex expression of summer squash for hybrid seed production. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.104, p.674-677, 1979.

SILVA, N. Incompatibilidade ou macho-esterilidade? Perspectivas para a produção de sementes híbridas em Brássicas. **Horticultura Brasileira**, v.3, p.49-50, 1985.

SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop plants**. New York: Lomgman, 1976. 339p.

SUMMERS, W.L.; JARAMILLO, J.; BAILEY, T. Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. **HortScience**, v.27, p.838-840, 1992.

TANKSLEY, S.D. Gene mapping. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**: part A. New York: Elsevier, 1983. p.109-138.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; de VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v.132, p.1141-1160, 1992.

THOMPSON, D. J. Studies on the inheritance of male sterility in the carrot, *Daucus carota* L. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.78, p.332-338, 1962.

THOMPSON. K.F. Self-incompatibility in marrow-stem kale, *Brassica oleracea* var. *acephala*: I. Demonstration of a sporophytic system. **Journal of Genetics**, v.55, p.45-60, 1957.

THOMPSON, K.F.; TAYLOR, J.P. Self-incompatibility in kale. **Heredity**, v.27, p.459-471, 1971

TIGCHELAAR, E.C. Tomato breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.4, p.135-171.

TOLLA, G.E.; PETERSON, C.E. Comparison of gibberellin $A_{4/7}$ and silver nitrate for induction of staminate flowers in a gynoecious cucumber line. **HortScience**, v.14, p.542-544, 1979.

VIEIRA, J. V.; CASALI, V. W. D. Melhoramento de cenoura para verão. **Informe Agropecuário**, v.120, p.17-18, 1984.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de alface. In: CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. p.1-13.

VIGGIANO, J. Hortaliças: cultivares e sementes. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.252-254, 1994.

WATTS, L.E. Investigations into the breeding system of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis* (L.).:I. Studies of self-incompatibility. **Euphytica**, v.12, p.323-340, 1963.

WAYCOTT, W.; FORT, S.B. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. **Genome**, v.37, p.577-583, 1994.

WEEDEN, N.F.; MUEHLBAUER, G.J.; LADIZINSKY, G. Extensive conservation of linkage relationship between pea and lentil genetic maps. **Journal of Heredity**, v.83, p.123-129, 1992.

WEEDEN, N.F.; ROBINSON, R.W.; IGNART, F. Linkage between an isozyme locus and one of the genes controlling resistance to watermelon mosaic virus 2 in *Cucurbita ecuadorensis*. **Cucurbit Genetics Cooperative Reporter**, v.7, p.86-87, 1984.

WEIDE, R.; van WORDRAGEN, M.F.; LANKHORST, R.K.; VERKERK, R.; HANHART, C.; LIHARSKA, T.; PAP, E.; STAM, P.; ZABEL, P.; KOORNNEEF, M. Inregration of the classical and molecular linkage maps of tomato chromosome 6. **Genetics**, v.135, p.1175-1186, 1993.

WHITAKER, T.W.; ROBINSON, R.W. Squash breeding. In: BASSET, M.J. (Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: Avi Publishing, 1986. cap.6, p.209-242.

WILKIE, S.E.; ISAAC, P.G.; SLATER, R.G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.497-504, 1993.

WILLIAMS, C.E.; StCLAIR, D.A. Phenetic relationships and levels of variability detected by RFLP and RAPD analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. **Genome**, v.36, p.619-630, 1993.

WING, R.A.; HANG, H.B.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning in crop plants: Tomato as a model system; I. Genetic and physical mapping of jointless. **Molecular and General Genetics**, v.242, p.681-688, 1994.

WITSENBOER, H.; KESSELI, R.V.; FORTIN, M.G.; STANGHELLINI, M.; MICHELMORE, R.W. Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to threee pathogens in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.178-188, 1995.

YANG, X.; QUIROS, C.F. Construction of a genetic linkage map in celery using DNA-based markers. **Genome**, v.38, p.36-44, 1995.

YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2^a gene in tomato. **Genetics**, v.120, p.579-585, 1988.

13

HETEROSE E EMPREGO DE HÍBRIDOS F_1 EM HORTALIÇAS

WILSON ROBERTO MALUF

[1]Depto. de Agricultura - UFLA, C.P. 37 - CEP: 37200-000 - Lavras, MG.

1. INTRODUÇÃO

Híbridos de hortaliças têm sido empregados comercialmente desde antes mesmo da 2ª Guerra Mundial. Shinohara (1984) relata o desenvolvimento de um híbrido de repolho no Japão desde 1938. Híbridos de berinjela desde há muito têm sido utilizados no Japão, Bulgária, Índia e Estados Unidos, após uma série de estudos que relatavam a existência de significante grau de heterose nesta espécie (Kikazaki, 1931; Deskaloff, citado por Ikuta, 1969; Pal & Ramanujan, 1944; Pal & Singh, 1946; Odland & Noll, 1948). Na Bulgária, em 1932, Deskaloff lançou um híbrido F_1 de tomate que superava as cultivares parentais e tradicionais em capacidade produtiva e precocidade.

No Brasil, híbridos nacionais de hortaliças têm sido empregados comercialmente desde a década de 1960, com o desenvolvimento da cultivar híbrida de berinjela denominada F-100 (Ikuta, 1969). O emprego de sementes híbridas (em muitos casos importadas) tem-se intensificado desde então, com destaque para o repolho e cebola a partir principalmente das décadas de 1960/1970, couve-flor e abóbora na década de 1970, e, mais recentemente, de pimentão e tomate (final da década de 1980 até os dias atuais).

Híbridos comerciais não somente têm um processo de desenvolvimento mais trabalhoso do que cultivares de polinização aberta, mas também implicam maior complexidade no sistema de produção de sementes, o que acaba por resultar em sementes de valor unitário substancialmente mais elevado. Dependendo da espécie e do mercado, sementes híbridas podem custar de 3 a >100 vezes mais do que sementes de cultivares não híbridas. Obviamente, o uso de sementes mais caras demanda que os híbridos tenham um comportamento superior ao de cultivares de polinização aberta, seja em produtividade, qualidade ou uniformidade do produto.

Quais, pois, as vantagens dos híbridos relativamente às suas contrapartidas de polinização aberta? Aumentos de produtividade e precocidade (devido à *heterose* ou *vigor de híbrido*), maior uniformidade, maior resistência a pragas e doenças, melhor conservação pós-colheita, e estabilidade de comportamento sob condições ambientais variáveis têm sido algumas das vantagens comumente atribuídas aos híbridos.

O presente capítulo tentará discutir, para algumas hortaliças de importância econômica, algumas das razões que têm levado ao crescente uso de sementes híbridas na Olericultura brasileira. Não se pretende fazer uma revisão exaustiva do tema, mesmo porque as informações disponíveis variam tremendamente de cultura para cultura. Sempre que possível, serão citados trabalhos obtidos a partir de dados coletados nas condições brasileiras, de modo a melhor compreender as razões do uso crescente (ou não), em nosso país, de sementes híbridas na espécie em questão.

2. HETEROSE EM HORTALIÇAS

O termo *heterose*, conforme proposto por G.H.Shull na primeira década do século XX, designa o *vigor de híbrido manifestado em gerações heterozigotas derivadas de cruzamento entre indivíduos geneticamente divergentes.* Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a sua existência. Uma delas, conhecida como a teoria da dominância, atribui a heterose à ação complementar de genes dominantes. Já a teoria da sobredominância admite que a condição heterozigótica por si só confere maior vigor do que qualquer das condições homozigóticas. As duas teorias não são mutuamente exclusivas, e, em ambos os casos, admite-se que os genes envolvidos tenham um grau médio de dominância diferente de zero, isto é, que a ação gênica não seja exclusivamente aditiva. Interações inter-alélicas (epistasia) podem também explicar a heterose em alguns cruzamentos.

A definição original de heterose é, no entanto, imprecisa quanto ao referencial empregado para estimar o seu grau. Uma vez que heterose é função de ação gênica não-aditiva, os geneticistas em geral preferem defini-la relativamente à média dos pais. Um híbrido heterótico seria aquele cuja média difere da média parental, para mais ou para menos. A conceituação comercial, no entanto, considera esta definição insuficiente: um híbrido sensivelmente inferior (comercialmente) à média dos pais seria heterótico, mas não poderia ser explorado comercialmente. Assim, heterose pode também ser entendida como a superioridade relativa ao melhor dos pais. Embora esta última conceituação tenha maior utilidade imediata para o melhoramento, também ela pode ser insuficiente: superioridade relativa ao melhor dos pais pode não significar muito se este não for competitivo comercialmente. Uma terceira conceituação – a de heterose-padrão – estabelece como referencial uma cultivar comercial considerada padrão do mercado. Em hortaliças, este último conceito é, em geral, o mais empregado, embora pouco esclareça quanto à natureza ou causas da heterose.

A grande diversidade de espécies consideradas hortaliças, e a grande variação de hábitos de crescimento ou de respostas ao ambiente dentro de uma mesma espécie podem trazer complicadores adicionais à conceituação da heterose. A grande variação de portes de planta dentro de algumas espécies de abóbora (onde o diâmetro médio da planta pode variar de menos de 1 metro até 5 metros ou mais) torna qualquer definição baseada em produtividade por planta virtualmente inútil: heterose deveria neste caso basear-se em produtividade por unidade de área, levando em conta espaçamentos diferenciados em função do porte de planta. De modo análogo, o mercado pode ter exigências bastante definidas quanto ao tamanho do produto comercial de certas espécies, como bulbos de cebola ou cabeças de repolho. Nestes casos, heterose ao nível de plantas individuais (isto é, bulbo ou cabeça muito graúdos) não é necessáriamente desejável. Novamente, a única conceituação razoável envolveria produtividade por unidade de área. Deve-se também levar em conta que a estimativa dos componentes de produção em hortaliças é altamente subjetiva: em repolho as cabeças são colhidas no ponto comercial para fins culinários, caso contrário racham e continuam a ganhar peso; pimentões geralmente são colhidos no estágio verde-maduro, e se forem deixados na planta até atingirem a cor vermelha inibirão a

frutificação posterior; pepinos para indústria são colhidos bastante imaturos, e o valor monetário do produto é inversamente proporcional ao seu peso unitário; em abobrinha os frutos são considerados não comerciais se passarem do ponto de colheita (3 a 7 dias após a antese e polinização). Estes exemplos reforçam a idéia de que em hortaliças a heterose deve ser em termos de produtividade comercial, considerando as peculiaridades de cada produto.

3. HETEROSE NAS SOLANÁCEAS

As solanáceas cultivadas compreendem espécies dos gêneros *Lycopersicon, Solanum* e *Capsicum,* que são geralmente diplóides, com 12 pares de cromossomos, e basicamente autógamas. O grau de autogamia pode variar: nas cultivares mais modernas de tomateiro, a percentagem de polinização cruzada é com freqüência inferior a 1%, enquanto que na berinjela, jiló, pimentão e pimentas pode ser substancialmente maior (chegando a 36% ou mais), a depender da população de insetos polinizadores. Sementes híbridas nestas espécies são em geral produzidas através de emasculações dos botões florais antes da antese, seguidas de polinização (feita manualmente) com pólen retirado do genitor masculino. O rendimento em sementes por unidade de área e/ou por fruto polinizado determina, em parte, o preço da semente no mercado. Refletindo, pois estas diferenças em rendimento, o preço por quilograma de sementes híbridas é bem maior para pimentão e tomate do que para berinjela.

3.1 BERINJELA – *Solanum melongena* L.

Desde a década de 1930 uma série de estudos realizados em países tão diversos quanto Japão, Bulgária, Índia, Estados Unidos e outros têm relatado a existência de significante grau de heterose na berinjela (Kikazaki, 1931; Deskaloff, citado por Ikuta, 1969; Pal & Ramanujan, 1944; Pal & Singh, 1946; Odland & Noll, 1948). Dado o baixo consumo de sementes por unidade de área plantada e a facilidade de produção de sementes híbridas nesta espécie (onde os botões florais graúdos são fáceis de emascular e o rendimento em sementes por fruto polinizado é elevado), não é surpreendente que híbridos comerciais desde há muito tenham-se tornado comuns em diversos países da Ásia, América do Norte e Europa.

No Brasil, desde a década de 1960 híbridos de berinjela têm sido utilizados comercialmente. Dias & Gurgel citados por Ikuta (1969) demonstraram a existência de heterose para produção de frutos em híbridos F_1, especialmente entre cultivares locais e estrangeiras de berinjela. Ikuta (1961) testou vários híbridos entre populações locais e/ou cultivares importadas. De modo geral, os híbridos testados por Ikuta (1961) apresentaram acentuado vigor; alguns conseguiram superar em mais de 80% a média dos seus genitores, e o híbrido mais produtivo produziu 43,9% a mais do que a cultivar não híbrida mais produtiva. O híbrido de melhor aceitação no mercado produziu 27,2% a mais do que a cultivar mais produtiva. Acentuado grau de heterose também foi encontrado para características vegetativas da planta (altura, peso e número de ramos por planta, diâmetro do caule na região do coleto). Ikuta (1961) concluiu ser o uso de híbridos F_1 economicamente viável, constituindo um meio seguro e rápido de aumentar a produção.

Dadas as fortes evidências em favor do uso de híbridos na cultura, desde a década de 1960 começou a generalizar-se o uso comercial de um híbrido – denominado F-100 – desenvolvido e produzido pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba. O F-100 obteve tal sucesso que por volta do início da década de 1980 representava a quase totalidade da berinjela produzida no Brasil por produtores profissionais. Foi o primeiro caso em que um híbrido de hortaliças, desenvolvido e produzido no Brasil, veio a obter tal participação no mercado de sementes.

A partir de meados da década de 1980, novos híbridos de berinjela foram encontrando seus nichos de mercado, competindo com o F-100. A identificação de novas combinações híbridas promissoras passou a interessar instituições públicas e privadas de pesquisa. Sousa (1993) novamente constatou a existência de heterose em berinjela, relativamente à média dos pais e ao pai superior, para produção e, em alguns casos, também para qualidade de frutos. Levando em conta tanto a produtividade quanto a qualidade dos frutos, idenficaram-se pelo menos três híbridos, dentre os 18 testados, superiores ou pelo menos competitivos com o padrão F-100 (Sousa, 1993; Sousa *et al.*, 1997).

3.2 JILÓ – *Solanum gilo* Raddi

Poucos são os estudos que documentam a existência da heterose em jiló. No entanto, o trabalho de Campos *et al.* (1979) demonstra inequivocamente a ocorrência de heterose nesta espécie: os híbridos F_1 se mostraram comercialmente promissores, com produção de média 25% superior à média de todos os genitores. Dos 28 híbridos testados, 17 foram mais produtivos do que a cultivar de polinização aberta mais produtiva. O híbrido mais produtivo foi 44% superior à média dos respectivos pais, e 36% superior ao melhor genitor. O maior grau de heterose foi encontrado nos híbridos entre genitores de frutos redondos verde-escuros (preferidos no mercado de São Paulo) e genitores de frutos compridos verde-claros (preferidos no Rio de Janeiro e Minas Gerais): dos 10 híbridos mais produtivos, 8 eram do tipo comprido verde-claro x redondo verde-escuro, e apenas 2 eram do tipo comprido verde-claro x comprido verde-claro. Dada a dominância encontrada pelos autores para os fenótipos cor verde-escuro e formato redondo, fica clara a grande facilidade de se obterem híbridos superiores para o mercado paulista, embora isso também seja possível para o mercado carioca/mineiro.

O grau de heterose em jiló é comparável, pois, ao encontrado na berinjela, espécie que lhe é afim taxonomica e agronomicamente. No entanto, ao contrário do que acontece na berinjela, a demonstração da existência de elevado grau de heterose em jiló não levou ao emprego comercial de híbridos F_1. Vários fatores podem ter contribuído para isto: embora morfologicamente semelhantes às da berinjela, as flores do jiló são menores em tamanho (o que dificulta a emasculação necessária à produção de sementes híbridas); além disso, o rendimento em sementes por fruto (e portanto por polinização manual) é menor. A semente híbrida de jiloeiro seria provavelmente comercializada a um preço substancialmente maior do que as de berinjela híbrida. Isso não justifica necessariamente o desinteresse pela exploração comercial da heterose no jiló, uma vez que o consumo de sementes por hectare é bastante reduzido, e a semente representa um componente irrisório no custo total de produção na cultura.

No entanto, esse maior preço hipotético da semente híbrida de jiló, assim como o desconhecimento do tamanho potencial deste mercado, podem ter contribuído para o desinteresse dos pesquisadores públicos e privados na exploração comercial de híbridos F_1.

3.3 PIMENTÃO – *Capsicum annuum* L.

Originário da América do Sul e Central, o gênero *Capsicum* se encontra difundido por todo o mundo. Plantas desse gênero são cultivadas tanto em regiões tropicais como em temperadas. Distribuído por toda América do Sul e Central até o sul dos EUA, este gênero possui ampla variabilidade genética (Pickersgill, 1969; Heiser Jr., 1979; McLeod *et al.*, 1983; Casali & Couto, 1984).

Dentro do gênero, cinco espécies são cultivadas em escala significativa, sendo elas: *C. annuum, C. frutescens, C. chinese, C. baccatum* e *C. pubescens*. No Brasil, apenas a *C. pubescens* não é cultivada. Vinte e duas selvagens são citadas e reconhecidas pelos especialistas (Casali & Couto, 1984).

No gênero *Capsicum* as espécies cultivadas são predominantemente autógamas e diplóides com 2n = 24 cromossomos (Pickersgill, 1969; Heiser Jr., 1979). A espécie com maior variabilidade genética e mais cultivada é *C. annuum* L., que tem como centro de origem e diversidade do sul dos EUA até o norte da América do Sul. A domesticação da espécie ocorreu na América Central, e estudos arqueológicos demonstraram que a domesticação de *C. annuum* se deu antes do início da era cristã (Heiser Jr., 1979).

A espécie *C. annuum* compreende duas importantes hortaliças: o pimentão e algumas pimentas. O pimentão (*Capsicum annuum* L.), que compreende os tipos não pungentes de frutos graúdos, é uma das dez hortaliças mais importante no mercado hortigranjeiro brasileiro. As principais cultivares desta hortaliça no Brasil surgiram por meio de seleções feitas possivelmente em populações introduzidas da Espanha e Itália, não se sabendo onde e em que época exatamente se iniciou aqui o cultivo em maior escala (Souza & Casali, 1984).

Os métodos clássicos de melhoramento utilizados na cultura do pimentão são os métodos do retrocruzamento e o genealógico, tendo sido dada uma grande ênfase à produção e resistência a doenças (Nagai, 1983). Nos últimos anos tem-se enfatizado também a obtenção de híbridos F_1 (Galvêas, 1988; Miranda, 1987).

O uso de cultivares híbridas de pimentão é outra opção no melhoramento dessa olerícola, em função das diversas vantagens oferecidas (Galvêas, 1988). Segundo Ikuta & Vencovsky (1970) é possível obter em pimentão híbridos F_1 mais produtivos que as variedades comerciais. Os híbridos mostram-se mais estáveis e produtivos que as cultivares, e não têm sido detectadas diferenças significativas em híbridos recíprocos para a maioria das características de interesse (Braz, 1982).

Em pimentão, a exploração comercial de híbridos F_1 é a melhor estratégia para aumentar de imediato a produtividade e melhorar a qualidade dos frutos, não excluindo a possibilidade de se selecionarem linhagens superiores em populações segregantes derivadas de progênies F_2 ou mesmo em retrocruzamento (Uzo, 1984). Já foi verificado que o pimentão apresenta comumente o vigor de híbrido, e que é possível produzir híbridos F_1 resistentes ao virus Y e mais produtivos do que as cultivares utilizadas pelos agricultores brasileiros (Ikuta & Vencovsky, 1970; Tavares, 1993; Tavares & Maluf, 1994).

A produção comercial de sementes F_1 de pimentão é feita pelo processo manual de cruzamentos controlados, tornando-se uma atividade onerosa. No entanto, diversos trabalhos de pesquisa sobre heterose, principalmente para componentes de produção, têm mostrado as vantagens do emprego de pimentões híbridos (Ikuta & Vencovsky, 1970; Braz, 1982; Miranda, 1987; Tavares, 1993; Tavares & Maluf, 1994; Innecco, 1995). Às vezes, bons parentais podem produzir baixo número de sementes por fruto, sendo outro fator que onera o custo de produção de sementes híbridas. Os trabalhos de Braz (1982) e Joshi *et al.* (1991) mostraram que é possível aumentar o rendimento em sementes através de seleção.

Na cultura do pimentão, a heterose é freqüentemente associada à menor queda de flores nos híbridos (Popova & Mihailova, 1984), levando à maior produção precoce e total. A heterose em pimentão também se manifesta quanto ao número de sementes por fruto, peso de 1000 sementes por fruto, peso de 1000 sementes e tamanho do embrião. Pode-se concluir que o efeito da heterose se manifesta imediatamente após a fertilização e influencia a formação de sementes. Assim, híbridos de pimentão se adaptam mais rapidamente às condições desfavoráveis de cultivo e por conseguinte, são mais aptos para os primeiros plantios no início da estação de cultivo nas regiões temperadas (Popova & Mihailova, 1984).

No Brasil o processo pela adoção de híbridos comerciais foi mais lento, destacando-se apenas na década de 1990, principalmente na região Sudeste. Devido à diversidade dos materiais e dos objetivos da seleção para as diferentes regiões, o estudo da heterose mantém-se como uma ferramenta importante para detectar combinações híbridas desejáveis.

Um dos primeiros autores a testar híbridos F_1 de pimentão no Brasil, Schrader (1953) constatou que o híbrido F_1 (Amarelo Gigante x Doce Comprido) apresentou vantagens sobre os genitores, com uma heterose positiva de 32,6% sobre a respectiva média parental para a produção.

Na Índia, país onde vários estudos acerca da heterose em pimentão têm sido desenvolvidos, Khadi & Goud (1987) encontraram para a produção de frutos secos uma heterose de 93% em relação ao pai superior; Kaul & Sharma (1989), para a produção de frutos por planta, encontraram uma heterose em relação ao pai superior variando de 25% a 34%; e Mishra *et al.* (1990) verificaram também altas heteroses para a produção de frutos por planta, embora para o caráter número de dias para o florescimento a média do F_1 não tenha excedido a média dos parentais.

A heterose para peso total de frutos é resultado final da interação de vários componentes da produção (Miranda, 1987). Betlach (1967) relatou que a heterose encontrada para a produção foi primeiramente devida ao número de frutos por planta, interagindo positivamente com o peso médio dos frutos. Mais de 50% da variabilidade da produção foi derivada do número de frutos por planta segundo Gill *et al.* (1973). Rocchetta *et al.* (1976) relataram que a produção é dependente fundamentalmente do número de frutos por planta e do peso médio destes.

Heterose para número de frutos por hectare, variando de 5,6% a 21,6% em relação ao pai superior, de 6,3% a 25,7% em relação a média dos pais e de rendimento até 21% em relação à cultivar padrão (Agronômico 10-G) foi relatada por Braz (1982). Para peso médio dos frutos, o mesmo autor encontrou heterose significativa de 5,6% a 12,6% em relação à média dos pais, mas não em relação ao pai superior.

Houve também de 25% a 100% de heterose para produção precoce em relação ao pai mais precoce conforme relatado por Khalf-Allah *et al.* (1975). Já em outro trabalho Ciklew (1966) relatou 108% de heterose para precocidade de época de maturação.

Depestre & Espinosa (1986) observaram alto efeito heterótico sobre a média dos parentais para o número de frutos por planta, com valores entre 111% e 128%; no peso médio dos frutos, houve incremento de 103% a 112%; os componentes produtivos exibiram heterose entre 116% e 126%; em relação ao pai superior, foi detectada heterose para produção e número de frutos por planta.

Em trabalho testando três genitores (BGH-18, BGH-2847 e Agronômico 10G) e os híbridos entre eles, foi relatada heterose significativa para vários caracteres, além de peso médio, produção e número de frutos e altura de plantas. Para comprimento médio dos frutos observou-se heterose de 7% a 17,9% em relação a média dos pais, mas não se encontrou heterose em relação ao pai superior (Braz, 1982).

Em relação à precocidade da produção do pimentão, que é uma característica desejável, tem sido verificada uma maior produção precoce nos híbridos mais heteróticos do que nas cultivares de polinização aberta (Studentsova, 1974; Dikil *et al.*, 1974; Miranda, 1987).

Um dos caracteres que na maioria dos trabalhos apresenta heterose predominantemente positiva e de alta magnitude é a produção de frutos, podendo variar de 28,0% a 50,4% (Dikil *et al.*, 1974). Para peso seco de frutos por planta esta pode ser de 27,4% (Lippert, 1975). O número de frutos por planta pode também apresentar alta heterose (Mak, 1987) no F_1, mas esta já foi relatada também no F_2 (Roccheta *et al.*, 1976).

Estudando híbridos F_1 de pimentão, Shifriss & Rylski (1973) relataram que eles apresentavam melhor qualidade comercial, expressa em maior tamanho, maior uniformidade e maior padronização dos frutos. Neste trabalho a heterose para a produção foi de apenas 7%, mas os frutos foram 75% de melhor qualidade para exportação e 198% melhores considerando apenas as três primeiras colheitas (precocidade) e qualidade para exportação.

Parece claro que a manifestação da heterose depende da divergência genética entre as cultivares ou linhagens parentais (Falconer, 1981). O cruzamento entre três cultivares comerciais (Ikeda, Avelar e Takahashi) derivadas de um mesmo material, a cultivar Casca-Dura, não resultou em heterose nos híbridos F_1 em razão de serem proximamente relacionadas (Ikuta & Vencovsky, 1970). Isto contrasta com os resultados de outros autores (Miranda, 1987; Tavares, 1993; Tavares & Maluf, 1994) onde materiais geneticamente divergentes foram utilizados, verificando-se significativos valores de heterose em diversos caracteres. A diversidade genética entre genitores é diretamente proporcional a magnitude de heterose nos híbridos F_1 (Gill *et al.*, 1973). Cuidado especial deve ser dado à escolha de cultivares divergentes, mas com características desejáveis (Miranda, 1987). Em estudos realizados com seis cultivares de pimentão (Miranda, 1987) concluiu que os híbridos F_1 superaram a cultivar padrão Agronômico 10G quanto à produção por planta, em valores variáveis de 12,4% a 77,9%. A superioridade dos híbridos ocorreu também para a produção precoce, número total de frutos por planta, peso médio dos frutos e comprimento dos frutos.

Galvêas (1988) concluiu que o vigor dos híbridos de pimentão proporcionou um aumento substancial na produção e número de frutos precoces, tendo sido os híbridos, em geral, mais produtivos que a cultivar padrão.

Entre os 28 híbridos avaliados por Thakur (1987), quanto ao rendimento, 11 superaram o melhor genitor e seis destacaram-se pelos altos valores de heterose, que variaram de 38,30% a 128,49%. Joshi *et al.* (1991) obtiveram até 324,6% de heterose para a produção, resultante da heterose combinada para altura da planta, tamanho do fruto e número de frutos por planta.

Em estudos com híbridos F_1 de pimentão, incluindo-se os recíprocos, não se encontrou efeito materno para nenhum dos principais componentes da produção, nem mesmo para a produção de sementes por fruto (Braz, 1982).

Innecco (1995) concluiu que os materiais mais divergentes geneticamente produziram híbridos mais heteróticos, pois, quando se utilizaram parentais aparentados (PIX-022 e Agronômico 8) não se obtiveram bons híbridos; os melhores híbridos envolveram a linhagem L-004 que, pela sua origem e características de planta e fruto, parece ser mais divergente geneticamente de Agronômico 8. Quando comparados com a cultivar padrão (Magda) os híbridos experimentais foram superiores quanto à produção total de frutos (até 39,45%); produção precoce (até 122,86%); número total de frutos (até 22,5%); número precoce de frutos (até 70,65%); peso médio geral (até 49,64%) e peso médio precoce (até 42,58%).

Avaliando híbridos triplos, Melo (1997) concluiu que alguns híbridos triplos como (Reinger x Myr-29), (Pacific x Myr-29), (Mikalor x Myr-29), (Vidi x Myr-29), (Sidor x Myr-29) e (Lamuyo x Myr-29) foram superiores à cultivar-padrão Magda, e equivalentes ou superiores ao híbrido-padrão Magali.

Blank (1997) testando precocemente a capacidade combinatória de linhagens de pimentão, concluiu que aplicando-se cruzamentos-teste na geração F_2 das populações usadas, é possível já selecionar famílias que originarão linhagens com boa capacidade combinatória, em ambas as populações estudadas. Precocidade no florescimento, maior altura de plantas e maior produtividade são controladas predominantemente por alelos dominantes, enquanto o maior peso médio de frutos é controlado predominantemente por alelos recessivos (Blank & Maluf, 1997).

A maioria das cultivares de polinização aberta de pimentão existentes no Brasil é aparentada, portanto com uma estreita base genética (Miranda, 1987). Esta afirmação pode ser evidenciada quando se observa a genealogia das principais cultivares, dada por Nagai (1983) e Ikuta & Vencovsky (1970). Esta escassez de cultivares divergentes pode ser contornada pela hibridação de cultivares nacionais com cultivares estrangeiras (Miranda, 1987) ou com linhagens derivadas destas (Tavares, 1993; Tavares & Maluf, 1994).

Devido aos níveis de heterose para produção total, produção precoce e peso médio de frutos por planta, a exploração comercial de híbridos F_1 parece ser uma maneira rápida e eficiente de promover grande avanço na cultura do pimentão no Brasil. De fato, a década de 1990 testemunhou um grande incremento no uso de cultivares híbridas comerciais no país, notadamente no segmento de cultivares de frutos cônicos, onde a produção de sementes é feita basicamente no país. Exemplos de híbridos cuja semente é produzida no país são Magali e Magali-R (Agroflora/ Sakata), Atenas (Horticeres), Lígia (HortiAgro) e Fortuna Super (Topseed).

3.4 PIMENTAS – *Capsicum* spp.

As pimentas compreendem todos os tipos pungentes de diferentes espécies do gênero *Capsicum*: *C. annuum, C. frutescens, C. chinense, C. baccatum, C. praetermissum* e outras. Há tipos não pungentes, mas que mantêm a denominação *pimenta*, devido ao formato alongado e tamanho menor de seus frutos relativamente aos dos tipos comumente denominados *pimentão*. A pungência é devida à presença, na placenta dos frutos, da substância denominada *capsaicina* (um derivado vanil-amídico do ácido isodecilânico).

Estudos sobre a heterose em pimentas pungentes são mais raros do que em pimentão. No Brasil, têm-se limitado a alguns poucos, porém elucidativos estudos com a espécie *C. chinense*. Vallejo-Cabrera (1986) num cruzamento dialélico entre 5 acessos de *C. chinense*, indica para produção de frutos a predominância dos efeitos gênicos não-aditivos (capacidade específica de combinação). De fato, o híbrido F_1 mais produtivo (2194 gramas/planta) mostrou-se altamente heterótico, tanto relativamente à média dos pais (+232%) quanto ao pai superior (+134%). Num outro cruzamento dialélico, Sousa (1998) constatou a predominância de efeitos gênicos não-aditivos e de elevado grau de heterose para produção total e precoce de frutos; embora alguns dos híbridos testados tenham apresentado valores negativos de heterose, os melhores híbridos chegaram a ter produtividade total até 97% superior à média dos pais, e 66% superior ao melhor genitor. Sousa (1998) também constatou ação gênica não-aditiva (inclusive epistasia) para teor de capsaicina nos frutos. Os valores de heterose para esta característica foram predominantemente positivos: para 8 dos 10 híbridos testados, os teores de capsaicina foram superiores em +82% a +356% relativamente às médias dos pais, ou +72% a +320% relativamente ao melhor genitor.

As magnitudes encontradas de heterose para características produtivas em *Capsicum chinense* apontam para a viabilidade comercial do uso de híbridos nesta espécie. A produção comercial de sementes F_1 apresentaria algumas dificuldades relativamente à de sementes F_1 do pimentão *C. annuum*: devido ao menor tamanho dos botões florais e menor rendimento em sementes por fruto polinizado, o F_1 de *C. chinense* seria uma semente provavelmente mais cara do que a do próprio pimentão (por sua vez, já de elevado valor unitário). Dado o baixo gasto de sementes por hectare, e a baixa participação da semente no custo total de produção, o valor unitário das sementes F_1 de *C. chinense* poderia não ser limitante. Contudo, as incertezas relativamente ao tamanho do mercado potencial de sementes híbridas de pimenta têm inibido o desenvolvimento de híbridos nessa espécie por parte de empresas de sementes, de modo que ainda inexistem híbridos comerciais disponíveis.

3.5 TOMATE – *Lycopersicon esculentum* Mill.

Os estudos sobre heterose na cultura do tomate foram iniciados quase ao mesmo tempo que em milho, na primeira década do século XX. Hedrick & Booth (1908) foram os primeiros a observar heterose para produção e número de frutos em tomate. Entretanto, os primeiros passos para a aplicação prática da heterose em larga extensão no melhoramento genético do tomate só foram dados no início dos anos 30, na Bulgária. Nesse país, em 1932, C. Deskaloff lançou o primeiro híbrido F_1 de

tomate para o cultivo em casa de vegetação. Esse híbrido, em curto espaço de tempo, passou a ser extensivamente cultivado, porque superava as cultivares parentais e tradicionais em termos de capacidade produtiva e precocidade (Yordanov, 1983). A partir daí o melhoramento visando à produção de híbridos F_1 de tomate tomou um grande impulso em países da Europa, nos Estados Unidos, Canadá, Israel e Japão, entre outros.

As referências sobre heterose em tomate são numerosas. Rick & Butler (1956) relatam que a importância teórica e prática de heterose em tomate pode ser estimada por mais de 40 artigos publicados, até aquela data, nos quais a produtividade dos híbridos F_1 excedia a dos parentais. Mais atualmente, a literatura concernente à heterose em tomate é muito mais extensa. Em uma revisão publicada por Deskaloff *et al.* citado por Yordanov (1983), são mencionadas mais de 90 referências, apenas na Bulgária e Rússia. Mesmo sendo uma espécie autógama, há evidências de que o tomate manifesta efeitos heteróticos em mesmo grau que algumas culturas alógamas.

Diversos autores têm constatado variações da manifestação de heterose em tomate para características importantes. Cheng (1972), no Brasil, verificou heterose para produção de frutos comerciáveis com variações de até 45% a mais em relação ao pai mais produtivo. Currence *et al.*, citados por Cheng (1972) também verificaram heterose para produção de frutos "extras" de até 38%; esses mesmos autores constataram forte influência ambiental sobre a precocidade dos frutos, e concluíram que este caráter poderá ser mais estável nos híbridos F_1, em virtude da homeostase genética que se manifesta nos híbridos, evidenciada por menor interação genótipo x ambiente.

Larson (1941) afirma que a uniformidade, a alta produção, o amadurecimento precoce, o tamanho e a boa aparência dos frutos de certas combinações híbridas não são igualados por nenhuma outra variedade de polinização aberta.

Geralmente os híbridos derivados de genitores geneticamente divergentes e de origem geográfica diferentes expressam maiores valores heteróticos para características relativas à produção, características vegetativas, produção precoce, formato de fruto (Currence *et al.*,1944; Cram, 1952; Burdick, 1954; Cheng, 1972; Lapushner *et al.*, 1973; Singh *et al.*, 1974; Miranda, 1978; Miranda *et al.*, 1982; Maluf *et al.*, 1982; Maluf *et al.*, 1983; Araújo, 1987; Melo, 1987; Maluf *et al.*, 1989).

Pujari & Kale (1994) e Singh & Singh (1993) constataram heterose para produção e número de frutos por planta e para precocidade. Quanto à produção total de frutos, Xue (1994), Deu *et al.* (1994) e Suresh *et al.* (1995), verificaram heterose de 21,64% em relação à média dos pais, de 72,2% e 83,18% em relação ao pai superior, respectivamente. Os componentes primários da produção (número e peso médio de frutos) apresentaram valores positivos de heterose em relação ao pai superior, de 115,7% (Deu *et al.*, 1994) para número de frutos, e de 143,1% e 30,8% (Suresh *et al.*, 1995) para número e peso médio de frutos. Uma outra característica economicamente importante na cultura do tomate é a precocidade da produção. Para esta característica Xue (1994) e Suresh *et al.*(1995), encontraram valores de heterose em relação à média dos pais de 21,64% e em relação ao pai superior de 41,6%, respectivamente.

Efeitos heteróticos em grau variável em tomate têm sido relatados para características inerentes à qualidade de frutos, tais como produção de suco, acidez titulável, sólidos solúveis, cor (Stevens & Rudich, 1978; Jones & Scott, 1984; Martin, 1987; Mutscheler *et al.*, 1992; Farkas, 1994; Resende, 1995) e conservação pós-colheita (Nguyen *et al.*, 1991; Resende, 1995; Souza, 1995; Freitas, 1996).

Entre as várias vantagens advindas da exploração comercial da heterose, através do uso de sementes híbridas F_1, pode-se citar a obtenção de um produto de qualidade superior, mais uniforme e padronizado, e logicamente, de aspecto melhorado. Em hortaliças, os parâmetros qualitativos são tão ou mais importantes do que uma alta produtividade, e, em geral, os híbridos têm maior adaptação e produção mais estável quando ocorrem variações entre anos e locais (Paterniani, 1974). Indícios de maior estabilidade fenotípica nos híbridos de tomate relativamente às cultivares de polinização aberta foram encontrados por Resende (1996) e por Andrade-Júnior (1999).

Na última década, foram introduzidos no país alguns híbridos com maior capacidade de conservação de frutos em pós-colheita, e que fazem uso de genes mutantes de amadurecimento em heterozigose. Tais mutantes – *rin (=ripening inhibitor), nor (=non-ripening), alc (=alcobaça)* – quando empregados em homozigose, aumentam tremendamente a conservação dos frutos após a colheita, mas não podem ser usados comercialmente, devido aos seus efeitos deletérios na coloração dos frutos (frutos mutantes maduros não adquirem coloração vermelha, permanecendo amarelados ou levemente alaranjados externamente). Contudo, os híbridos *+/rin, +/nor* ou *+/alc* apresentam maior conservação do que os tomates normais (+/+), ao mesmo tempo que sua coloração final é praticamente normal; os mutantes são, pois, incompletamente recessivos para conservação de frutos (frutos amadurecem mais lentamente do que os normais), ao mesmo tempo que sua coloração final é normal (vermelha) (Freitas *et al.*, 1998). Em virtude disso, híbridos *+/rin, +/nor* ou *+/alc* têm sido bastante usados, e a maior conservação tem sido uma das principais razões do aumento do uso comercial de sementes híbridas de tomate no Brasil. Outra razão tem sido a possibilidade de se acumular facilmente nos híbridos um grande número de resistências a doenças, uma vez que a maioria dos alelos que controlam resistência a doenças na espécie são dominantes. Em razão disto, têm sido lançados híbridos no mercado com grande número de resistência a doenças, como o Débora Plus (resistente a *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raças 1 e 2, *Stemphylium solani* e nematóides de galhas *Meloidogyne* spp.) e o Bônus F_1 (resistente a *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 1 , *Stemphylium solani,* nematóides de galhas *Meloidogyne* spp., *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, e a topovírus). É possível que a maior resistência a doenças contribua para a maior estabilidade fenotípica destes híbridos relativamente às cultivares de polinização aberta, em virtude de os primeiros terem um melhor comportamento do que as segundas em ambientes desfavoráveis.

Um dos principais entraves à maior utilização de híbridos F_1 de tomate no Brasil consiste no desconhecimento de boas combinações híbridas (especialmente entre linhagens de frutos bi ou triloculares com formato oblongo) que superem com vantagens as cultivares padrão (Maluf, 1982; Melo, 1987). Em geral, estudos no Brasil têm revelado que a heterose para peso médio de frutos é inexistente ou negativa

(i.e., no sentido do genitor de menor peso médio) (Maluf *et al.*, 1982; Melo, 1987), o que pode ser uma limitação ao desenvolvimento de híbridos comerciais, em virtude da preferência do mercado por frutos graúdos. Outras limitações, como o alto custo das sementes híbridas e a falta de uma tecnologia apropriada para produção de sementes híbridas no Brasil, vêm sendo paulatinamente superadas: há atualmente híbridos de tomate aceitos no mercado cujos preços variam de R$1000,00 por kg (tomates híbridos para processamento) até R$40.000,00 por kg (alguns tomates de mesa); a produção de sementes híbridas no país vem aumentando na década de 90, e as importações de sementes híbridas também têm crescido.

4. HETEROSE NA CEBOLA – *Allium cepa* L.

Híbridos de cebola tornaram-se possíveis a partir da descoberta, nos Estados Unidos, da macho-esterilidade (Jones & Emsweller, 1936), e posteriormente da elucidação de seu controle genético (Jones & Clarke, 1942). A macho-esterilidade é condicionada por um gene recessivo nuclear *ms/ms*, e a um fator citoplasmático (citoplasma S). Uma planta macho-estéril deve possuir a constituição citoplasmática e genética *S ms/ms*. As demais constituições possíveis (S *Ms/ms*, S *Ms/Ms*, N *ms/ms*, N *Ms/ms*, N *Ms/Ms*) correspondem ao fenótipo normal (fértil). A obtenção comercial de sementes híbridas passa pela manutenção da chamada *linha A*, macho-estéril (S *ms/ms*), feita através da polinização pela *linha B*, denominada mantenedora (N *ms/ms*). Uma vez disponível amplo suprimento de sementes da linha A, o híbrido comercial pode ser obtido pela sua polinização por uma terceira linhagem (linha C, fértil), que possua boa capacidade de combinação com A.

A obtenção de híbridos comerciais de cebola é em geral considerada trabalhosa e demorada. As etapas limitantes são, em geral, a identificação de genótipos mantenedores (linhas B, N *ms/ms*), e o testes de capacidade de combinação das linhas A e C disponíveis. Híbridos americanos adaptados a fotoperíodos de dias longos e outros, como o Granex, adaptados a dias curtos estão disponíveis desde a década de 1950. Granex e outros híbridos de dias curtos são hoje bastante plantados no Brasil.

É conveniente notar que a chamada *heterose* de muitos dos híbridos de cebola é, pelo menos em parte, função da uniformidade genética da cultivar híbrida relativamente às cultivares de polinização aberta, que se constituem de populações altamente variáveis. Maior uniformidade genética implica possibilidade de otimização de um espaçamento para o híbrido, bem como maior uniformidade na colheita, fatores que levam em geral a maiores produções por unidade de área.

No Brasil, as primeiras tentativas de se identificarem linhas macho-estéreis adaptadas, visando a uma eventual produção de híbridos nacionais de cebola, deu-se por volta de 1958 (Guimarães, 1958), mas não obteve sucesso. Híbridos nacionais de cebola somente se tornaram possíveis após a identificação, por Costa (1967), de pares de linhas A/B, isto é, de linhas macho-estéreis (A) e suas respectivas mantenedoras (B). No entanto, o desenvolvimento de híbridos nacionais de cebola tem sido lento, devido em parte à falta de informações sobre a capacidade de combinação entre as populações de polinização aberta atualmente disponíveis no mercado nacional. Por outro lado, as últimas três décadas assistiram ao desenvolvimento de inúmeras novas

cultivares de polinização aberta em vários Estados do país – Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Pernambuco, principalmente. Estas populações constituem-se potencialmente promissoras fontes de linhagens parentais para o desenvolvimento de híbridos.

Não são muitas as informações disponíveis sobre heterose em combinações híbridas de cebola no Brasil. Costa & Dias (1967) e Costa (1978) relataram a ocorrência de heterose no híbrido interpopulacional Baia Piriforme x Barreiro. Contudo, este híbrido apresentou bulbos de coloração arroxeada (uma vez que a cultivar parental Barreiro possui bulbos roxos), o que limita o seu uso comercial, uma vez que no mercado se preferem bulbos amarelados. Maluf *et al.* (1990) estudaram a heterose em híbridos entre diferentes plantas (clones) da população Pira-Ouro com a população Baia Petrolini. O híbrido intervarietal, em média, não apresentou heterose em relação à Pira-Ouro, mas alguns híbridos de clones específicos de Pira-Ouro x Baia Petrolini foram vantajosos. Isso mostra ser necessário selecionar para capacidade de combinação dentro das populações. Santos-Júnior (1993) e Gomes (1993) estudaram a capacidade combinatória de clones da cultivar Pira-Ouro polinizados (*topcrosses*) pela população Pirana Precoce, o primeiro no sistema de cultivo do cedo através do método de bulbinhos, e o segundo no sistema de mudas (cultivo de inverno) (Santos-Júnior & Maluf, 1994; Gomes & Maluf, 1995). Em ambos os casos, a média dos *topcrosses* não apresentou vantagens relativamente às cultivares parentais. Contudo, houve grande variabilidade entre *topcrosses*, reflexo da grande variabilidade para capacidade de combinação existente dentro da população Pira-Ouro. Alguns híbridos foram definitivamente muito superiores em produtividade comercial à melhor cultivar parental.

Apesar de limitados, os estudos existentes permitem antever um grande potencial de populações de polinização aberta como Pira-Ouro para o desenvolvimento de híbridos comerciais. No entanto, algumas restrições se aplicam. Cultivares como Pira-Ouro e Pirana foram obtidas a partir de cruzamentos onde o genitor feminino era macho-estéril, e portanto, possuem citoplasma macho-estéril (S), não permitindo a seleção de linhagens mantenedoras (linhas B). As linhagens oriundas destas populações somente podem ser utilizadas na confecção de híbridos se empregadas como linhagens polinizadoras (linhas C). Alternativamente, a disponibilidade de técnicas de micropropagação de cebola *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 1996) pode permitir a dispensa do uso de linhas mantenedoras para a obtenção do genitor macho-estéril. Neste último caso, poder-se-iam utilizar clones macho-estéreis como genitores femininos, sem necessidade de linhagem mantenedora, abrindo novas perspectivas para o melhoramento da cebola visando à obtenção de híbridos comerciais: uma etapa demorada e trabalhosa do processo (identificação de linhagens N*ms/ms*) seria dispensável, e todas as cultivares adaptadas seriam fontes potenciais de genitores de híbridos (independentemente da ocorrência ou não do citoplasma N).

5. HETEROSE NAS CUCURBITÁCEAS

Embora alógamas, as cucurbitáceas em geral não apresentam queda de vigor em função da endogamia. Atribui-se este comportamento ao processo de seleção, onde, em virtude do tamanho avantajado das plantas, as populações provavelmente

tenham sido mantidas sob baixos tamanhos efetivos. A endogamia teria ocorrido durante o próprio processo de seleção, e eventuais genes deletérios responsáveis pela queda de vigor teriam sido paulatinamente eliminados. Assim, linhas puras podem ser utilizadas como cultivares comerciais – situação bastante freqüente no mercado. No entanto, o uso de híbridos F_1 tem sido crescente entre este grupo de hortaliças, em virtude de algumas de suas vantagens, que incluem também, mas não necessariamente, um elevado grau de heterose. Os métodos de produção de sementes híbridas variam conforme a espécie ou mesmo com a cultivar a ser produzida. Em pepino, a existência de linhagens ginóicas torna relativamente fácil a produção de sementes híbridas, e, portanto, leva a um custo de sementes relativamente baixo. Já em outros casos, como o da abóbora híbrida Tetsukabuto, a produção de sementes híbridas envolve proteção individual dos botões florais femininos antes e após a polinização (que é manual) com sacos de papel que permitam a exclusão de insetos polinizadores – processo que demanda bastante mão-de-obra e contribui para um custo mais elevado de produção.

5.1 PEPINO – *Cucumis sativus* L.

Desde as primeiras décadas do século XX a superioridade dos híbridos F_1 de pepino é reconhecida. Hayes & Jones (1916) observaram heterose em pepino para produtividade e para número de frutos por planta, embora não para comprimento e peso médio dos frutos. Hutchins (1938) confirmou basicamente estes resultados, e também observou heterose para produção precoce. As diferenças em favor dos híbridos para produtividade diminuiam à medida que se aproximava o final da colheita – uma indicação que o maior efeito de heterose era sobre a precocidade. O advento da utilização de linhagens ginóicas de pepino, principalmente a partir da década de 1970, possibilitou a produção econômica de sementes F_1, e a produção de sementes híbridas se tornou comum.

Há uma certa controvérsia sobre o grau de heterose e tipo de ação gênica envolvido na expressão de caracteres em pepino. Há um conceito generalizado e antigo de que, em cucurbitáceas, não há redução em vigor devido à endogamia (Porter, 1933; Scott, 1933), embora alguns estudos mostrem o contrário (Borghi, 1976). Smith (1977) obteve estimativas de componentes de variância para diversas características em pepinos para conserva, e verificou que a maior parte da variância genética associada à produtividade era aditiva – uma indicação de que o grau de heterose em pepino talvez não seja elevado. Por outro lado, Ghaderi & Lower (1979) verificaram que, em geral, em várias populações que diferiam no grau de heterozigosidade, esta tinha um efeito positivo em todos os caracteres relacionados a produtividade – o que foi explicado pela existência de locos gênicos com dominância parcial. Como conseqüência, Ghaderi & Lower (1979) consideram que a depressão por endogamia pode existir em pepino.

A existência de heterose em pepino foi documentada por vários autores. Ghaderi & Lower (1978) relataram que os híbridos foram mais produtivos do que os pais, e apresentaram maior estabilidade fenotípica. Num cruzamento entre uma linhagem endogâmica de pepino de conserva e uma linhagem do acesso exótico *Cucumis sativus* var. *hardwickii*, Lower *et al.* (1982) observaram no F_1 heterose relativa

ao pai superior, tanto para produtividade quanto para comprimento da rama principal. Giordano *et al.* (1982) encontraram valores de heterose relativa ao pai superior em vários híbridos de pepino para mesa para caracteres relacionados à produção. Já em pepino de mesa do tipo Aodai, os híbridos não foram, em geral, capazes de superar as cultivares de polinização aberta (Pinto, 1978), embora algumas combinações híbridas específicas tenham-se mostrado promissoras, com aumentos de até 35% no número de frutos comerciais. No pepino tipo caipira, Filgueira *et al.* (1986) relataram para produção precoce nos híbridos valores de heterose relativa ao genitor superior de até 31%; para produção comercial acumulada, os valores foram em geral menores, e, em alguns casos, negativos.

Embora as vantagens dos híbridos de pepino sejam de há muito conhecidas, a disponibilidade de sementes híbridas foi, por muito tempo, limitada pelo alto custo da semente produzida, especialmente porque as cultivares ou linhagens disponíveis eram em geral monóicas (genótipo MM ff). Nestes casos, a produção de sementes híbridas deveria ser feita manualmente, com proteção das flores femininas seguida de polinização manual, e/ou com a eliminação manual dos botões florais masculinos antes da antese. A disponibilização de linhagens ginóicas (genótipo MM FF) facilitou significativamente a obtenção de sementes híbridas: como somente produzem flores femininas, estas linhagens se prestam sobremaneira como genitores femininos; usando-se uma linhagem monóica como genitor masculino, a polinização pode ser feita com abelhas, e na linhagem ginóica se colhem as sementes híbridas (genótipo MM Ff). A manutenção da linhagem ginóica é feita com a aplicação de sais de prata (nitrato ou tiosulfato de prata): o íon Ag^+ promove uma alteração da expressão de sexo – aparecem flores estaminadas, e a autofecundação (e manutenção) da linhagem ginóica é assegurada. Mesmo híbridos entre duas linhagens ginóicas (MM FF) podem ser facilmente obtidos, desde que, por ocasião da produção das sementes híbridas, uma das linhagens seja pulverizada com sais de prata, de modo a produzir (por algum tempo) flores estaminadas. Tanto os híbridos MM Ff como os MMFF podem ser considerados ginóicos, embora no primeiro caso, devido à dominância incompleta do alelo F, freqüentemente se empregue a denominação "preferencialmente feminino" (devido ao aparecimento ocasional de flores masculinas). Híbridos ginóicos em geral são mais precoces do que cultivares monóicas (híbridas ou não), e potencialmente mais produtivos, especialmente nos casos em que os frutos são colhidos poucos dias após a polinização (caso dos pepinos para conserva).

5.2 ABÓBORAS – *Cucurbita* spp.

O gênero *Cucurbita,* que compreende as abóboras, abobrinhas, morangas, mogangos e gerimuns, é nativo das Américas. Há evidências, através de sítios arqueológicos, no sudoeste dos Estados Unidos, México e norte da América do Sul, que plantas pertencentes às espécies *C. pepo*, *C. moschata*, *C. mixta* e *C. maxima* já eram amplamente cultivadas na pré-colombiana (Whitaker & Robinson, 1986). Os primeiros relatos sobre o gênero *Cucurbita* foram feitos pelos primeiros exploradores das Américas, os quais indicavam que frutos do gênero já eram utilizados e consumidos pelos povos indígenas por ocasião de seu descobrimento (Paris, 1989).

O principal produto olerícola das plantas do gênero *Cucurbita* é o fruto, que pode ser consumido na forma imatura (abobrinhas), cozida ou como salada ou na forma madura (abóboras), cozidas com açúcar (doces) ou sal (quibebes). Outras formas de consumo menos usuais são o de sementes torradas e salgadas e de ponteiras de ramas refogadas (cambuquira).

As espécies mais comumente utilizadas para consumo de frutos imaturos são *C. pepo* e *C. moschata*, e como frutos maduros *C. maxima* e *C. moschata*. Botanicamente o principal parâmetro de diferenciação entre estas espécies é a presença de pedúnculo pentagonal, não achatado na base nas plantas de *C. pepo*; pedúnculo pentagonal, achatado na base em *C. moschata;* e pedúnculo de secção arredondada, cortiço quando o fruto está maduro, em *C. maxima*.

Conforme relata Cardoso (1993), as principais cultivares de abobrinha, *C. pepo*, comercializadas no Brasil pelas companhias de sementes são: a) cultivares híbridas F_1: Bianca e Noiva (Agroflora), Clarice e Clarinda (Agroceres), Clarita (Petseed) e Ipanema (Asgrow); b) cultivares de polinização aberta: Branca da Virgínia, Caserta e Tronco Branca (diversas companhias). Da espécie *C. moschata* as principais cultivares utilizadas como abobrinha são: a) cultivares híbridas: Duda (Agroflora); b) cultivares de polinização aberta: Comunzinha, Menina Brasileira e Piramoita (diversas companhias).

As plantas das cultivares de *C. pepo* comumente utilizadas como abobrinha possuem hábito de crescimento braquítico, e seus frutos apresentam formato cilíndrico levemente afilado na direção do pedúnculo ou bojudo. No ponto comercial, suas dimensões variam entre 15 a 20 cm de comprimento e 4 a 6 cm de diâmetro, pesando 200 a 250 g. Paris *et al.* (1985) citam a cultivar Caserta como a mais tradicional representante deste grupo, apresentando formato cilíndrico/cônico, e coloração verde-clara com estrias verde-escuras. As plantas das cultivares de *C. moschata* podem possuir hábito de crescimento braquítico ou indeterminado, sendo os representantes mais tradicionais destes tipos as cultivares Piramoita e Menina Brasileira, respectivamente, que possuem frutos imaturos com pescoço e bojo. Recentemente foi introduzido no mercado brasileiro a cultivar híbrida F_1 Duda, também pertencente a espécie *C. moschata*, mas que apresenta frutos de formato cilíndrico/cônico, similares aos frutos da cultivar Caserta (Della Vecchia *et al.*, 1993).

A monoicia natural em plantas do gênero *Cucurbita* favorece a polinização cruzada, podendo ocorrer autofecundação (Bushnell, 1922; Whitaker, 1962). Os resultados das pesquisas são, em alguns aspectos, contraditórios quanto à perda de vigor causada pela endogamia, nas espécies *C. maxima, C. moschata e C. pepo*. Autofecundação durante 10 gerações, em *C. maxima*, não afetou as características de vigor e capacidade reprodutiva (Cummings, 1928). Bushnell (1922) estudando o efeito da endogamia na espécie *C. pepo*, constatou que não ocorria necessariamente perda de vigor durante o processo de autofecundação. Peixoto (1987) a partir de uma população de espécie *C. moschata*, do grupo Baianinha, obteve linhagens com destacada produtividade, na maioria das características de qualidades de fruto, durante seis gerações de autofecundação. O autor afirma que essas linhagens poderão ser usadas como variedades de polinização aberta ou na produção de híbridos F_1.

Apesar de os resultados encontrados na literatura consultada suportarem a hipótese de reduzida depressão por endogamia em *Cucurbita* (Allard, 1971; Bushnell, 1922; Cummings, 1928; Hume & Lovell, 1981; Hutchins & Croston, 1941; Peixoto, 1987; Whitaker, 1962), alguns resultados de pesquisas mais recentes mostram depressão causada pela endogamia para várias características em *C. pepo* e *C. maxima* (Borgui, 1976; Chekalina, 1977). Chekalina (1977) em estudos realizados com linhas obtidas de três gerações de autofecundação, em diferentes variedades de *C. maxima* e *C. pepo*, observou depressão resultante da endogamia para potencial de germinação, presença de aclorofilados, taxa de crescimento e desenvolvimento, dias para antese das masculinas e femininas e peso de frutos. O efeito da endogamia deveu-se a genes letais e subletais, que estavam acobertados por outros genes (Bushnell, 1982; Crow, 1948). Entretanto, as linhas obtidas apresentaram resultados diferentes com relação à perda de vigor. Outros investigadores também obtiveram resultados semelhantes (Borgui, 1976; Crow, 1948; Shifriss, 1947).

Conforme Allard (1971), apesar da alogamia na família Cucurbitaceae, as populações comportaram-se como autógamas com relação à depressão causada pela endogamia. Mas parecem coexistir, dentro de algumas espécies, populações com mecanismos genéticos complexos, que se comportam em alguns casos como populações autógamas e em outros, como alógamas (Borgui, 1976).

A ausência de depressão por endogamia em *Cucurbita* não implica que a heterose seja desprezível (Whitaker & Robinson, 1986). Cruzamentos dialélicos entre linhas endogâmicas de *C. pepo*, em geral, mostraram que as linhagens apresentaram menor vigor do que os híbridos F_1. Mas algumas linhagens portadoras de genes dominantes foram superiores ou iguais aos híbridos F_1, nas características avaliadas, indicando que a possível interação entre genes dominantes pode ser uma alternativa para explicar a superioridade dos híbridos em relação às linhas parentais (Borgui, 1976).

Em *Cucurbita*, dentre as vantagens do híbrido F_1 sobre as variedades de polinização aberta, podem ser destacadas precocidade, maior uniformidade, redução no comprimento da rama e maturação mais uniforme (Curtis,1940; Doijode & Sulladmath, 1982; Doijode & Sulladmath, 1983; Peixoto, 1987; Whitaker & Robinson, 1986). O alto custo, porém, de produção das sementes híbridas F_1 (Hume & Lovell, 1981), bem como a necessidade de aquisição destas pelo agricultor, em cada plantio, são fatores limitantes ao seu cultivo. Assim, como as variedades de polinização aberta podem produzir tanto quanto os híbridos, estas podem constituir uma alternativa economicamente mais viável. Além disso, sabe-se que a adoção de um único genótipo resulta em vulnerabilidade genética na cultura, trazendo sérios prejuízos à manutenção da variabilidade genética das espécies do gênero *Cucurbita* (Gardingo,1986; Gopalakrishaman *et al.*,1980). Por outro lado, parece possível obter genótipos mais precoces, com menor comprimento de ramas laterais, maturação concentrada e alto vigor, selecionando-se variedades a partir de populações portadoras do gene braquítico Bu.

Sendo o fruto imaturo de abobrinha o produto de valor olerícola, a heterose comercial é representada principalmente pelo aumento do número de frutos por planta e pela precocidade. Heterose em abobrinha foi primeiramente registrada por Curtis (1940). Curtis (1941) trabalhando com populações parentais e gerações F_1 e F_2 em *C.*

pepo, relatou valores de heterose em colheita precoce, de 114% sobre a média parental (Hmp), e 87% sobre o parental superior (Hps). Na geração F_2 obteve valores de 87% e 64% respectivamente. Em relação a colheita total, o autor obteve na geração F_1 valores de Hmp = 16% e Hps = 0; e na geração F_2 valores de Hmp = 10% e Hps = -7%. Apesar dos poucos dados disponíveis, Curtis (1941) sugere efeitos de sobredominância para o caráter precocidade. Sirohi *et al.* (1986) também obtiveram dados que sugerem efeito de sobredominância para precocidade de florescimento em *C. moschata*.

Outro trabalho demonstrando a heterose do híbrido F_1 em *C. pepo* foi relatado por Elmstrom (1978). Trabalhando com abobrinhas de coloração amarela, mostrou que 9 híbridos comerciais F_1 foram, em média, 46% mais produtivos do que as 3 variedades padrões, em colheita precoce, e 19% em colheita total. No grupo de abobrinhas de coloração verde, 12 híbridos comerciais F_1 foram, em média, 20% mais produtivos do que as 2 variedades padrões em colheita precoce, e 24% em colheita total. Comparando-se o melhor híbrido F_1 com a melhor variedade padrão, a vantagem do grupo amarelo foi de 52% em colheita precoce e 22% em colheita total; no grupo verde a vantagem foi de 61% e 41%, respectivamente.

Koch (1995) trabalhando com *C. pepo* observou valores de heterose para produção total na ordem de 48%, e para produção precoce de até 58%, porém a comparação da magnitude relativa da CGC e CEC mostrou nitidamente a predominância dos efeitos gênicos aditivos envolvidos na expressão dos caracteres estudados. Firpo *et al.* (1998) ao calcular a heterose relativa ao melhor dos genitores em *C. pepo* obteve valores para precocidade de número de frutos na ordem de 275,4%, e para número total de frutos na ordem de 41,1%. Estes resultados parecem justificar a adoção, por parte do produtor, de cultivares híbridas F_1 em abobrinhas, o que explica seu uso crescente entre os agricultores brasileiros.

No segmento de abóboras secas, a partir da década de 1970, generalizou-se no Brasil o uso comercial de uma abóbora híbrida de origem japonesa, denominada Tetsukabuto (na verdade, há diversas Tetsukabuto no mercado, dependendo das linhagens utilizadas como genitores e das firmas que as produzem). Trata-se de híbrido interespecífico entre *C. maxima* x *C. moschata,* utilizado em escala comercial. Em virtude de se tratar de cruzamento interespecífico, as Tetsukabuto são macho-estéreis, e requerem o uso de um polinizador (*C. maxima* ou *C. moschata*) para produção normal de frutos. Apesar desta limitação, a Tetsukabuto é um híbrido bastante vigoroso e produtivo (embora a exata grandeza da heterose no cruzamento não possa facilmente ser conhecida, devido à indisponibilidade das linhagens parentais para comparação). Possui frutos em torno de 2 kg, com excelente qualidade culinária, e bastante resistentes ao transporte – fatores que podem explicar sua aceitação.

O sucesso da Tetsukabuto importada levou alguns autores brasileiros (Pedrosa, 1981; Cheng *et al.*, 1982) a também explorarem híbridos entre *C. maxima* x *C. moschata*, que fossem competitivos com os importados, mas as dificuldades na produção de híbridos interespecíficos em escala comercial no Brasil (baixa produtividade em sementes, contaminações de lote por sementes da linha parental feminina, e dificuldades no treinamento de mão-de-obra para a polinização manual) tornaram esta alternativa pouco viável. Uma outra abordagem foi apresentada por Maluf (não publicado), que propôs o desenvolvimento de híbridos intra-específicos

de *C. maxima*, no qual uma das linhagens parentais é braquítica (tipo moita): os híbridos – denominados Samantha ou Poliana, cujos frutos tem coloração e formato semelhantes ao Tetsukabuto – tem hábito compacto, o que lhes permite alta densidade de plantio (10000 a 14000 plantas por hectare), e, com isso, têm produtividade 3 a 4 vezes a produtividade de uma cultivar normal não compacta (35 a 40 toneladas por hectare). Do ponto de vista de produção comercial de sementes, a produção destes híbridos intra-específicos é mais fácil, o que viabiliza a sua produção no país: dispensa-se a polinização manual, limitando-se a mão-de-obra à remoção dos botões florais masculinos da linhagem feminina antes da antese, após o emprego do etephon (regulador de crescimento que suprime parte das flores masculinas na linhagem materna) (Rezende, 1992). A técnica empregada nesta produção é semelhante à empregada pela maioria das empresas de sementes para a produção de híbridos intra-específicos de abobrinha *C. pepo*.

5.3 MELÃO – *Cucumis melo* L.

Híbridos de melão têm sido empregados, especialmente a partir dos anos 90, nas regiões brasileiras produtoras, notadamente no Rio Grande do Norte. São híbridos nacionais ou importados, que aliam maior resistência a doenças a uma maior produtividade, relativamente à cultivar tradicional de polinização aberta Amarelo. Têm, em geral, características de formato, coloração e conservação de frutos semelhantes às da cultivar Amarelo, e, como esta, pertencem ao grupo denominado *inodorus* (melões não aromáticos com elevada conservação de frutos em pós-colheita).

Atualmente, a maioria das cultivares de melão plantadas no Brasil, tanto para o mercado externo como para exportação, pertence ao grupo *inodorus*, cujos frutos, de alta conservação, não se destacam da planta quando atingem a maturidade, e permitem condições mais simples de manejo e transporte. O emprego de alguns híbridos F_1 de melão do tipo Amarelo tem sido responsabilizado por uma queda na qualidade (teor de sólidos solúveis) dos frutos colhidos, embora a produtividade total por unidade de área seja incrementada (Pedrosa[1]). No entanto, há indicações de que esta situação se refira a apenas um ou a poucos híbridos, uma vez que em outros casos este problema parece não existir.

Plantio em maior escala de melões dos tipos *cantalupensis* e *reticulatus* – tipos predominantes na Europa e EUA – em regiões produtoras do Nordeste são limitados pela sua baixa capacidade de conservação dos frutos. Estes melões são aromáticos e exigem técnicas mais aprimoradas de determinação de ponto de colheita, uma vez que se forma em torno do pedúnculo do fruto uma camada de abscisão, responsável pelo destacamento do fruto da planta quando plenamente maduro. Posteriormente, o transporte, sob condições ideais, deve ser feito sob frigorificação, prática que não é comum no grupo *inodorus*.

Uma perspectiva interessante que se abre para o melhoramento genético do meloeiro do grupo *cantalupensis* (e presumivelmente também do grupo *reticulatus*) é o do uso de híbridos F_1 para a melhoria de sua capacidade de conservação pós-colheita. Estudos recentes de Shellie & Wolf (1995) sugerem que híbridos F_1 de meloeiro entre os grupos *inodorus* e *reticulatus* podem representar um considerável avanço no sentido de retardar a maturação e melhorar a conservação pós-colheita, relativamente ao genitor *reticulatus* (embora não relativamente ao *inodorus*) (Tabela 1).

[1]Pedrosa, J.F. (Escola Superior de Agricultura de Mossoró) Comunicação Pessoal, 1999.

TABELA 1. Características de maturação de fruto e conservação de frutos de melão dos grupos *inodorus, reticulatus* e de seu híbrido F_1.

Tipo de cultivar de meloeiro	Taxa de respiração durante maturação	Produção de etileno durante maturação	Abscisão do fruto maduro
var. *inodorus*	baixa	baixa	não
var. *reticulatus*	alta	10 vezes maior	sim
F1 (*inodorus* x *reticulatus*)	baixa	similar à. var. *reticulatus*	sim, mas 2 a 4 dias mais tardia do que na var. *reticulatus*

Adaptado de Shellie & Wolf (1995)

Wang & Ng (1998) mediram os picos de etileno durante a maturação de frutos de melões *inodorus, cantalupensis* e seus híbridos F_1. Verificaram, em média, que o pico nos tipos *cantalupensis* foi seis vezes superior ao pico nos *inodorus* (137 ppm versus 23 ppm); nos híbridos F_1, foi em média 66 ppm – um valor intermediário aos genitores, que sugere ação gênica aditiva. Os autores sugerem que o valor do pico de etileno parece ser o mais útil índice para determinar a capacidade de conservação pós-colheita dos frutos nos dois cultigenes e em seus híbridos. Embora a ausência de heterose para tamanho do pico do etileno seja evidente, as conclusões de Wang & Ng (1998) sugerem que um significativo grau de 'heterose-padrão' relativa ao grupo *cantalupensis* no que tange à capacidade de conservação.

6. HETEROSE NAS CRUCÍFERAS

As crucíferas (brassicáceas) compreendem um grande número de espécies dos gêneros *Brassica* e *Raphanus*, principalmente, e englobam desde hortaliças folhosas (couve, couve-flor, couve-brócolos, repolho, couve-de-Bruxelas, couve-chinesa, mostardas de folhas), raízes comestíveis (rábano, rabanete, nabo), condimentos (mostardas-de-grão) até plantas oleaginosas (colza, canola). Dentre as hortaliças, as de maior importância econômica correspondem aos diferentes cultigenes da espécie *Brassica oleracea:* repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), couve-brócolos (*B. oleracea* var. *italica*), couve-manteiga (*B. oleracea* var. *acephala*), repolho crespo ou de Sabóia (*B. oleracea* var. *sabauda*), couve-de-Bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*), o 'gallillon' (*B. oleracea* var. *alboglabra*).

As brássicas são espécies alógamas de polinização entomófila, onde a predominância da alogamia nas populações é em geral assegurada pela existência de loco altamente polimórfico, com múltiplos alelos para auto-incompatibilidade (de tipo esporofítico). Em geral a endogamia leva à queda de vigor (com exceção de algumas populações, normalmente selecionadas sob baixos tamanhos efetivos de população, e nas quais a freqüência de alelos para auto-incompatibilidade costuma ser baixa ou mesmo nula). Híbridos entre linhagens endogâmicas podem mostrar restauração do vigor (heterose) e mostram maior uniformidade (genética e fenotípica) do que cultivares não híbridas. O uso de cultivares híbridas é amplamente disseminado, e em repolhos, brócolos, couve-de-Bruxelas (e, em escala ligeiramente menor, couve-flor) constitui a quase totalidade das sementes comercializadas no Japão, Estados

Unidos e Europa. Sementes híbridas são obtidas normalmente através do emprego de linhagens auto-incompatíveis, obtidas a partir da seleção de plantas auto-incompatíveis encontradas nas populações de polinização aberta. Outros sistemas de controle de polinização, como a macho-esterilidade citoplasmática, têm sido também utilizados, mas em menor escala.

6.1 REPOLHO – *Brassica oleracea* var. *capitata*

Tradicionalmente, cultivares de repolho exigem um certo número de horas de frio para o florescimento, que em muitos casos dificilmente pode ser satisfeito na maioria das regiões brasileiras. Por esta razão, o melhoramento do repolho no Brasil, a partir da década de 1950, tem-se limitado em geral a populações subtropicais locais (Louco, Louquinho, União). Estas populações e suas contrapartidas existentes em alguns poucos países também tropicais e subtropicais (Venezuela, Taiwan), apresentam a característica básica de florescerem mesmo sob invernos relativamente amenos, como os prevalecentes nas regiões de latitute próximas aos trópicos de Capricórnio ou de Câncer. Se, por um lado, esta habilidade permite a existência de programas de melhoramento de repolho no país, por outro lado limita a utilização destes materiais melhorados ao cultivo de verão: o emprego comercial de tais repolhos subtropicais no inverno dos trópicos pode levar ao florescimento prematuro das plantas, que as inutiliza para fins comerciais.

É compreensível, pois, que tenham predominado no mercado brasileiro materiais de repolho provenientes de países temperados, menos suscetíveis ao pendoamento prematuro no inverno. Repolhos 'nacionais' (subtropicais) ficavam limitados ao plantio de verão, quando as cultivares importadas muitas vezes não chegavam a produzir cabeças comerciais sob altas temperaturas. A partir da década de 1960, foram sendo introduzidos híbridos de origem japonesa, que, em virtude de sua maior uniformidade, ganharam fatias substanciais do mercado de sementes. Inicialmente tardios e bastante suscetíveis a doenças como a podridão negra (causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris,* e problema especialmente no verão), seu plantio em condições ideais era limitado ao período de inverno, deixando o mercado no verão aberto à competição do germoplasma nacional. A partir da década de 1980, principalmente, novos híbridos japoneses, mais precoces, uniformes, com cabeças pequenas (1,5-2,0 kg) e tolerantes à podridão negra, foram introduzidos. Estes híbridos podem atualmente ser plantados durante todo o ano, e têm por este motivo constituído a quase totalidade das sementes comercializadas no país.

Apesar destas dificuldades, vários estudos têm sido conduzidos no Brasil nas últimas décadas visando à obtenção de híbridos comerciais de repolho. Ikuta (1971) obteve híbridos entre linhagens oriundas da população 'Louco' e germoplasma de origem japonesa, o que levou posteriormente à criação dos híbridos de verão Mogiano e ESALQ-84. Empresas privadas também investiram na criação de híbridos a partir de germoplasma nacional, e vários híbridos para o cultivo de verão, como Chumbinho e Master, bastante tolerantes à podridão negra, foram lançados. A partir de cruzamentos entre repolhos de verão brasileiros e híbridos japoneses, Giordano *et al.* (1990) obtiveram uma população de repolho de verão denominada 'União', com ampla variabilidade genética, que pudesse ser utilizada como fonte de germoplasma e de onde pudessem ser extraídas linhagens parentais para programas de hibridação.

Pereira (1994) avaliou o potencial da população União para o desenvolvimento de híbridos intra e interpopulacionais. Os ensaios foram conduzidos na região de Campinas-SP, durante o inverno, de maneira a se poder avaliar a tendência ao pendoamento prematuro, que pode limitar a competitividade dos eventuais híbridos daí derivados relativamente ao seus competidores importados. Embora se tivesse encontrado ampla variabilidade genética entre as combinações híbridas experimentais para precocidade, compacidade e qualidade de cabeça, e tendência ao pendoamento prematuro, em geral estes híbridos (notadamente os intrapopulacionais) foram inferiores nestes aspectos aos híbridos japoneses utilizados como testemunhas. A população União não se revelou, pois, promissora no curto prazo para a obtenção de linhagens que levem à obtenção de híbridos competitivos com importados no mercado brasileiro.

6.2 COUVE-FLOR – *Brassica oleracea* var. *botrytis*

No Brasil, o desenvolvimento de híbridos de couve-flor derivou da necessidade de se estender o plantio de verão, de modo a permitir produção da hortaliça na meia-estação (transição entre verão e outono, principalmente), em regiões do cinturão verde de São Paulo. A cultivar de polinização aberta Piracicaba Precoce, criada por Marcílio Dias (ESALQ/USP) em 1952 (Dias, 1966), é adaptada ao cultivo de verão no sudeste do Brasil, mas seu plantio de modo a produzir cabeças na meia-estação freqüentemente se frustrava pela elevada suscetibilidade ao pendoamento prematuro (*buttoning*): sendo uma cultivar altamente intolerante a baixas temperaturas (que induzem o *buttoning*), a incidência da anomalia era alta na meia-estação, onde a temperatura noturna pode ser com freqüência 20 ou mais graus centígrados inferior à temperatura diurna. Híbridos entre Piracicaba Precoce e populações locais de couve-flor de inverno mostraram-se também apropriados para a cultura de verão, mas tolerantes às variações de temperatura na meia-estação e ao *buttoning*. O interesse despertado por estes híbridos foi tal que por volta de 1960 iniciou-se a produção comercial de sementes híbridas, utilizando-se técnicas de polinização manual (Ikuta & Paterniani, 1979). Dentro de poucos anos, o processo de polinização manual na produção de sementes híbridas foi substituído pelo uso de linhagens homozigóticas para alelos de auto-incompatibilidade (Ikuta & Paterniani, 1979) – processo mais utilizado para a produção de sementes híbridas de crucíferas em todo o mundo.

Embora tornada mais fácil pela utilização de linhagens auto-incompatíveis, a tecnologia de produção de sementes de couve-flor no Brasil ainda comporta melhorias. Em particular, dois aspectos merecem atenção: melhor sincronização do florescimento entre as linhagens parentais e a procura de novos genitores com melhor capacidade de combinação. Baldini & Silva (1985a) demonstraram que a população Piracicaba Precoce, frequentemente utilizada como fonte de linhagens parentais, é geneticamente variável para data de maturação, peso da cabeça, número de folhas, diâmetro e qualidade da cabeça. Tanto a variação genética aditiva quanto a não-aditiva foram importantes (Baldini & Silva, 1985b): a queda na produção de sementes por planta em conseqüência da endogamia ilustra a importância da variação genética não-aditiva. Esta variação intrapopulacional pressupõe variação para capacidade de combinação entre plantas de 'Piracicaba Precoce', quando usadas em combinações híbridas, o que foi posteriormente confirmado por Maluf *et al.* (1988a) e Maluf *et al.* (1989).

Em 1969, uma produção piloto de 20 kg de sementes híbridas foi obtida por Hiroshi Ikuta (ESALQ/USP), com o uso de linhagens auto-incompatíveis; a partir de 1974/75, essa técnica passou a ser empregada por empresas privadas de sementes na obtenção de híbridos comerciais (Ikuta & Paterniani, 1979). No entanto, a produção de sementes híbridas de couve-flor ainda enfrenta dificuldades (Maluf *et al.*, 1988b). A produção de híbridos de verão é inerentemente difícil, devido à natureza contrastante das linhagens parentais: a linhagem parental de inverno deve ser transplantada no campo semanas antes da linhagem de verão, de maneira a permitir sincronização do florescimento, mas o intervalo exato entre os plantios é sujeito a variações de ano para ano, dependendo das temperaturas. Além disso, a obtenção de linhagens endogâmicas com boa capacidade de combinação e homozigotas para auto-incompatibilidade é um processo laborioso (intensivo em mão-de-obra) e demorado, levando com freqüência 5-6 anos ou mais. O processo pode ser abreviado com o uso de técnicas de clonagem de plantas *in vitro*, disponíveis para couve-flor (Torres *et al.*, 1978): plantas auto-incompatíveis (homozigóticas ou não para auto-incompatibilidade) e macho-estéreis (macho-esterilidade genética ou citoplasmática) podem ser mantidas e produzidas economicamente por técnicas *in vitro*, independentemente do grau de endogamia, e podem ser utilizadas como genitores de híbridos comerciais. A viabilidade desta alternativa na produção de híbridos foi demonstrada, não somente para couve-flor (Maluf *et al.*, 1988b; Maluf & Corte, 1990a), mas também para o repolho (Maluf & Corte, 1990b; Souza *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.

ANDRADE-JÚNIOR, V.C. Avaliação do potencial produtivo e da firmeza pós-colheita de frutos em híbridos de tomateiro. Lavras: UFLA, 1999. 54p. Dissertação, Mestrado.

ARAÚJO, M.L. Avaliação de cultivares rasteiros e híbridos F_1 de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em cruzamentos dialélicos. Viçosa: UFV, 1988. 46p. Dissertação, Mestrado.

BALDINI, A.L.C.; SILVA, N. Estimativas de parâmetros genéticos em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, v.3, p.21-23, 1985a.

BALDINI, A.L.C.; SILVA, N. Conseqüência de uma geração de endogamia em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, v.3, p.24-26, 1985b.

BETLACH, J. Some results of heterosis breeding of sweet peppers (*C. annuum* L.). **Genetika a Slechteni**, Praha, v.3, p.259-352, 1967. /Resumo em **Plant Breeding Abstracts**, v.38, n.4, p.854, Oct.1968/

BLANK, A.F. Teste precoce da capacidade combinatória de linhagens de pimentão *(Capsicum annuum* L.). Lavras: UFLA, 1997. 71p. Tese, Doutorado.

BLANK, A.F.; MALUF, W.R. Gene action and early testing for combining ability in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, v.51, p.319-324, 1997.

BORGHI, B. Evaluation of heterosis in *Cucurbita pepo* L. In: JÁNOSSY, A.; LUPTON, F.G.H. (Ed.) **Heterosis in plant breeding**; proceedings. New York: Elsevier, 1976. p.219-225. (Congress of Eucarpia, 7.)

BRAZ, L.T. Avaliação de caracteres agronômicos e qualitativos de três cultivares de pimentão *(Capsicum annuum L.)* e da heterose em seus híbridos F_1. Viçosa: UFV, 1982. 72p. Dissertação, Mestrado.

BURDICK, A. B. Genetics of heterosis for earliness in tomato. **Genetics**, v.39, p.488-505, 1954.

BUSHNELL, J.W. Isolation of uniform types of hubbard squash by inbreeding. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.19, p.139-144, 1922.

CAMPOS, J.P.; BLUMENSCHEIN, A.; CASALI, V.W.D.; RODRIGUES, J.J.V. Avaliação de oito cultivares de jiló (*Solanum gilo* Raddi) e suas progênies híbridas F_1. **Revista de Olericultura**, v.17, p.204-213, 1979.

CARDOSO, A.I.I. Herança de características de frutos de *Cucurbita moschata* Duch. com hábito de crescimento braquitico. Botucatu, FCMAB/ UNESP,1993. 81p. Dissertação, Mestrado.

CASALI, V.W.D.; COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v.10, p.8-10, 1984.

CHEKALINA, I.N. Effect of inbreeding on variability of winter squash (*Cucurbita maxima* Dusch.) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). **Soc. Genet.**, v.12, p.550-553, 1977.

CHENG, S.S. Avaliação de algumas características agronômicas em híbridos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Viçosa: UFV, 1972. 36p. Dissertação, Mestrado.

CHENG, S.S.; PEDROSA, J.F.; CHU, E. Comportamento de híbridos de moranga (*Cucurbita maxima*) com progenitores masculinos brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 39., Vitória, 1982. **Resumos.** Vitória: Sociedade de Olericultura do Brasil, 1982. p.102

CIKLEW, G. A comparative study of large fruited varieties of red pepper in the Sandanski-Petric area. **Gradin. Lozar. Nauk. Hort. Viticult.**, v.3, p.227-232, 1966. /Resumo 1190 em **Plant Breeding Abstracts**, v.37, 1966/

COSTA, C.P. Estudo da esterilidade masculina e identificação de linhas complementares (N msms) na variedade brasileira de cebola Baia Piriforme Precoce Piracicaba (*Allium cepa* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1967. 32p. Dissertação, Mestrado.

COSTA, C.P. Melhoramento de cebola (*Allium cepa L.*) em dias curtos para sistemas de cultivo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1978. 138p. Tese, Livre-docência.

COSTA, C.P.; DIAS, M.S. Comportamento de alguns híbridos experimentais de variedades de cebola. **Relatório Científico do Departamento de Genética**, Piracicaba, n.1, p.91-94, 1967.

CRAM, N.M. Hybrid vigor of the Redskim tomato in reciprocal crosses. **Proceedings of the American for Horticultural Science**, v.60, p.415-418, 1952.

CROW, J.F. Alternative hypothesis of hybrid vigour. **Genetics**, v.33, p.477-487, 1948.

CUMMINGS, M.B.; JENKINS, E.W. Pure line studies with tem generations of hubbard squash. **Vermont Agricultural Experiment Station Bulletin**, v.280, 1928. 29p.

CURRENCE, T.M.; LARSON, R.E.; VIRTA, A.A. A comparison of six tomato variets or parents of F_1 lines resulting from fifteen possible crosses. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.45, p.349-352, 1944.

CURTIS, L.C. Comparative earlines and productiveness of first and second geration summer squash (*Cucurbita pepo*) and the the possibilities of using the second geration seed for commercial planting. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.38, p.396-398, 1941.

CURTIS, L.C. Heterosis in summer squah (*Cucurbita pepo* L.) and the possibilities of producing F_1 hybrid seed for comercial planting. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**,v.37, p.827-828, 1940.

DELLA VECCHIA, P.T.; TERENCIANO SOBRINHO, P.; TERENCIANO, A. Breeding bush type of C. moschata with field resitance to PRSV-W. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v.16, p.70-72, 1993.

DEPESTRE,T.; ESPINOSA, J. Heterotic effect in sweet pepper under Cuban conditions. **Capsicum Newsletter**, v.5, p.35, 1986.

DEU, H.; RATTAN, R.S.; THAKUR, M.C. Heterosis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Horticultural Journal**, v.7, p.125-132, 1994.

DIAS, M.S. **Couve-flor:** semente dá trabalho. São Paulo: Ed. Abril, 1966. p.134-141. (Guia Rural, 1966/67)

DIKIL, S.P.; STUDENTSOVA, L.I.; ANIKEENKO, V.S. Heterosis in pepper. *Trudi po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, v.49, p.252-269. /Resumo 161 em **Plant Breeding Abstracts**, v.44, n.1, p.161, 1974.

DOIJODE, S.D.; SULLADMATH, U.V. Genetics of heterosis and inbreeding depression for certain quantitative characters in pumpkin (*C. moschata* Poir). **Egyptian Journal of Genetics and Citology**, v.11, p.135-141, 1982.

DOIJODE, S.D.; SULLADMATH, U.V. Hybrid vigour in pumpkin (*Cucurbita moschata* Poir.). **Genética Agrária**, v.36, n.1, 1983.

ELMSTROM, G.W. Evaluation of summer squash varieties for Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.91, p.322-324, 1978.

FARKAS, J. Tomato breeding in Hungary-Current varietal situation. **Hungrian Agricultural Research**, v.3, p.23-27, 1994.

FILGUEIRA, F.A.R.; GIORDANO, L.B.; FERREIRA, P.E.; DELLA-VECCHIA, P.T. Avaliação de híbridos F_1 de pepino do tipo caipira. **Horticultura Brasileira**, v.4, p.17-20, 1986.

FIRPO, I.T.; ANIDO, F.L.; GARCIA, S.M.; COINTRY, E. Heterosis in summer squash (*C.pepo* L.). **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v.21, p.43-45, 1998.

FREITAS, J.A. Produtividade e qualidade de frutos híbridos de tomateiro, heterozigotos no loco alcobaça. Lavras: UFLA, 1996, 87p. Dissertação, Mestrado.

FREITAS, J.A.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A.; OLIVEIRA, A.C.B.; MARTINS, V.S.; BRAGA, R.S. Padrão de amadurescimento e conservação pós-colheita de frutos de tomateiro em função das diferentes constituições genotípicas no loco *alcobaça*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.191-196, 1998.

GALVÊAS, P.A.O. Características agronômicas de sete cultivares de pimentão (Capsicum annuum L.) e heterose de seus híbridos. Viçosa: UFV, 1988. 83p. Dissertação, Mestrado.

GARDINGO, J.R. Aplicações das técnicas de cultura de embrião e diversidade gamética na hibridação interespecífica no gênero *Cucurbita*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1986. 139p. Dissertação, Mestrado.

GHADERI, A.; LOWER, R.L. Heterosis and inbreeding depression for yield in populations derived from six crosses of cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.104, p.564-567, 1979.

GHADERI, A.; LOWER, R.L. Heterosis and phenotypic stability of F_1 hybrids in cucumber under controlled environment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.103, p.275-278, 1978.

GILL, H.S.; THAKUR, P.C.; THAKUR, T.C. Combining ability in sweet pepper (*Capsicum annuum* L., var. *grossum* Sendt.). **Indian Journal of Agricultural Science**, v.43, p.918-921, 1973.

GIORDANO, L.B.; FERREIRA, P.E.; LOPES, J.F. Análise dialélica em pepino para mesa, visando o estudo de características relativas à produção. **Horticultura Brasileira**, v.3, p.16-20, 1982.

GIORDANO, L.B.; SILVA, N.; BUSO, J.A. **União, um repolho para o verão.** Brasília: EMBRAPA, CNPH; UNESP, 1990. 4p.

GOMES, L.A.A. Avaliação de híbridos intervarietais de cebola (*Allium cepa* L.) 'Pira-Ouro' x 'Pirana Precoce' no sistema de bulbinhos. Lavras: ESAL, 1993. 59p. Dissertação, Mestrado.

GOMES, L.A.A.; MALUF, W.R. Avaliação de híbridos intervarietais de cebola (*Allium cepa* L.) 'Pira-Ouro' x 'Pirana Precoce' no sistema de bulbinhos. **Ciência e Prática**, v.19, p.233-240, 1995.

GOPALAKRISHMAN, T.R.; GOPALAKRISHMAN, P.K.; PETER, K.V. Variability, herdability and correlation among some polygenic characters in pumpkin. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.50, n.20, 1980.

GUIMARÃES, F. Estudos preliminares sobre a produção híbrida no Rio Grande do Sul. **Agronomia Sulriograndense**, v.3, p.23-34, 1958.

HAYES, H.K.; JONES, D.F. First generation crosses in cucumbers. **Annual Report of the Connecticut Agricultural Experiment Station**, p.319-322, 1916.

HEDRICK, W.P; BOOTH, N.O. Mendelian characters in tomatoes. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.5, p.19, 1908.

HEISER JR., C.B. Peppers, *Capsicum* (Solanaceae). In: SIMONDS, N.W. (Ed.) **Evolution of crop plants.** 2.ed. London: Longman, 1979. p.265-268.

HUME, J.R.; LOVELL, P.H. Reduction of the cost involveld in hybrid seed producion of pumpkins (*C. maxima* Duch.). **Journal of Experimental Agriculture**, v.9, p.209-210, 1981.

HUTCHINS, A.E. Some examples of heterosis in cucumber *Cucumis sativus* L. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.36, p.660-664, 1938.

HUTCHINS, A.E.; CROSTON, F.E. Productivity of F_1 hybrids in the squash, *C. maxima*. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.39, p.332-336, 1941.

IKUTA, H. Melhoramento e genética da berinjela. In: KERR, W.E. (Org.) **Melhoramento e genética**. São Paulo: Melhoramentos, 1969. cap.9, p.161-168.

IKUTA, H. Ensaio de híbridos F_1 entre linhagens S_3 de repolho Louco e híbridos F_1 japoneses. **Revista de Olericultura**, v.11, p.69-70, 1971.

IKUTA, H. **Vigor de híbrido na geração F_1 em berinjela** (*Solanum melongena* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1961. 41p. Tese, Doutorado.

IKUTA, H.; PATERNIANI, E. Produtividade de sementes de linhagens homozigóticas auto-incompatíveis da couve-flor Piracicaba Precoce nº 1. **Relatório Científico do Departamento de Genética**, Piracicaba, n.13, p.138-148, 1979.

IKUTA, H.; VENCOVSKY, R. Ensaio de híbridos F_1 de variedades de pimentão resistentes a virose. **Relatório Científico do Departamento de Genética**, Piracicaba, n.4, p.62-65,1970.

INNECCO, R. Avaliação do potencial agronômico de híbridos e capacidade combinatória de linhagens de pimentão *(Capsicum annuum L.)*. Lavras: UFLA, 1995. 113p. Tese, Doutorado.

JONES, H.A.; CLARKE, A.E. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.43, p.189-194, 1943.

JONES, H.A.; EMSWELLER, S.L. A male-sterile onion. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.34, p.582-585, 1936.

JONES, R.A.; SCOTT, S.J. Genetic potential to improve tomato flavor in comercial F_1 hybrids. **Journal of the American for Horticultural Science**, v.109, p.318-321, 1984.

JOSHI, S.; THAKUR, P.C.; VERMA, T.S.; VERMA, H.C. Intervarietal crossing of bell and hot pepper augments the hybrid seed yield. **Capsicum Newsletter**, v.10, p.53-54, 1991.

KAUL, B.L.; SHARMA, P.P. Correlation and path coefficient analysis studies in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **South Indian Horticulture**, v.37, n.1, p.16-18, 1989. /Resumo 11741 em **Plant Breeding Abstracts**, v.61, n.12, p.1496, Dec. 1991/

KHADI, B.M.; GOUD, J.V. Hybrid vigour for yield in chilli (*Capsicum annuum* L.). **Experimental Genetics**, Dharwad, v.3, n.1/2, p.7-11. 1987. /Resumo 9801 em **Plant Breeding Abstracts**, v.59, n.11, p.1088, Nov. 1989/

KHALF-ALLAH, A.M.; ABDEL-AL, Z.E.; GAD, A.A. Combining ability in peppers (*Capsicum annuum* L.). **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v.4, p.297-304, 1975.

KIKAZAKI, Y. Hybrid vigor in eggplants and its practical utilization. **Genetics**, v.16, p.1-25, 1931.

KOCH, P.S. Análise genética de um cruzamento dialélico em abobrinha (*Cucurbita pepo* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 79p. Disssertação, Mestrado.

LAPUSHNER, D.; FRANKEL, R.; GUTTMAN, R.; GUTTMAN, L Genetics variation in a large population of tomato variets: I. Analysis of distribuition of single traits. **Euphytica**, v.22, p.484-494, 1973.

LARSON, R. E. The F_1 combining ability of certain tomato varieties. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.39, p.313-314, 1941.

LIPPERT, L.F. Heterosis and combining ability in chilli peppers by diallell analysis. **Crops Science**, v.15, p.323-325, 1975.

LOWER, R.L.; NIENHUIS, J.; MILLER, C.H. Gene action and heterosis for yield and vegetative characteristics in a cross between a gynoecious pickling cucumber inbred and a *Cucumis sativus* var. *hardwickii* line. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, p.75-78, 1982.

MAK, C. A study of hybrid vigour in chilli (*Capsicum annuum* L.). **Capsicum Newsletter**, Turin, v.6, p.47-48, 1987. /Resumo 7073 em **Plant Breeding Abstracts**, v.59, n.8, p.775, Aug. 1989/

MALUF, W.R. **Melhoramento genético do tomate *Lycopersicon esculentum* Mill.** Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1982. 15p.

MALUF, W.R.; MIRANDA, J.B.C.; CAMPOS, J.R. Análise genética de um cruzamento dialélico de tomate: I. Características referentes à produção de frutos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.633-644, 1982.

MALUF, W.R.; MIRANDA, J.E.C.; CORDEIRO, C.M.T. Correlações entre médios de híbricos F_1 e médias progenitores em tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1171-1176, 1982.

MALUF, W.R.; FERREIRA, P.E.; MIRANDA, J.E.C. Genetic divergence in tomatoes and its relationship with heterosis for yield in F_1 hybrids. **Revista Brasileira de Genética**, v.6, p.453-460, 1983.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CALDAS, L.S.; IKUTA, H.; KUNIEDA-YABASE, M. Early testing of parental combining ability in tropical cauliflower hybrids. **Revista Brasileira de Genetica**, v.11, p.893-903, 1988a.

MALUF, W.R.; CALDAS, L.S.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; IKUTA, H.; KUNIEDA-YABASE, M. Alternatives to current tropical cauliflower hybrids obtained from self-incompatible inbred lines. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.905-920, 1988b.

MALUF, W.R.; MIRANDA, J.E.C.; FERREIRA-ROSSI, P.E. Genetics analysis of components of fruit size and shape in diallel cross of tomato cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.819-831, 1989.

MALUF, W.R.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; CALDAS, L.S.; IKUTA, H. Genetic variation for combining ability in tropical cauliflower populations. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.331-345, 1989.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D.; TOMA-BRAGHINI, M. Genetic variation for combining ability in the short-day onion cultivar Pira-Ouro in topcrosses with Baia Petrolini. **Revista Brasileira de Genética**, v.13, p.803-814, 1990.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D. *Produção de sementes de couve-flor.* In: CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990a. p.77-93.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D. Produção de sementes de repolho. In: CASTELLANE, P.D.; NICOLOSI, W.M; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV; FUNEP, 1990b. p.177-192.

MARTIN, F. W. Genes for long shelf-live in tomato. **The Journal of the University of Puerto Rico**, v.71, p.313-321, 1987.

McLEOD, M.J.; GUTTMAN, S.I.; ESHBAUGH, W.G.; RAYLE, R.E. Electrophoretic study of valuation in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution**, v.37, p.562-574, 1983.

MELO, A.M.T. Análise genética de caracteres de fruto em híbridos de pimentão. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 112p. Tese, Doutorado.

MELO, P.C.T. de. Heterose e capacidade combinatória em um cruzamento dialélico parcial entre seis cultivares de tomate *(Lycopersicon esculentum* Mill). Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 108p. Tese, Doutorado.

MIRANDA, J.E.C. **Avaliação de seis cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e suas progênies hídridas F_1.** Viçosa: UFV, 1978. 42p.

MIRANDA, J.E.C. Análise genética de um cruzamento dialélico em pimentão *(Capsicum annuum* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 159p. Tese, Doutorado.

MIRANDA, J.E.C.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P. Análise de um cruzamento dialélico de cultivares de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.767-773, 1982.

MISHRA, R.S.; LOTHA, R.E.; MISHRA, S.N.; PAUL, P.K.; MISHRA, H.N. Results of heterosis breeding on chilli (*Capsicum annuum* L.). **Capsicum Newsletter**, Turim, v.7, p.49-50. /Resumo 10563 em **Plant Breeding Abstracts**, v.60, n.10, p.1288, Oct. 1990/

MUTSCHLER, M. A.; WOLFE, D. W.; COBRE, E. D.; YOURSTONE, K. S. Tomato fruit quality na shelf-live in hybrids heterozygous for the *alc* ripening mutant. **HortScience**, v.27, p.352-355, 1992.

NAGAI, H. Melhoramento do pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. **Horticultura Brasileira**, v.1, p.3-9, 1983.

NGUYEN, V. Q.; ASHCROFT, W. J.; JONES, K. H.; MC GLASSON, W. B. Evaluation of F_1 hybrids incorporanting the rin (ripenning inhibitor) gene to improve the storage life and fruit quality of fresh market tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Australian Journal of Experimental Agricuture**, v.31, p.407-413, 1991.

ODLAND, M.L.; NOLL, C.J. Hybrid vigor and combining ability in eggplants. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.51, p.417-422, 1948.

PAL, B.P.; RAMANUJAN, S. Plant breeding and genetics at the Imperial Agricultural Research Institute. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.4, p.43-53, 1944.

PAL, B.P.; SINGH, H.B. Studies in hybrid vigour: II. Notes on the brinjal and bitter gourd. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.6, p.19-33. 1946.

PARIS, H.S. Historical records, origins and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, v.43, p.423-443, 1989.

PARIS, H.S.; NERSON,H.; BURGER, Y. Precocious caserta summer squah breeding line. **HortScience**, v.20, p.786, 1985.

PATERNIANI, E. **Estudos recentes sobre heterose.** São Paulo: Fundação Cargill, 1974. 36p. (Boletim,1).

PEDROSA, J.F. Caracterização agronômica e qualitativa de plantas e frutos de introduções híbridas de *Cucurbita maxima* Duchesne e *Cucurbita moschata* Duchesne. Viçosa: UFV, 1981. 164p. Tese, Doutorado.

PEIXOTO, N. Melhoramento genético de abóbora (*Cucurbita moschata* Duchesne) do grupo Baianinha: I. Obtenção, seleção de linhagens e avaliação de híbridos F_1 braquíticos. Viçosa: UFV, 1987. 110p. Dissertação, Mestrado.

PEREIRA, G.V.N. Avaliação precoce da capacidade geral de combinação em população de repolho de verão *(Brassica oleracea* var. *capitata*). Lavras: ESAL, 1994. 63p. Dissertação, Mestrado.

PICKERSGILL, B. The domestication of chilli peppers. In: UCKO, P.J.; DIMBLEBY, G.W. (Ed.) **The domestication and exploitation of plants and animals.** London: Chapman & Hall, 1969. p.443-450.

PINTO, C.A.B.P. Híbridos simples e triplos de pepino (*Cucumis sativus* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1978. 57p. Dissertação, Mestrado.

POPOVA, D.; MIHAILOVA, L. Some heterosis manifestations in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Capsicum Newsletter**, v.3, p.29, 1984.

PORTER, D.R. Watermelon breeding. **Hilgardia**, v.7, p.585-624, 1933.

PUJARI, C.V.; KALE, P.N. Heterosis studies in tomato. **Journal of Mararashtra Agricultural Universities**, v.19, p.83-85, 1994.

RESENDE, J.M. Qualidade pós-colheita de dez genótipos de tomate do grupo multilocular. Lavras: UFLA, 1995. 88p. Dissertação, Mestrado.

RESENDE, L.V. Mecanismos de resistência a tospovirus e capacidade de combinação de linhagens de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do grupo Santa Cruz. Lavras: UFLA, 1996. Tese, Doutorado.

REZENDE, T.A. Efeito do ethephon (ácido 2-cloroetilfosfônico na expressão do sexo e produção de semente híbrida de moranga (*Cucurbita maxima* Duch.). Lavras: ESAL, 1992. 75p. Dissertação, Mestrado.

RICK, C.M.; BUTLER, L. Cytogenetics of the tomato. **Advances in Genetics**, v.8, p.267-382, 1956.

ROCCHETTA, G.; GIORGI, G.; GIOVANELLI, G. Correlation analysis between morphological traits and productivity in cultivated *Capsicum* for understanding of the heterosis phenomenon. **Genetica Agraria**, v.30, p.355-374, 1976.

RODRIGUES, B.M.; PINTO, J.E.B.P.; MALUF, W.R.; SOUZA, C.M. Micropropagação de cebola a partir de bulbinhos induzidos *in vitro*. **Bragantia**, v.55, p.19-28, 1996

SANTOS-JÚNIOR, A.M. Avaliação de híbridos experimentais de cebola (*Allium cepa* L.) *pelo método de mudas*. Lavras: ESAL, 1993. 53p. Dissertação, Mestrado.

SANTOS-JÚNIOR., A.M.; MALUF, W.R. Avaliação de híbridos experimentais de cebola (*Allium cepa* L.) no plantio de inverno pelo método de mudas. **Ciência e Prática**, v.18, p.138-143, 1994.

SCHRADER, O.L. Uma nova variedade de pimentão para o Brasil. **Revista Ceres**, v.8, p.90-95, 1953.

SCOTT, G.W. Inbreeding studies with *Cucumis melo*. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.29, p.485, 1933.

SHELLIE, K.C.; WOLF, D. Enhancing ripening characteristics of "netted" and "honeydew"-type muskmelons. **HortScience**, v.30, p.766, 1995.

SHIFRISS, C.; RYLSKI, I. Comparative performance of F_1 hybrids and open pollinated bell pepper varieties (*Capsicum annuum* L.) under suboptimal temperature regimes. **Euphytica**, v.22, p.530-534, 1973.

SHIFRISS, O. Developmental reversal of dominance in *C. pepo* L. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.50, p.330-346, 1947.

SHINOHARA, S. **Vegetable seed production technology of Japan, elucidated with respective variety development histories, particulars**. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1984. v.1, 432p.

SINGH, H. M.; SINGH, R. R.; MITAL, R. K. Genotypic and phenotypic variability in tomato. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.44, p.807-811, 1974.

SINGH, R.K.; SINGH, U. K. Heterose breeding in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Annals of Agricultural Research**, v.14, p.416-420, 1993.

SIROHI, P.S.; KUMAR, T.S.; CHOUDHURY, B. Diallel analysis for variabity in *Cucurbita moschata* (Duch.) Poir. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.56, p.171-173, 1986.

SMITH, O.S. Estimation of heritabilities and variance components for several traits in a random-mating population of pickling cucumbers. Raleigh: North Carolina State University, 1977. Thesis, Ph.D.

SOUSA, J.A; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A. Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de polinização aberta e híbridos F_1 de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.21, p.334-342, 1997.

SOUSA, J.A. Avaliação da heterose em híbridos de berinjela (*Solanum melongena* L.). Lavras: UFLA, 1993. 70p. Dissertação, Mestrado.

SOUSA, J.A. Estimação de parâmetros genéticos em um dialelo de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.). Lavras: UFLA, 1998. 91p. Tese, Doutorado.

SOUZA, C.M.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, B.M.; MALUF, W.R.; MORAIS, A.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Aplicação de diferentes citocininas para indução e multiplicação de brotações de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.22, p.384-389, 1998.

SOUZA, J.C. Produtividade e qualidade de frutos híbridos de tomateiro, heterozigotos no loco alcobaça. Lavras: UFLA, 1995. 87p. Dissertação, Mestrado.

SOUZA, R.J. DE; CASALI, V.W.D. Cultivares de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v.10, p.14-18, 1984.

STEVENS, M.A.; RUDICH, J. Genetic potential for overcoming plupiological limitations adaptability, yield and quality in the tomato. **HortScience**, v.13, p.673-679, 1978.

STUDENTSOVA, L.I. Some morphological and physiological features of red pepper hybrids. **Genetike i Selektsii**, v.50, p.30-33, 1973. /Resumo em **Plant Breeding Abstracts**, v.44, p.222, Apr. 1974/

SURESH, K.; BANERJEE, M.K.; PARTAP, P.S.; KUMAR, S. Heterosis study for fruit yield and its components in tomato. **Annals of Agricultural Research**, v.16, p.212-217, 1995.

TAVARES, M.; MALUF, W.R. Vigor de híbrido na geração F1 de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Prática**, v.18, p.171-177, 1994.

TAVARES, M. Heterose e estimativa de parâmetros genéticos em um cruzamento dialélico de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Lavras: UFLA, 1993. 89p. Dissertação, Mestrado.

THAKUR, P.C. Gene action. An index for heterosis breeding. **Capsicum Newsletter**, v.6, p.41-42, 1987.

TORRES, A.C.; VECCHIA, P.T.; CALDAS, L.S. Propagação vegetativa de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* subvar. *cauliflora* DC) in vitro visando ao melhoramento de cultivares de verão. **Revista Ceres**, v.25, p.602-609, 1978.

UZO, J.O . Hybrid vigours and gene action of two quantitative traits of flavour peppers in Nigeria. **Scientia Horticulturae**, v.22, p.321-326, 1984.

VALLEJO-CABRERA, F.A. *Estimativa de parâmetros genéticos de caracteres de fruto e planta de pimenta* (*Capsicum chinense* Jacq.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1986. 87p. Tese, Doutorado.

WANG, B.; NG, T.J. Ethylene production in ripening fruits of *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *inodorus*, and their hybrids. **Cucumber Genetics Cooperative Report**, v.21, p.31-32, 1998.

WHITAKER, T.W.; DAVIS, G.N. **Cucurbits**. London: Leonard Hill Books, 1962. 250p.

WHITAKER, T.W.; ROBINSON, R.W. Squash breeding. In: BASSET, M.J.(Ed.) **Breeding vegetable crops**. Westport: AVI, 1986. p.209-242.

XUE, B.Y. Breeding tomato green-stemmed (aw) lines and the utilization of heterosis. **China Vegetables**, v.50, p.32-33, 1994.

YORDANOV, M. Heterosis in the tomato. In: FRANKEL, R. (Ed.) **Heterosis**: reappraisal of theory and practice. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p.189-219.

14

MELHORAMENTO DE ESPÉCIES PERENES

MARCOS DEON VILELA DE RESENDE

Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111 - CEP: 83411-000 - Colombo, PR.

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais perenes, tais quais as essências florestais e as frutíferas arbóreas, apresentam vários aspectos biológicos peculiares, que tornam o melhoramento genético das mesmas bastante diferenciado do melhoramento de culturas anuais. Dentre os referidos aspectos citam-se: sobreposição de gerações, ciclo reprodutivo longo, reprodução sexuada e assexuada, expressão dos caracteres ao longo das várias idades. Em conseqüência destes fatores tem-se os seguintes reflexos no melhoramento destas espécies: utilização dos indivíduos selecionados, para produção durante vários anos, fato que demanda muito rigor e precisão nos métodos de seleção; uso de avaliações repetidas em cada indivíduo ao longo do tempo; seleção envolvendo comparações de indivíduos de diferentes gerações e portanto avaliados em diferentes condições ambientais, fato que requer o uso de métodos de avaliação genética mais elaborados; seleção também (além da seleção para os efeitos aditivos) para os efeitos não aditivos dos alelos tendo em vista a propagação vegetativa dos indivíduos selecionados; relevância da unidade de seleção "indivíduo" em detrimento da unidade de seleção "média de grupos de indivíduos", fato que demanda a predição dos valores genéticos (aditivos e não aditivos) individuais para fins de seleção; redução na taxa de sobrevivência das plantas nos experimentos ao longo das idades, fato que, associado à sobreposição de gerações, tende a gerar dados desbalanceados para uso na estimação de parâmetros genéticos e na predição dos valores genéticos individuais. Outro fator a considerar nestas espécies refere-se à possível alteração no controle genético dos caracteres ao longo das idades.

A maioria das espécies arbóreas é alógama (menos de 5% de autofecundação) ou apresenta sistema reprodutivo misto (em que predominam os cruzamentos mas ocorrem autofecundações em taxas inferiores a 50% e superiores a 5%), sendo raras as autógamas. Com base no exposto, a presente dissertação aborda o melhoramento de espécies vegetais perenes alógamas ou de sistema reprodutivo misto, enfatizando as espécies florestais, mas cujos desenvolvimentos podem ser estendidos para aplicações nas espécies frutíferas arbóreas ou outras espécies perenes, desde que as mesmas sejam diplóides ou alopoliplóides, pratiquem também a reprodução sexuada e sejam avaliadas ao nível de indivíduos. Para espécies perenes autógamas (tais como a *Leucaena leucocephala*, *Coffea arabica* e o pessegueiro) uma abordagem quantitativa envolvendo componentes de variância genética e métodos de seleção foi realizada por Resende & Medrado (1994).

2. ESTRUTURA GERAL DOS PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE ESPÉCIES PERENES

A partir do estabelecimento e avaliação de uma população experimental constituída por famílias obtidas sob determinado delineamento de cruzamento, a seleção é praticada visando atender aos objetivos: produção de propágulos melhorados

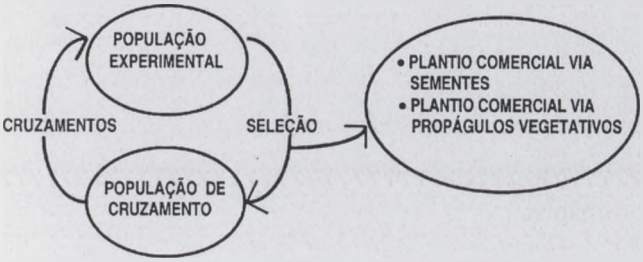


FIGURA 1. Esquema geral dos programas de melhoramento de espécies perenes.

para plantio comercial; formação da população de cruzamento para gerar as famílias a serem avaliadas no subseqüente ciclo seletivo.

Pode-se verificar, pelo esquema da Figura 1, que as duas ações principais em que o melhorista atua para melhorar o germoplasma são a seleção e a realização de cruzamentos para geração de uma nova população experimental. Assim, a eficiência dos diferentes programas de melhoramento de espécies perenes resulta dos diferentes procedimentos de seleção e delineamentos de cruzamento utilizados.

Os tópicos seguintes contemplam procedimentos que permitem ao melhorista de espécies arbóreas maximizar o progresso genético com seleção, enfatizando a predição de valores genéticos e a seleção bem como os delineamentos de cruzamento. Detalhes adicionais referentes às estratégias de melhoramento de espécies perenes são encontrados em Eldridge *et al.* (1993), Baudouin *et al.* (1997) e Resende (1999a).

3. VALORES GENÉTICOS, FENOTÍPICOS E COMPONENTES DE VARIÂNCIA

O valor fenotípico (y) de um caráter quantitativo em uma população panmítica é dado por:

$$y = \mu + a + d + e \qquad (1)$$

ignorando a epistasia, em que:

μ = média genotípica;

a = efeito genético aditivo;

d = efeito de dominância;

e = efeito ambiental;

$\mu + a$ = valor genético aditivo;

$\mu + a + d$ = valor genotípico;

$g = a + d$ = efeito genotípico.

Com base no modelo (1), a variabilidade fenotípica da população pode ser decomposta em:

$$\sigma_y^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2 \qquad (2)$$

em que:

σ_y^2 = variância fenotípica;

σ_a^2 = variância genética aditiva;

σ_d^2 = variância genética de dominância;

σ_e^2 = variância ambiental;

$\sigma_g^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2$ = variância genotípica.

Avaliando-se o caráter quantitativo mais de uma vez no indivíduo, o modelo (1) pode ser expandido para:

$$y = \mu + a + d + p + e_t \qquad (3)$$

em que:

$e = p + e_t$;

p = efeito de ambiente permanente;

e_t = efeito de ambiente temporário;

$\mu + a + d + p$ = valor fenotípico permanente.

Sob o modelo (3) tem-se $\sigma_e^2 = \sigma_p^2 + \sigma_{et}^2$, onde σ_p^2 e σ_{et}^2, referem-se à variância de ambiente permanente e de ambiente temporário, respectivamente.

Em associação com os modelos (1) e (3), definem-se os seguintes parâmetros:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_y^2} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_{et}^2}$$ = herdabilidade individual no sentido restrito;

$$h_a^2 = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2}{\sigma_y^2} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_{et}^2}$$ = herdabilidade individual no sentido amplo;

$$\rho = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2}{\sigma_y^2} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_{et}^2}$$ = repetibilidade individual.

Quando as famílias são implantadas em parcelas contendo vários indivíduos, o modelo (3) deve ser expandido para:

$$y = \mu + a + d + p + e_t + c \qquad (4)$$

em que c refere-se ao efeito permanente da parcela, com variância σ_c^2.

Com base no modelo (4) define-se o parâmetro:

$$c^2 = \frac{\sigma_c^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_{et}^2 + \sigma_c^2}$$ = correlação intraclasse entre os indivíduos da parcela, devida ao ambiente comum da parcela.

Ainda com base no modelo (4), a repetibilidade passa a ser definida como

$$\rho = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2 + \sigma_{et}^2}$$.

As quantidades de principal interesse para o melhorista são os valores genéticos aditivos, quando o objetivo for a propagação sexuada dos indivíduos selecionados ou os valores genotípicos quando o objetivo for a propagação assexuada. Como essas quantidades são variáveis aleatórias desconhecidas, as mesmas devem ser preditas a partir dos valores fenotípicos. De maneira genérica, o princípio da regressão linear é empregado para a predição dos efeitos aditivos (a) e genotípicos (g), ou seja, a técnica da regressão permite inferir em que proporção y explica a e g, conforme os preditores apresentados a seguir, os quais estão associados à seleção massal:

$$\hat{a} = \beta_{a,y}[y - E(y)] = \beta_{a,y}(y - \mu) = \frac{COV(a,y)}{Var(y)} (y - \mu) = h^2 (y - \mu)$$

$$\hat{g} = \beta_{g,y}[y - E(y)] = \beta_{g,y}(y - \mu) = \frac{COV(g,y)}{Var(y)} (y - \mu) = h_a^2 (y - \mu)$$, em que:

$\beta_{a,y}$ e $\beta_{g,y}$ = coeficientes de regressão dos efeitos aditivos e genotípicos sobre o valor fenotípico, respectivamente, os quais equivalem às herdabilidades individuais no sentido restrito e no sentido amplo, respectivamente.

Se medições repetidas são realizadas sobre cada indivíduo, os preditores de a e g a partir do valor fenotípico médio das várias medições ($\bar{y}$) são dados por:

$$\hat{a} = \beta_{a,\bar{y}}(\bar{y} - \mu) = \frac{COV(a,\bar{y})}{Var(\bar{y})} (\bar{y} - \mu) = \frac{mh^2}{1 + (m-1)\rho} (\bar{y} - \mu)$$

$$\hat{g} = \beta_{g,\bar{y}}(\bar{y} - \mu) = \frac{COV(g,\bar{y})}{Var(\bar{y})} (\bar{y} - \mu) = \frac{mh_a^2}{1 + (m-1)\rho} (\bar{y} - \mu)$$

Verifica-se a importância dos parâmetros h^2, h_a^2 e ρ para a predição dos valores genéticos e genotípicos. Também o parâmetro c^2 é relevante neste contexto, especialmente quando delineamentos experimentais com várias plantas por parcela são utilizados, conforme se verá nos tópicos seguintes.

4. ESTIMAÇÃO SIMULTÂNEA DA HERDABILIDADE E REPETIBILIDADE A PARTIR DE DADOS BALANCEADOS

Considerando a avaliação de f famílias em b blocos casualizados com n indivíduos por parcela e m medições por indivíduo, tem-se o esquema (assumindo que as interações famílias x medições e blocos x medições não são significativas) da análise de variância (método de quadrados mínimos) conforme apresentado na Tabela 1. Nesta tabela são apresentados os quadrados médios associados à avaliação (para o caráter produção de massa foliar) de 15 famílias de meios-irmãos de erva-mate, em 6 blocos casualizados, com 3 plantas por parcela e 3 medições por indivíduo, conforme Resende (1999b).

A obtenção dos quadrados médios (QM) pode ser realizada em três etapas: a) análise de variância ao nível de médias de parcela (Vencovsky & Barriga, 1992) para obtenção dos QM's referentes as três primeiras fontes de variação; b) obtenção do QM Indivíduo (I)/Parcela trabalhando-se ao nível de médias (através das medições) de indivíduo; c) análise de variância de dados individuais em classificação cruzada ignorando a estrutura experimental (Cruz & Regazzi, 1994) e a fonte de variação indivíduo (esta deve ser computada e depois ignorada), para obtenção dos dois últimos QM's da Tabela 1.

Com base na Tabela 1, as seguintes estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos podem ser obtidas:

$\hat{\sigma}^2_{et} = Q_6 = 3{,}73997$ = variância ambiental temporária;

$\hat{\sigma}^2_w = (3/4)\ \hat{\sigma}^2_a + \hat{\sigma}^2_d + \hat{\sigma}^2_p = Q_4 - Q_6 / m = 5{,}30437$ = variância permanente dentro de parcelas;

$\hat{\sigma}^2_c = Q_3 - Q_4 / n = 0{,}91753$ = variância permanente entre parcelas ou variância do ambiente comum da parcela;

TABELA 1. Quadrados médios (QM) e esperanças (E) associados à análise de variância ao nível de médias de parcela envolvendo medidas repetidas em espécies perenes.

Fontes de variação	GL	QM	E(QM)
Bloco	(b-1) = 5	Q_1 = 31,47208	—
Família	(f-1) = 14	Q_2 = 4,62181	$\frac{\sigma^2_{et}}{nm} + \frac{\sigma^2_w}{n} + \sigma^2_c + b\sigma^2_f$
Resíduo	(b-1)(f-1)=70	Q_3 = 3,10120	$\frac{\sigma^2_{et}}{nm} + \frac{\sigma^2_w}{n} + \sigma^2_c$
Indivíduo (I)/Parcela	(n-1) fb = 180	Q_4 = 19,65308	$\frac{\sigma^2_{et}}{m} + \sigma^2_w$
Medição (M)	(m-1) = 2	Q_5 = 338,26439	—
I x M	(m-1)(nfb-1) = 538	Q_6 = 3,73997	σ^2_{et}
Total	mnfb-1 = 809		

TABELA 2. Multiplicadores de h^2 em função da taxa de autofecundação e grau de dominância.

Taxa de autofecundação (%)	Multiplicador* em ausência de dominância	Multiplicador* em presença de dominância completa
0	1,00 (0,25)	1,00 (0,25)
5	0,91 (0,28)	0,93 (0,27)
10	0,83 (0,30)	0,89 (0,28)
15	0,76 (0,33)	0,83 (0,30)
20	0,69 (0,36)	0,81 (0,31)
25	0,64 (0,39)	0,78 (0,32)
30	0,59 (0,42)	0,74 (0,34)
35	0,55 (0,46)	0,71 (0,35)
40	0,51 (0,49)	0,68 (0,37)

*Fator de correlação para a herdabilidade, considerando que a estimativa não corrigida foi obtida usando $4\sigma_f^2$ no numerador da h^2. Valores entre parênteses referem-se à correlação genética média entre os indivíduos da família.

$\hat{\sigma}_f^2 = (1/4)\ \hat{\sigma}_a^2 = (Q_2 - Q_3)/b = 0{,}25349$ = variância genética entre famílias de meios-irmãos;

$$\hat{h}^2 = \frac{4\hat{\sigma}_f^2}{\hat{\sigma}_f^2 + \hat{\sigma}_w^2 + \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_{et}^2} = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_p^2 + \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_{et}^2} = 0{,}0992$$ = herdabilidade no sentido restrito;

$$\hat{\rho} = \frac{\hat{\sigma}_f^2 + \hat{\sigma}_w^2 + \hat{\sigma}_c^2}{\hat{\sigma}_f^2 + \hat{\sigma}_w^2 + \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_{et}^2} = \frac{\hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_p^2 + \hat{\sigma}_c^2}{\hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_p^2 + \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_{et}^2} = 0{,}6339$$ = repetibilidade;

$$\hat{c}^2 = \frac{\hat{\sigma}_c^2}{\hat{\sigma}_f^2 + \hat{\sigma}_w^2 + \hat{\sigma}_c^2 + \hat{\sigma}_{et}^2} = 0{,}0896$$ = correlação intraclasse devido ao ambiente comum da parcela.

A herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) pode ser estimada a partir de teste clonal segundo o mesmo delineamento e procedimentos de análises similares aos descritos para a estimação de h^2.

Para espécies de sistema reprodutivo misto, as estimativas de h^2 podem ser corrigidas levando-se em consideração a taxa de autofecundação praticada pela população em questão, conforme Resende *et al.* (1995a). Na Tabela 2 são apresentados os fatores (multiplicadores) de conversão das h^2 obtidas a partir da avaliação de progênies de polinização aberta.

5. MÉTODOS DE SELEÇÃO

Os procedimentos ótimos de predição de valores genéticos e seleção no melhoramento de espécies perenes podem ser resumidos em dois: índice usando todos os efeitos aleatórios do modelo estatístico (índice multiefeitos) para o caso balanceado; BLUP (melhor predição linear não viciada) individual para o caso desbalanceado.

O método do índice multiefeitos pode ser utilizado eficientemente na seleção envolvendo experimentos com alta taxa de sobrevivência. Nos demais casos o procedimento BLUP individual tende a ser mais acurado.

6. SELEÇÃO A PARTIR DE DADOS BALANCEADOS: ÍNDICE MULTIEFEITOS

6.1 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E UMA MEDIÇÃO POR INDIVÍDUO

Neste caso, o índice multiefeitos para a predição dos efeitos aditivos (para a seleção visando o plantio por sementes) dos indivíduos do experimento é dado por (Resende & Higa, 1994):

$$I_1 = \hat{a} = b_1(y_{ijk} - \bar{y}_{ij.}) + b_2(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}) + b_3(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...}) \text{ , em que:}$$

$$b_1 = \frac{(1-\rho_g)\ h^2}{1-\rho_g\ h^2 - \mu_g\ (h_a^2 - h^2) - c^2} = \frac{0{,}75\ h^2}{1-0{,}25\ h^2 - c^2} \text{ , para famílias de meios-irmãos.}$$

$$b_2 = \frac{[1+(nb-1)\ \rho_g]\ h^2}{1+(n-1)\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} = \frac{[1+(nb-1)\ 0{,}25]\ h^2}{1+(n-1)(0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ n\ 0{,}25\ h^2} \text{ ,}$$

para famílias de meios-irmãos.

$$b_3 = \frac{(1-\rho_g)\ h^2}{1+(n-1)\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] - n\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} = \frac{0{,}75\ h^2}{1+(n-1)(0{,}25\ h^2 + c^2) - n\ 0{,}25\ h^2} \text{ ,}$$

para famílias de meios-irmãos.

y_{ijk} , $\bar{y}_{ij.}$, $\bar{y}_{i..}$, $\bar{y}_{.j.}$ e $\bar{y}_{...}$ = valor do indivíduo, média da parcela, média da família, média do bloco e média geral, respectivamente.

ρ_g = correlação genética aditiva intraclasse entre os indivíduos da progênie (ρ_g = 0,25 para meios-irmãos e ρ_g = 0,5 para irmãos germanos).

μ_g = correlação genética de dominância intraclasse entre os indivíduos da progênie (μ_g = 0 para meios-irmãos e μ_g = 0,25 para irmãos germanos).

n e b = número de plantas por parcela e de blocos, respectivamente.

O termo b_1 equivale à herdabilidade no sentido restrito para a seleção de indivíduos dentro de parcela, ao passo que o termo b_2 equivale à herdabilidade no sentido restrito para a seleção entre famílias, corrigida para o tamanho finito da amostra (Resende, 1991).

O índice multiefeitos para a predição de efeitos genotípicos (para a seleção visando o plantio via propagação vegetativa) é dado por:

$I_2 = \hat{g} = (b_1 + b_4)(y_{ijk} - \bar{y}_{ij.}) + (b_2 + b_5)(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}) + (b_3 + b_6)(\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...})$, em que:

$$b_4 = \frac{(1-\mu_g)\ (h_a^2 - h^2)}{1-\rho_g\ h^2 - \mu_g\ (h_a^2 - h^2) - c^2} = \frac{h_a^2 - h^2}{1 - 0{,}25\ h^2 - c^2}$$, para famílias de meios-irmãos;

$$b_5 = \frac{[1 + (nb-1)\ \mu_g]\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} = \frac{h_a^2 - h^2}{1 + (n-1)(0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ n\ 0{,}25\ h^2}$$,

para famílias de meios-irmãos;

$$b_6 = \frac{(1-\mu_g)\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] - n\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} = \frac{h_a^2 - h^2}{1 + (n-1)(0{,}25\ h^2 + c^2) - n\ 0{,}25\ h^2}$$,

para famílias de meios-irmãos.

A seleção de matrizes com base no comportamento de suas progênies de meios-irmãos deve ser baseada em efeitos genéticos aditivos preditos por:

$I_3 = \hat{a} = b_7\ (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})$, em que:

$$b_7 = \frac{(1/2)\ nb\ h^2}{1 + (n-1)\ (0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ n\ 0{,}25\ h^2}$$

Como exemplo considere os dados da Tabela 3.

Considerando os parâmetros h^2=0,1635, h_a^2 =0,2453 e c^2=0,0779, têm-se na Tabela 4 as predições para os efeitos aditivos e genotípicos associados aos indivíduos da Tabela 3.

Os resultados apresentados na Tabela 4 são facilmente obtidos trabalhando-se com os parâmetros h^2, h_a^2 e c^2 apresentados anteriormente, com os dados da Tabela 3 e com as fórmulas associadas a I_1, I_2 e I_3.

TABELA 3. Dados referentes à avaliação do caráter diâmetro de *Eucalyptus grandis*, no delineamento de blocos ao acaso. Famílias de meios-irmãos.

Indivíduo	Bloco	Família (Matriz)	Árvore	Diâmetro (cm)
4	1	1	1	9,87
5	1	1	2	14,48
6	1	2	1	8,91
7	1	2	2	14,64
8	1	3	1	9,55
9	1	3	2	7,96
10	2	1	1	16,07
11	2	1	2	14,01
12	2	2	1	7,96
13	2	2	2	21,17
14	2	3	1	10,19
15	2	3	2	9,23

TABELA 4. Coeficientes de ponderação (b_i) das diferentes informações fenotípicas e efeitos aditivos e genotípicos preditos para os indivíduos apresentados na Tabela 3.

b_i	Indivíduos	Efeitos aditivos preditos pelo índice I_1	Efeitos genotípicos preditos pelo índice I_2	Efeitos aditivos preditos pelo índice I_3
$b_1 = 0,1392$	1	-	-	0,4370
$b_2 = 0,2384$	2	-	-	0,3178
$b_3 = 0,1183$	3	-	-	-0,7548
$b_1 + b_4 = 0,2320$	4	0,0224	-0,1083	-
$b_2 + b_5 = 0,3065$	5	0,6641	0,9611	-
$b_3 + b_6 = 0,1971$	6	-0,1554	-0,3649	-
$b_7 = 0,2724$	7	0,6422	0,9643	-
	8	-0,4760	-0,5417	-
	9	-0,6973	-0,9106	-
	10	0,5649	0,7958	-
	11	0,2782	0,3179	-
	12	-0,6065	-1,1168	-
	13	1,2321	1,9475	-
	14	-0,6675	-0,8609	-
	15	-0,8011	-1,0836	-

Verifica-se que a ordem dos melhores indivíduos pode mudar quando o objetivo for a propagação sexuada ou assexuada. No presente caso, o indivíduo nº. 13 é o melhor tanto para a propagação sexuada quanto assexuada, mas o segundo melhor indivíduo para propagação sexuada é o nº. 5 e o segundo melhor para a propagação assexuada é o nº. 7.

6.2 AVALIAÇÃO DE CLONES EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E UMA MEDIÇÃO POR INDIVÍDUO

Neste caso, a predição dos efeitos genotípicos dos clones deve ser realizada pelo índice:

$I_4 = \hat{g} = b_8 (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})$, em que:

$b_8 = \dfrac{nb\ h_a^2}{1+(n-1)\ (h_a^2 + c^2)+(b-1)\ n\ h_a^2}$ = herdabilidade no sentido amplo ao nível de médias de clones.

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 3, porém tomando as famílias como clones e os indivíduos dentro de famílias como seus rametes, estimou-se $b_8 = 0,5410$ ($h_a^2 = 0,2453$ e $c^2 = 0,0779$ e os efeitos genotípicos dos clones foram preditos (por I_4) como 0,8678; 0,6311 e –1,4989 para os clones 1, 2 e 3, respectivamente.

6.3 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E VÁRIAS MEDIÇÕES POR INDIVÍDUO

A realização de medidas repetidas de um caráter no indivíduo ao longo do tempo é comum no melhoramento de espécies como a erva-mate (Resende *et al.*, 1995b), a seringueira (Gonçalves *et al.*, 1990), o coqueiro (Siqueira, 1982), o cacaueiro (Dias & Souza, 1993), o cupuaçuzeiro (Fonseca *et al.*, 1990; Costa *et al.*, 1997), o guaranazeiro (Valois *et al.*, 1979) e também em espécies florestais, em associação com medidas incrementais de crescimento (Resende, 1999b).

Nesta situação, o índice multiefeitos depende adicionalmente do parâmetro repetibilidade (ρ) e para a predição dos efeitos aditivos (visando a propagação sexuada) é dado por:

$$I_5 = \hat{a} = b_9 (\bar{y}_{ijk.} - \bar{y}_{ij..}) + b_{10} (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{....}) + b_{11} (\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i...} - \bar{y}_{.j..} + \bar{y}_{....}) \text{, em que:}$$

$$b_9 = \frac{(1-\rho_g)\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho - m\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2]} = \frac{0{,}75\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho - m\ (0{,}25\ h^2 + c^2)},$$

para famílias de meios-irmãos.

$$b_{10} = \frac{[1+(nb-1)\ \rho_g]\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m[\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ nm\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} =$$

$$= \frac{[1+(nb-1)\ 0{,}25]\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ nm\ 0{,}25\ h^2}, \text{ para famílias de meios-irmãos.}$$

$$b_{11} = \frac{[1-\rho_g]\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho\ +(n-1)\ m\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] - nm\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} =$$

$$= \frac{0{,}75\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (0{,}25\ h^2 + c^2) - nm\ 0{,}25\ h^2}, \text{ para famílias de meios-irmãos.}$$

m= número de medições (avaliações) por indivíduo.

$\bar{y}_{ijk.}$, $\bar{y}_{ij..}$, $\bar{y}_{i...}$, $\bar{y}_{.j..}$ e $\bar{y}_{....}$ = médias do indivíduo, da parcela, da família, do bloco e geral, respectivamente.

Verifica-se pelas fórmulas de b_9, b_{10} e b_{11}, que a realização de várias medições (m) por indivíduo contribui para minimizar (desde que a repetibilidade não seja 1)

as variâncias fenotípicas ao nível de médias e, conseqüentemente, para maximizar a eficiência seletiva.

O índice multiefeitos para a predição dos efeitos genotípicos (visando a propagação assexuada) é dado por:

$$I_6 = \hat{g} = (b_9 + b_{12})\ (\bar{y}_{ijk.} - \bar{y}_{ij.}) + (b_{10} + b_{13})\ (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{....}) + (b_{11} + b_{14})\ )(\bar{y}_{ij..} - \bar{y}_{i...} - \bar{y}_{.j..} + \bar{y}_{...}),$$

em que:

$$b_{12} = \frac{(1-\mu_g)\ m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho - m\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2]} = \frac{m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho - m\ (0{,}25\ h^2 + c^2)},$$

para famílias de meios-irmãos.

$$b_{13} = \frac{[1+(nb-1)\ \mu_g]\ m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m[\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ nm\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} =$$

$$= \frac{m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ nm\ 0{,}25\ h^2},$$ para famílias de meios-irmãos.

$$b_{14} = \frac{(1-\mu_g]\ m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho\ +(n-1)\ m\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2) + c^2] - nm\ [\rho_g\ h^2 + \mu_g\ (h_a^2 - h^2)]} =$$

$$= \frac{m\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (0{,}25\ h^2 + c^2) - nm\ 0{,}25\ h^2},$$ para famílias de meios-irmãos.

A seleção de matrizes com base no comportamento de suas progênies de meios-irmãos deve ser baseada nos valores genéticos preditos por:

$$I_7 = \hat{a} = b_{15}\ (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{...})$$

$$b_{15} = \frac{(1/2)\ nb\ m\ h^2}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (0{,}25\ h^2 + c^2) + (b-1)\ nm\ 0{,}25\ h^2}$$

Como exemplo, considere os dados da Tabela 5.

Considerando os parâmetros $h^2 = 0{,}1457$; $h_a^2 = 0{,}2185$, $\rho = 0{,}4166$ e $c^2 = 0{,}1166$, têm-se na Tabela 6 as predições dos efeitos aditivos e genotípicos associados aos indivíduos da Tabela 5.

TABELA 5. Dados referentes à avaliação do caráter diâmetro em *Eucalyptus grandis*, no delineamento de blocos ao acaso, com m = 2 medições por indivíduo. Famílias de meios-irmãos.

Observações	Indivíduos	Bloco	Família	Árvore (Matriz)	Medição	Diâmetro (cm)
1	3	1	1	1	1	9,87
2	3	1	1	1	2	10,00
3	4	1	1	2	1	14,48
4	4	1	1	2	2	15,00
5	5	1	2	1	1	8,91
6	5	1	2	1	2	9,00
7	6	1	2	2	1	15,00
8	6	1	2	2	2	14,64
9	7	2	1	1	1	9,55
10	7	2	1	1	2	10,00
11	8	2	1	2	1	8,00
12	8	2	1	2	2	7,96
13	9	2	2	1	1	15,00
14	9	2	2	1	2	16,07
15	10	2	2	2	1	14,01
16	10	2	2	2	2	14,50

TABELA 6. Coeficientes de ponderação (b_i) das diferentes informações fenotípicas e efeitos aditivos e genotípicos preditos para os indivíduos apresentados na Tabela 5.

b_i	Indivíduos	Efeitos aditivos preditos pelo índice I_5	Efeitos genotípicos preditos pelo índice I_6	Efeitos aditivos preditos pelo índice I_7
b_9 = 0,1967	1	-	-	-0,4341
b_{10} = 0,2729	2	-	-	0,4341
b_{11} = 0,1386	3	-0,6285	-0,9027	-
b_{12} = 0,3279	4	0,3169	0,6728	-
b_{13} = 0,3509	5	-0,4211	-0,8466	-
b_{14} = 0,2309	6	0,7327	1,0765	-
b_{15} = 0,3119	7	-0,4273	-0,5675	-
	8	-0,7805	-1,1561	-
	9	0,7298	1,0716	-
	10	0,4780	0,6519	-

6.4 AVALIAÇÃO DE CLONES EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E VÁRIAS MEDIÇÕES POR INDIVÍDUO

Neste caso, a predição dos efeitos genotípicos dos clones deve ser realizada pelo índice:

$I_8 = \hat{g} = b_{16} (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{....})$, em que:

$$b_{16} = \frac{nbm\ h_a^2}{1+(m-1)\ \rho+(n-1)\ m\ (h_a^2+c^2)+(b-1)\ nm\ h_a^2}$$ = herdabilidade no sentido amplo ao nível de médias de clones.

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 5, porém tomando as famílias como clones e os indivíduos dentro de famílias como seus rametes, estimou-se b_{16}=0,5904 (h_a^2 =0,2185; ρ=0,4166 e c^2=0,1166 e os efeitos genotípicos (I_8) foram preditos como -0,8217 e 0,8217 para os clones 1 e 2, respectivamente.

6.5 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS GERMANOS E DE MEIOS-IRMÃOS OBTIDAS SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS, NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO

Nesta situação definem-se as seguintes quantidades fenotípicas:

$\bar{Y}_{...}$ = média geral.

$f_i = (\bar{Y}_{i...} - \bar{Y}_{...})$ = efeito da capacidade geral de combinação do genitor i.

$m_j = (\bar{Y}_{.j.} - \bar{Y}_{...})$ = efeito da capacidade geral de combinação do genitor j.

$fm_{ij} = (\bar{Y}_{ij.} - \bar{Y}_{i...} - \bar{Y}_{.j.} + \bar{Y}_{...})$ = efeito da capacidade específica de combinação entre os genitores i e j.

$e_{ijk} = (\bar{Y}_{ijk.} - \bar{Y}_{ij.} - \bar{Y}_{..k} + \bar{Y}_{...})$= efeito da parcela.

$d_{ijkl} = (Y_{ijkl} - \bar{Y}_{ijk.})$= efeito de indivíduo dentro de parcela.

$\bar{y}_{i...}$ e $\bar{y}_{.j..}$ = médias das famílias de meios-irmãos dos genitores i e j, respectivamente.

$\bar{y}_{ij..}$ = médias da família de irmãos germanos oriunda do cruzamento entre os genitores i e j.

$\bar{y}_{..k.}$ = média do bloco k.

$\bar{y}_{ijk.}$ = média da parcela ijk.

y_{ijkl} = valor individual.

Nesta situação, o índice multiefeitos para predição de efeitos aditivos dos indivíduos do experimento é dado por:

$$I_9 = \hat{a} = b_{17}\, f_i + b_{18}\, m_j + b_{19}\, fm_{ij} + b_{20}\, e_{ijk} + b_{21}\, d_{ijkl}$$, em que:

$$b_{17} = \frac{\left(\frac{nbm+2}{4}\right) h^2}{1+(n-1)\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)+c^2]+(b-1)\,n\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)]+(m-2)\,nb\,0{,}25\,h^2}$$

$$b_{18} = \frac{\left(\frac{nbf+2}{4}\right) h^2}{1+(n-1)\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)+c^2]+(b-1)\,n\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)]+(f-2)\,nb\,0{,}25\,h^2}$$

$$b_{19} = \frac{0{,}25\,h^2}{1+(n-1)\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)+c^2]+(b-1)\,n\,[0{,}5\,h^2+0{,}25\,(h_a^2-h^2)]-2nb\,0{,}25\,h^2}$$

$$b_{20} = \frac{0{,}5\,h^2}{1+(n-1)\,c^2-0{,}5\,h^2-0{,}25\,(h_a^2-h^2)}$$

$$b_{21} = \frac{0{,}5\ h^2}{1 - 0{,}5\ h^2 - 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) - c^2}$$, em que:

n, b, m e f = número de plantas por parcela, de blocos, de genitores masculinos e de genitores femininos, respectivamente.

Os efeitos aditivos dos genitores femininos podem ser preditos empregando-se o índice:

$I_{10} = \hat{a} = b_{22}\ (\bar{y}_{i\_\_} - \bar{y}_{\_\_})$, em que:

$$b_{22} = \frac{\left(\frac{nbm}{2}\right) h^2}{1 + (n-1)\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)] + (m-2)\ nb\ 0{,}25\ h^2}$$

Os efeitos aditivos dos genitores masculinos podem ser preditos empregando-se a mesma expressão para I_{10}, porém substituindo m por f e $\bar{y}_{i\_\_}$ por $\bar{y}_{\_j\_}$.

Para a predição dos efeitos genotípicos dos indivíduos, o seguinte índice deve ser empregado:

$I_{11} = \hat{g} = (b_{17} + b_{23})\ f_i + (b_{18} + b_{24})\ m_j + (b_{19} + b_{25})\ fm_{ij} + (b_{20} + b_{26})\ e_{ijk} + (b_{21} + b_{27})\ d_{ijkl}$,

em que:

$$b_{23} = \frac{\frac{nb+3}{4}\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)] + (m-2)\ nb\ 0{,}25\ h^2}$$

$$b_{24} = \frac{\frac{nb+3}{4}\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)] + (f-2)\ nb\ 0{,}25\ h^2}$$

$$b_{25} = \frac{[1 + (nb-1)(1/4)]\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) + c^2] + (b-1)\ n\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)] - 2nb\ 0{,}25\ h^2}$$

$$b_{26} = \frac{0{,}75\ (h_a^2 - h^2)}{1 + (n-1)\ c^2 - 0{,}5\ h^2 - 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)}$$

$$b_{27} = \frac{0{,}75\ (h_a^2 - h^2)}{1 - 0{,}5\ h^2 - 0{,}25\ (h_a^2 - h^2) - c^2}$$

Como exemplo, considere os dados apresentados na Tabela 7.

Considerando os parâmetros $h^2 = 0{,}25$; $h_a^2 = 0{,}30$ e $c^2 = 0{,}08$, têm-se na Tabela 8, os resultados da predição dos efeitos aditivos e genotípicos associados aos indivíduos da Tabela 7.

O procedimento de predição de valores genéticos pela técnica do índice multiefeitos é também relevante nas seguintes situações: seleção envolvendo vários experimentos, seleção envolvendo o delineamento em látice, seleção envolvendo várias populações e seleção envolvendo variáveis com distribuição binomial. Preditores para

estas situações foram apresentados detalhadamente por Resende (1999b). Predições de valores genéticos podem ser computadas através dos *softwares* Selegen (Resende *et al.*, 1994a) e DFREML (Meyer, 1998).

TABELA 7. Dados referentes à avaliação do caráter diâmetro em *Eucalyptus grandis*, no delineamento de blocos ao acaso. Famílias obtidas sob cruzamentos fatoriais.

Indivíduos	Bloco	Macho (M)	Fêmea (F)	Família	Árvore	Parcela	Diâmetro (cm)
1	1	1	3	1-3	1	1	9,87
2	1	1	3	1-3	2	1	14,48
3	1	1	4	1-4	1	2	8,91
4	1	1	4	1-4	2	2	14,64
5	1	2	3	2-3	1	3	9,55
6	1	2	3	2-3	2	3	7,96
7	1	2	4	2-4	1	4	16,07
8	1	2	4	2-4	2	4	14,01
9	2	1	3	1-3	1	5	7,96
10	2	1	3	1-3	2	5	21,17
11	2	1	4	1-4	1	6	10,19
12	2	1	4	1-4	2	6	9,23
13	2	2	3	2-3	1	7	15,00
14	2	2	3	2-3	2	7	16,07
15	2	2	4	2-4	1	8	14,01
16	2	2	4	2-4	2	8	14,50

TABELA 8. Coeficientes de ponderação (b_i) das diferentes informações fenotípicas e efeitos aditivos e genotípicos preditos para os indivíduos apresentados na Tabela 7.

b_i	Indivíduos	Efeitos aditivos preditos pelo índice I_9	Efeitos genotípicos preditos pelo índice I_{11}
b_{17} = 0,41876	1	-0,5279	-0,5788
b_{18} = 0,41876	2	0,2085	0,3785
b_{19} = 0,12594	3	-0,6711	-0,8901
b_{20} = 0,13263	4	0,2442	0,2998
b_{21} = 0,15974	5	-0,0857	-0,2230
b_{22} = 0,67000	6	-0,3397	-0,5532
b_{23} = 0,47739	7	0,7504	0,9973
b_{24}= 0,47739	8	0,4213	0,5695
b_{25} = 0,21410	9	-1,1074	-1,3322
b_{26} = 0,17242	10	1,0029	1,4111
b_{27}= 0,20766	11	-0,6202	-0,8239
	12	-0,7736	-1,0233
	13	0,3915	0,3974
	14	0,5624	0,6196
	15	0,2330	0,3248
	16	0,3113	0,4265
	M1*	-0,4489	-0,4489
	M2*	0,4489	0,4489
	F3**	0,0229	0,0209
	F4**	-0,0209	-0,0209

* genitores masculinos; ** genitores femininos. Predições pelo índice I_{10}.

7. SELEÇÃO A PARTIR DE DADOS DESBALANCEADOS: BLUP INDIVIDUAL

O procedimento BLUP (melhor predição linear não viciada) ou metodologia de modelos mistos foi desenvolvido por melhoristas de animais (Henderson, 1973) e tem sido bastante aplicado no melhoramento florestal (White & Hodge, 1989; Resende *et al.*, 1993; Resende *et al.*, 1996a; Bueno Filho, 1997), mas apresenta, aparentemente, apenas 3 relatos de utilização no melhoramento de espécies arbóreas frutíferas (Soh, 1994; Durel *et al.*, 1998; Resende & Dias, 2000). O BLUP é, atualmente, o procedimento padrão para a seleção em presença de dados desbalanceados (alta mortalidade, diferentes gerações, diferentes idades, vários experimentos, diferentes delineamentos, dentre outros fatores de desbalanceamento).

7.1 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS DE MEIOS-IRMÃOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E UMA MEDIÇÃO POR INDIVÍDUO

Nesta situação, o modelo linear misto adequado para a descrição dos dados equivale a:

$y = Xf + Za + Wc + e$, em que:

y , f, a, c e e – vetores de dados, de efeitos fixos (médias de blocos), de efeitos aditivos (aleatório), de efeitos de parcelas (efeitos aleatórios de ambiente comum das parcelas) e de erros aleatórios, respectivamente.

X, Z e W – são matrizes de incidência conhecidas, formadas por valores 0 e 1, as quais associam as incógnitas f, a e c ao vetor de dados y, respectivamente.

A metodologia de modelos mistos permite estimar f pelo procedimento de quadrados mínimos generalizados e predizer a e c pelo procedimento BLUP. Para obtenção destas soluções basta resolver o seguinte sistema de equações lineares, o qual é denominado equações de modelo misto (MME):

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\lambda_1 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + I\lambda_2 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$$\lambda_1 = \frac{1 - h^2 - c^2}{h^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1 - h^2 - c^2}{c^2}$$

A e I = matrizes de parentesco genético aditivo e matriz identidade de ordem apropriada aos dados, respectivamente.

Empregando-se os dados apresentados na Tabela 3, têm-se as matrizes de incidência:

$$X_{(12x2)} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 0 & 1 \\ 0 & 1 \\ 0 & 1 \\ 0 & 1 \\ 0 & 1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad Z_{(12x15)} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad W_{(12x6)} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

A matriz I no caso é de ordem 6 e a matriz A com a inclusão das 3 matrizes equivale a:

$$A = \begin{bmatrix} 1.0000 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5000 & 0.5000 \\ 0.5000 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.5000 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 \\ 0 & 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 \\ 0.5000 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.5000 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1.0000 & 0.2500 \\ 0 & 0 & 0.5000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 0.2500 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.2500 & 1.0000 \end{bmatrix}$$

Considerando os parâmetros empregados no item 6.1, isto é, $h^2 = 0{,}1635$, e $c^2 = 0{,}0779$, tem-se $\lambda_1 = 4{,}639$ e $\lambda_2 = 9{,}738$. Resolvendo as MME, obtém-se o vetor de soluções:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 10{,}9017 \\ 13{,}1050 \\ 0{,}4370 \\ 0{,}3178 \\ -0{,}7548 \\ 0{,}0224 \\ 0{,}6641 \\ -0{,}1554 \\ 0{,}6422 \\ -0{,}4760 \\ -0{,}6973 \\ 0{,}5649 \\ 0{,}2782 \\ -0{,}6065 \\ 1{,}2321 \\ -0{,}6675 \\ -0{,}8011 \\ 0{,}1585 \\ 0{,}1073 \\ -0{,}2658 \\ 0{,}2579 \\ 0{,}1955 \\ -0{,}4534 \end{bmatrix}$$

No vetor de soluções, os dois primeiros valores referem-se às estimativas BLUE (melhor estimação linear não viciada) das médias dos blocos 1 e 2, respectivamente, os três valores seguintes referem-se aos efeitos genéticos aditivos preditos para as 3 matrizes, os 12 valores seguintes referem-se aos efeitos genéticos aditivos preditos das progênies (descendentes) e os 6 últimos valores referem-se aos efeitos preditos para as parcelas.

Dessa forma, a metodologia de modelos mistos fornece simultaneamente as estimativas BLUE dos efeitos fixos e as predições BLUP dos efeitos aleatórios. Verifica-se que as soluções apresentadas para os efeitos aditivos são equivalentes às apresentadas na Tabela 4, para o método do índice multiefeitos. De fato, quando os dados são balanceados os métodos BLUP e índice multiefeitos são idênticos, ou seja, nesta situação o método do índice multiefeitos é BLUP.

7.2 AVALIAÇÃO DE CLONES NÃO APARENTADOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E UMA MEDIÇÃO POR INDIVÍDUO

Neste caso, o modelo linear misto adequado à descrição dos dados equivale a:

$y = Xf + Zg + Wc + e$, em que:

y, f, g, c e e – vetores de dados, de efeitos fixos (médias de blocos), de efeitos genotípicos (aleatórios), de efeitos de parcelas (aleatórios) e de erros aleatórios, respectivamente.

X, Z e W – são matrizes de incidência para f, g e c, respectivamente.

As equações de modelo misto para a estimação dos efeitos fixos e predição dos efeitos aleatórios equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{g} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + I\,\lambda_1 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + I\lambda_2 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$$\lambda_1 = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{h_a^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{c^2}$$

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 3 (conforme especificado no tópico 6.2) e os parâmetros $h_a^2 = 0{,}2453$ e $c^2 = 0{,}0779$, obtêm-se os efeitos genotípicos preditos equivalentes a 0,8678; 0,6311 e –1,4989, para os clones 1, 2 e 3, respectivamente.

7.3 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E VÁRIAS MEDIÇÕES POR INDIVÍDUO

Nesta situação, o modelo linear misto adequado à descrição dos dados equivale a:

$y = Xf + Za + Zd + Wc + Tp + e$, em que:

y, f, a, d, c, p e e – vetores de dados, de efeitos fixos (médias de blocos), de efeitos aditivos (aleatórios), de efeitos de dominância (aleatórios), de efeitos de parcelas (aleatórios), de efeitos de ambiente permanente (aleatórios) e de erros aleatórios (ambiente temporário), respectivamente.

X, Z, W e T – matrizes de incidência para f, a(d), c e p, respectivamente.

As equações de modelo misto equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \\ \hat{c} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'Z & X'W & X'T \\ Z'X & Z'Z+A^{-1}\lambda_1 & Z'Z & Z'W & Z'T \\ Z'X & Z'Z & Z'Z+D^{-1}\lambda_2 & Z'W & Z'T \\ W'X & W'Z & W'Z & W'W+I\lambda_3 & W'T \\ T'X & T'Z & T'Z & T'W & T'T+I\lambda_4 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ Z'y \\ W'y \\ T'y \end{bmatrix}$$, em que:

$$\lambda_1 = \frac{1-\rho}{h^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1-\rho}{h_a^2 - h^2} \; ; \; \lambda_3 = \frac{1-\rho}{c^2} \; ; \; \lambda_4 = \frac{1-\rho}{p^2}$$

A e D = matrizes de parentesco aditivo e de dominância, respectivamente.

$$\rho = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2} \; ; \; p^2 = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2}$$

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 5 e os parâmetros $h^2 = 0{,}1457$; $h_a^2 = 0{,}2185$; $\rho = 0{,}4166$ e $c^2 = 0{,}1166$, obtêm-se predições para os efeitos aditivos (â) e efeitos genotípicos ($\hat{g} = \hat{a} + \hat{d}$) idênticas às apresentadas na Tabela 6.

7.4 AVALIAÇÃO DE CLONES NÃO APARENTADOS EM EXPERIMENTOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA E VÁRIAS MEDIÇÕES POR INDIVÍDUO

Neste caso, o modelo linear misto adequado à descrição dos dados equivale a:

$y = Xf + Zg + Wc + Tp + e.$

As equações de modelo misto equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{g} \\ \hat{c} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W & X'T \\ Z'X & Z'Z+I\lambda_1 & Z'W & Z'T \\ W'X & W'Z & W'W+I\lambda_2 & W'T \\ T'X & T'Z & T'W & T'T+I\lambda_3 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \\ T'y \end{bmatrix}$$, em que:

$$\lambda_1 = \frac{1-\rho}{h_a^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1-\rho}{c^2} \; ; \; \lambda_3 = \frac{1-\rho}{p^2} \; .$$

$$\rho = \frac{\sigma_g^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2}{\sigma_g^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2} \; ; \; p^2 = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_g^2 + \sigma_p^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2} \; .$$

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 5 (conforme especificado no tópico 6.4) e os parâmetros $h_a^2 = 0{,}2185$; $r = 0{,}4166$ e $c^2 = 0{,}1166$, obtém-se os efeitos genotípicos preditos ($\hat{g}$) equivalentes a –0,8217 e 0,8217 para os clones 1 e 2, respectivamente.

7.5 AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS GERMANOS E DE MEIOS-IRMÃOS OBTIDAS SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS NO DELINEAMENTO DE BLOCOS AO ACASO COM VÁRIAS PLANTAS POR PARCELA

Nesta situação, o modelo linear misto adequado aos dados equivale a:

$$y = Xf + Za + Zd + Wc + e$$

As equações de modelo misto equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\lambda_1 & Z'Z & Z'W \\ Z'X & Z'Z & Z'Z + D^{-1}\lambda_2 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'Z & W'W + I\lambda_3 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$$\lambda_1 = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{h^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{h_a^2 - h^2} \; ; \; \lambda_3 = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{c^2}$$

Usando o mesmo conjunto de dados apresentados na Tabela 7 e os parâmetros $h^2 = 0{,}25$; $h_a^2 = 0{,}30$ $c^2 = 0{,}08$, obtém-se as predições para os efeitos aditivos (â) e efeitos genotípicos ($\hat{g} = \hat{a} + \hat{d}$) idênticas às apresentadas na Tabela 8.

O procedimento BLUP individual associado a vários experimentos (com interação genótipo x ambiente), ao delineamento em látice, à seleção envolvendo várias populações e à seleção envolvendo vários caracteres simultaneamente foi apresentado em detalhes por Resende (1999b).

8. PRECISÃO NA SELEÇÃO E INTERVALOS DE CONFIANÇA DE VALORES GENÉTICOS

De maneira geral, os valores genéticos preditos (â) não são iguais aos valores genéticos verdadeiros (a) dos indivíduos. A proximidade entre estes dois valores pode ser avaliada com base na estatística denominada acurácia (Van Vleck *et al.*, 1987), a qual refere-se à correlação entre os valores genéticos preditos e os valores genéticos verdadeiros dos indivíduos e é simbolizada por $r_{\hat{a}a}$. Em geral, quanto maior a acurácia na avaliação de um indivíduo, maior é a confiança na avaliação e no valor genético predito deste indivíduo.

A distância (â – a) entre os valores genéticos preditos e os verdadeiros é função da quantidade $(1 - r_{\hat{a}a})$ e a estatística denominada variância do erro de predição

(PEV) dada por PEV = Var (â – a) = $(1 - r^2_{\hat{a}a})\ \sigma^2_a$ fornece uma medida da precisão na avaliação dos indivíduos. A predição pela metodologia do modelo individual – BLUP é "Best" no sentido de minimizar a Var (â – a) ou seja, maximiza a precisão. A grande utilidade da PEV, entretanto, refere-se à possibilidade de se calcular o desvio-padrão (erro) e o intervalo de confiança dos valores genéticos preditos e, conseqüentemente, obter-se uma medida de risco na utilização de determinados indivíduos. Por exemplo, um valor genético predito de â = 20 m de altura em uma espécie florestal, associado a uma acurácia de $r_{\hat{a}a} = 0,80$ e uma variância aditiva $\sigma^2_a = 5\ m^2$, permite a obtenção do seguinte intervalo de confiança (IC) para o valor genético predito: $IC = â \pm t\ [(1 - r^2_{\hat{a}a})\ \sigma^2_a]^{1/2} = 20 \pm 1,96\ [(1-0,8^2)\ 5]^{1/2} = 20 \pm 2,63 = 17,37 \vdash\dashv 22,63$. O valor de t utilizado (1,96) corresponde ao valor da distribuição t de Student associado a 95% de confiança e grande número de graus de liberdade. Assim, para o presente exemplo, pode-se dizer, com 95% de confiança, que o verdadeiro valor genético do indivíduo está entre 17,37 m e 22,63 m.

Genericamente, a acurácia pode ser obtida pela expressão $r_{\hat{a}ai} = [1 - PEV_i / \sigma^2_a]^{1/2}$, em que PEV_i é dado por $diag(C^{22})\ \sigma^2_e$, sendo C^{22} conforme especificado na expressão (7), item 12.

Os sumários de avaliação genética de indivíduos de espécies perenes em geral apresentam os valores genéticos preditos e a acurácia na avaliação de cada indivíduo. É importante ressaltar que os valores genéticos preditos dos diferentes indivíduos podem ser comparados diretamente entre si, independentemente da acurácia. As diferentes quantidades e qualidades das informações dos indivíduos já foram consideradas no cálculo dos valores genéticos preditos (e também da acurácia). A acurácia simplesmente informa sobre o risco no uso de cada indivíduo e não tem a propriedade de informar se o indivíduo é bom ou não. Esta informação pode ser obtida exclusivamente com base em â. Um indivíduo com alto â e acurácia mais baixa do que a dos demais, foi mais penalizado na avaliação genética do que os demais, ou seja, a média de sua progênie foi mais descontada (forçada ou regredida em direção à média geral) do que as médias das progênies de outros indivíduos. Assim, tal indivíduo, embora apresente um intervalo de confiança mais amplo de seu valor genético predito, com menor limite inferior do intervalo de confiança, apresenta também maior limite superior do intervalo de confiança de seu valor genético predito, e com alguma probabilidade razoável, pode, de fato, ser melhor que os demais.

Em conclusão, a acurácia pode ser utilizada como um indicativo da intensidade de utilização dos indivíduos para a reprodução, sendo que os indivíduos com altos valores genéticos preditos mas com acurácia baixa, devem ser utilizados com ressalvas.

A Tabela 9 apresenta um exemplo de um sumário de avaliação genotípica de clones. Os resultados (parciais) referem-se a clones de *Eucalyptus urophylla* avaliados na Venezuela.

Verifica-se pela Tabela 9 que o número de rametes sobreviventes por clone foi suficiente para propiciar altos valores da acurácia seletiva. Adicionalmente, os intervalos de confiança para os valores genotípicos permitem concluir, com 95% de confiança, que os clones 1 e 2 apresentam produtividades estatisticamente iguais. Neste caso, embora o clone 1 tenha apresentado maior valor genotípico predito, a menor PEV e maior acurácia associados a predição do valor genotípico do clone 2 conduziram a intervalos de confiança praticamente idênticos para os dois clones.

TABELA 9. Sumário de avaliação genética de alguns clones de *Eucalyptus urophylla* na Venezuela. Caráter circunferência à altura do peito, avaliado em centímetros.

Número do clone	Número de rametes	Média	Efeito genotípico	Valor genotípico	Herdabilidade da média	Acurácia	PEV	Intervalo de confiança (95%) do valor genotípico
1	26	38,88	6,27	38,48	0,90	0,95	1,02	36,5 - 40.5
2	41	38,32	5,89	38,05	0,94	0,97	0,61	36,5 - 39,6
3	23	35,04	2,50	34,71	0,89	0,95	1,12	32,6 - 36,8
4	24	34,46	2,33	34,54	0,90	0,95	1,02	32,6 - 36,5
5	26	34,04	1,90	34,11	0,90	0,95	1,02	32,1 - 36,1
6	33	33,97	1,89	34,10	0,92	0,96	0,81	32,3 - 35,9
7	22	33,27	0,96	33,17	0,89	0,94	1,12	31,1 - 35,3
8	30	32,57	0,42	32,63	0,91	0,96	0,92	30,8 - 34,5
9	27	32,07	-0,14	32,07	0,91	0,95	0,92	30,2 - 34.0
10	37	31,97	-0,19	32,02	0,93	0,97	0,72	30,4 - 33,7

Média geral = 32,21 cm; h^2_a ao nível de indivíduo = 0,27; σ^2_a = 10,20 cm².

9. ESTIMAÇÃO DE GANHOS GENÉTICOS E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE SELEÇÃO

O ganho genético com seleção equivale à média dos valores genéticos preditos dos N indivíduos selecionados, sendo dado por:

$$Gs = \Sigma_{\hat{a}i} / N$$
$$= \Sigma [h^2 (y_i - \mu] / N$$
$$= h^2 \Sigma (y_i - \mu) / N$$
$$= h^2 (\bar{y}_s - \mu)$$
$$= h^2 d_s$$

$G_s = h^2 d_s$ é a expressão clássica para o cômputo do ganho genético, onde d_s refere-se ao diferencial de seleção e $\bar{y}_s$ equivale à média fenotípica dos indivíduos selecionados.

O ganho genético é um indicador de eficiência na seleção e pode ser computado alternativamente por:

$$Gs = h^2 d_s$$
$$= K h^2 \sigma_y$$
$$= K \sigma^2_a / \sigma_y$$
$$= K h \sigma_a$$
$$= K r_{\hat{a}a} \sigma_a$$

Verifica-se nesta última expressão que h (raiz quadrada da herdabilidade) refere-se a acurácia (r_{aa}) seletiva da seleção massal. Assim, de maneira genérica, tem-se que a expressão para o ganho genético é dada por $Gs = K\, r_{aa}\, \sigma_a$. Esta expressão do ganho é mais adequada para efeito de comparação (predição) de métodos de seleção, pois K e σ_a podem ser considerados constantes através dos métodos de seleção e, portanto, a comparação pode basear-se apenas na acurácia associada aos diferentes métodos. Esta expressão permite inferir também que o sucesso na seleção depende, essencialmente, da utilização de acurados procedimentos de predição de valores genéticos.

Estimadores da acurácia associada a diferentes métodos de seleção foram apresentados por Resende *et al.* (1995c). De maneira genérica têm-se os seguintes estimadores:

a) Acurácia e ganho associados à predição e seleção pelos efeitos aditivos

$$\hat{r}_{\hat{a}a} = \frac{\hat{\sigma}_I}{\hat{\sigma}_a} = \frac{[\sum b_i^2\, V(i)]^{1/2}}{\hat{\sigma}_a} \; ; \; G_s = K\, \hat{r}_{\hat{a}a}\, \hat{\sigma}_a$$

b) Acurácia e ganhos associados à predição e seleção pelos efeitos genotípicos

$$\hat{r}_{\hat{g}g} = \frac{\hat{\sigma}_I}{\hat{\sigma}_g} = \frac{[\sum b_i^2\, \hat{V}(i)]^{1/2}}{\hat{\sigma}_g} \; ; \; G_s = K\, \hat{r}_{\hat{g}g}\, \hat{\sigma}_g \text{ , em que:}$$

$\hat{\sigma}_I$ = estimativa do desvio-padrão do índice de predição dos valores genéticos.

b_i e V(i) = estimativas dos coeficientes de ponderação e variância do efeito i, incluído no índice de predição de valores genéticos.

A seguir são comparados alguns métodos de seleção e sistemas de propagação associados ao melhoramento de espécies perenes. Os estimadores da acurácia (considerando experimentos com uma planta por parcela, em que N = nb = b refere-se ao número de indivíduos por família ou número de blocos) e ganhos genéticos, obtidos com base em Resende *et al.* (1995b) e Resende *et al.* (1996b), são dados por:

9.1 PROPAGAÇÃO SEXUADA DOS INDIVÍDUOS SELECIONADOS

9.1.1 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS, SEM O USO DA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA

Acurácia	Ganho Genético
$r_{\hat{a}a_1} = \left[\frac{m\, h^2}{1+(m-1)\,\rho}\right]^{1/2}$	$G_{s_1} = K\, r_{\hat{a}a_1}\, \sigma_a$

9.1.2 SELEÇÃO DE GENITORES BASEADA NO COMPORTAMENTO DA PROGÊNIE DE MEIOS-IRMÃOS

Acurácia	Ganho Genético
$r_{\hat{a}a_2} = 0{,}5 \left[\frac{m\, N\, h^2}{1+(m-1)\,\rho+(N-1)\, m\, 0{,}25\, h^2}\right]^{1/2}$	$G_{s_2} = K\, r_{\hat{a}a_2}\, \sigma_a$

9.1.3 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA DE MEIOS-IRMÃOS

Acurácia

$$r_{\hat{a}a_3} = \left[\frac{0{,}5625\ m\ \frac{N-1}{N}\ h^2}{1+(m-1)\ \rho - m\ 0{,}25\ h^2} + \frac{m\ [1+(N-1)\ 0{,}25]^2\ h^2}{N\ [1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ 0{,}25\ h^2]} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_3} = K\ r_{\hat{a}a_3}\ \sigma_a$$

9.1.4 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA DE IRMÃOS GERMANOS

Acurácia

$$r_{\hat{a}a_4} = \left[\frac{0{,}25\ m\ \frac{N-1}{N}\ h^2}{1+(m-1)\ \rho - m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)]} + \frac{m\ [1+(N-1)\ 0{,}5]^2\ h^2}{N\ [1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)]]} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_4} = K\ r_{\hat{a}a_4}\ \sigma_a$$

9.1.5 SELEÇÃO DE GENITORES BASEADA NO COMPORTAMENTO EM TESTE CLONAL

Acurácia

$$r_{\hat{a}a_5} = \left[\frac{m\ N\ h^2}{1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ h_a^2} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_5} = K\ r_{\hat{a}a_5}\ \sigma_a$$

9.1.6 SELEÇÃO DE CRUZAMENTOS BIPARENTAIS, BASEADA NO COMPORTAMENTO DE PROGÊNIE DE IRMÃOS GERMANOS E VISANDO O PLANTIO (VIA SEMENTES) COMERCIAL DESTAS (RECONSTITUÍDAS A CADA GERAÇÃO)

Neste caso, a acurácia deve ser calculada em separado para os efeitos aditivos ($r_{\hat{a}a6}$) e de dominância ($r_{\hat{d}d6}$) e posteriormente obtém-se a acurácia para os efeitos genotípicos ($r_{\hat{g}g6}$), procedendo-se da seguinte maneira:

Acurácia

$$r_{\hat{a}a_6} = \left[\frac{m\ N\ 0{,}25\ h^2}{1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)]} \right]^{1/2};$$

$$r_{\hat{d}d_6} = \left[\frac{m\ N\ 0{,}0625\ (h_a^2 - h^2)}{1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)]} \right]^{1/2};$$

$$r_{\hat{g}g_6} = \left[r_{\hat{a}a6}^2 + r_{\hat{d}d6}^2 \right]^{1/2};$$

Ganho Genético

$$G_s = K\ r_{\hat{g}g_6}\ \sigma_g$$
$$= K\ r_{\hat{g}g_6}\ h_a / h\ \sigma_a$$

Alternativamente, o ganho genético é dado por:

$$G_s = K\, r_{\hat{a}a}\, \sigma_a + K\, r_{\hat{d}d}\, \sigma_d$$

$$= K \left[r_{\hat{a}a} + r_{\hat{d}d} \left[\frac{h_a^2 - h^2}{h^2} \right]^{1/2} \right] \sigma_a$$

9.1.7 SELEÇÃO DE GENITORES BASEADA NO EFEITO DA CAPACIDADE GERAL DE COMBINAÇÃO SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS

As expressões para a acurácia e ganho genético foram apresentadas por Resende (1999b).

9.1.8 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NAS INFORMAÇÕES DAS FAMÍLIAS DE IRMÃOS GERMANOS E DE MEIOS-IRMÃOS OBTIDAS SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS

As expressões para a acurácia e ganho genético foram apresentadas por Resende (1999b).

9.1.9 IDEM (1.6), PORÉM COM SELEÇÃO BASEADA EM (1/2) A_i + (1/2) A_j + D_{ij}, ONDE A_i E D_{ij} REFEREM-SE À CAPACIDADE GERAL E ESPECÍFICA DE COMBINAÇÃO, RESPECTIVAMENTE, OBTIDAS SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS.

As expressões para a acurácia e ganho genético foram apresentadas por Resende (1999b).

9.2 PROPAGAÇÃO ASSEXUADA DOS INDIVÍDUOS SELECIONADOS

9.2.1 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS, SEM O USO DA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA OU DE TESTES CLONAIS

Acurácia

$$r_{\hat{g}g_7} = \left[\frac{m\, h_a^2}{1 + (m-1)\, \rho} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_7} = K\, r_{\hat{g}g_7}\, \sigma_g$$

$$= K\, r_{\hat{g}g_7}\, h_a / h\, \sigma_a$$

9.2.2 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS BASEADA NO COMPORTAMENTO EM TESTE CLONAL

Acurácia

$$r_{\hat{g}g_8} = \left[\frac{m\, N\, h_a^2}{1 + (m-1)\, \rho + (N-1)\, m\, h_a^2} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_8} = K\, r_{\hat{g}g_8}\, \sigma_g$$

$$= K\, r_{\hat{g}g_8}\, h_a / h\, \sigma_a$$

9.2.3 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA DE MEIOS-IRMÃOS

Acurácia

$$r_{\hat{g}g_9} = \left[\frac{m \frac{N-1}{N} [0{,}5625\ h^2 + (h_a^2 - h^2)]}{1+(m-1)\ \rho - m\ 0{,}25\ h^2} + \frac{m\ [[1+(N-1)\ 0{,}25]^2\ h^2 + (h_a^2 - h^2)]}{N\ [1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ 0{,}25\ h^2]} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_9} = K\ r_{\hat{g}g_9}\ \sigma_g$$

$$= K\ r_{\hat{g}g_9}\ h_a / h\ \sigma_a$$

9.2.4 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NA INFORMAÇÃO DA FAMÍLIA DE IRMÃOS GERMANOS

Acurácia

$$r_{\hat{g}g_{10}} = \left[\frac{m \frac{N-1}{N} [0{,}25\ h^2 + 0{,}5625\ (h_a^2 - h^2)]}{1+(m-1)\ \rho - m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)]} + \frac{m \left[[1+(N-1)\ 0{,}5]^2\ h^2 + [1+(N-1)\ 0{,}25]^2 (h_a^2 - h^2) \right]}{N \left[[1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ [0{,}5\ h^2 + 0{,}25\ (h_a^2 - h^2)] \right]} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_{10}} = K\ r_{\hat{g}g_{10}}\ \sigma_g$$

$$= K\ r_{\hat{g}g_{10}}\ h_a / h\ \sigma_a$$

9.2.5 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS (CLONES) BASEADA NO COMPORTAMENTO DA PROGÊNIE DE MEIOS-IRMÃOS

Acurácia

$$r_{\hat{g}g_{11}} = 0{,}5 \left[\frac{m\ N\ h^2}{1+(m-1)\ \rho + (N-1)\ m\ 0{,}25\ h^2} \right]^{1/2}$$

Ganho Genético

$$G_{s_{11}} = K\ r_{\hat{g}g_{11}}\ \sigma_a$$

9.2.6 SELEÇÃO BASEADA EM VALORES INDIVIDUAIS E NAS INFORMAÇÕES DAS FAMÍLIAS DE IRMÃOS GERMANOS E DE MEIOS-IRMÃOS OBTIDAS SOB CRUZAMENTOS FATORIAIS OU DIALÉLICOS

As expressões para a acurácia e ganho genético foram apresentadas por Resende (1999b).

9.3 MANUTENÇÃO DOS INDIVÍDUOS SELECIONADOS NO MESMO MICROAMBIENTE

9.3.1 SELEÇÃO PELO VALOR FENOTÍPICO PERMANENTE

Acurácia

$$r_{\hat{P}P_{12}} = \left[\frac{m\,\rho}{1+(m-1)\,\rho}\right]^{1/2}$$

Ganho com Seleção

$$G_{s_{12}} = K\, r_{\hat{P}P_{12}}\, \sigma_{FP}$$

$$= K\, r_{\hat{P}P_{12}}\, (\rho/h^2)^{1/2}\, \sigma_a$$

Nas expressões apresentadas, m refere-se ao número de medições por indivíduo, N = nb refere-se ao número total de indivíduos por progênie, $r_{\hat{P}P}$ refere-se à acurácia na predição dos efeitos fenotípicos permanentes e σ_{FP} à variância destes efeitos.

Verifica-se pelas expressões (em 9.1.2 e 9.2.5) apresentadas que, tendo-se selecionado pelo teste de progênies, o plantio dos indivíduos selecionados, via sementes (seleção em ambos os sexos) ou propágulos clonais conduz ao mesmo ganho genético. Por outro lado, tendo-se selecionado pelo teste clonal (expressões em 9.1.5 e 9.2.2), o plantio por via vegetativa é h_a^2 / h^2 vezes mais eficiente que o plantio via sementes, ou seja, só é mais eficiente se houver dominância.

Considerando ainda estas duas formas de teste (clonal e de progênies) e os dois sistemas de propagação (sexuada e assexuada), Resende *et al.* (1998) concluíram para um caráter com $h^2 = 0{,}20$:

a) quando o objetivo é realizar o plantio via sementes:
- com N < 30, o teste clonal é sempre melhor que o teste de progênies;
- com N = 30 e em presença de dominância completa, as duas formas de teste se equivalem;
- em ausência de dominância o teste clonal é sempre melhor que o teste de progênies;
- com dominância completa e N = 100 o teste de progênies é 14% superior.

b) quando o objetivo é realizar o plantio clonal:
- a seleção pelo teste clonal é sempre mais vantajosa que pelo teste de progênies;
- a seleção pelo teste clonal é tanto mais vantajosa quanto menor N e quanto maior a dominância.

Verifica-se que os diferentes sistemas de teste e propagação apresentados exploram diferentes quantidades da variabilidade fenotípica populacional. Os sistemas de propagação 9.1, 9.2 e 9.3 exploram, em geral, a variância aditiva (σ_a^2), genotípica (σ_g^2) e fenotípica permanente (σ_{FP}^2), respectivamente. Entretanto, algumas exceções existem: a seleção pelo teste de progênies e propagação por via vegetativa (sistema 9.2.5) explora apenas a variação aditiva, não se tendo, na seleção, controle sobre os efeitos não aditivos; a seleção de cruzamentos biparentais (9.1.6 e 9.1.9) explora também uma fração da variação de dominância. Assim, nem sempre a propagação vegetativa explora os efeitos não aditivos e também as vezes a propagação por sementes permite explorar os efeitos não aditivos.

Todas as expressões de ganho apresentadas foram expressas em termos de σ_a de forma que a eficiência dos 16 métodos de seleção–propagação podem ser comparadas apenas conhecendo-se os parâmetros h^2, h^2_a e ρ, visto que σ_a pode ser ignorado por ser constante através dos vários métodos.

Considerando um caráter com os parâmetros $h^2 = 0,20$; $h^2_a = 0,30$ e $\rho = 0,65$ (valores estes que referem-se às médias destes parâmetros para as espécies perenes) e a avaliação de uma população de tamanho (6.000 plantas) fixo, tem-se na Tabela 10 as eficiências dos diferentes métodos. Para os testes de progênies considerou-se N = 60 plantas (número este que permite atingir 95% da acurácia máxima possível na seleção para os efeitos aditivos) e a avaliação de 100 famílias. Para os testes clonais, considerou-se N = 20 rametes (número que permite atingir uma acurácia de 95% na seleção de clones) por clone e a avaliação de 300 clones. Adicionalmente considerou-se m = 1 e a seleção dos 10 melhores indivíduos em cada método, exceto no método 3.1 em que foi considerada a seleção de 50% da população e no método 9.1.6 em que considerou-se a seleção de 5 cruzamentos biparentais (10 indivíduos). Nos cruzamentos fatoriais considerou-se a avaliação de 50 parentais em arranjos 4 x 4.

Pela Tabela 10 verifica-se que os sistemas que permitem maior acurácia* são: seleção e manutenção dos indivíduos selecionados no mesmo microambiente (9.3.1); seleção de clones em testes clonais (9.2.2); seleção de indivíduos (para clonagem) em testes de famílias obtidas sob cruzamentos fatoriais (9.2.6); seleção de cruzamentos biparentais a partir de cruzamentos fatoriais (9.1.9). Em termos de eficiência de ganho genético os melhores sistemas são: seleção de indivíduos (para clonagem) em testes de famílias obtidas sob cruzamentos fatoriais (9.2.6); seleção de indivíduos

TABELA 10. Comparação de métodos visando o melhoramento de um caráter ($h^2 = 0,20$; $h^2_a = 0,30$) quantitativo em espécie perene.

	Método	Acurácia	Acurácia*	Diferencial K	Eficiência**	Ganho Genético***	Eficiência****
Propagação sexuada	9.1.1	0,45	0,45	3,23	1,00	1,45	1,00
	9.1.2	0,87	0,87	1,76	1,93	1,53	1,06
	9.1.3	0,57	0,57	3,23	1,27	1,84	1,27
	9.1.4	0,65	0,65	3,23	1,44	2,10	1,45
	9.1.5	0,77	0,77	1,76	1,71	1,36	0,94
	9.1.6	0,61	0,75	2,06	1,67	1,55	1,07
	9.1.7	0,91	0,91	1,40	2,02	1,27	0,88
	9.1.8	0,68	0,68	3,23	1,51	2,20	1,52
	9.1.9	0,76	0,93	2,06	2,07	1,92	1,32
Propagação assexuada	9.2.1	0,55	0,67	3,23	1,49	2,16	1,49
	9.2.2	0,95	1,16	2,23	2,58	2,59	1,79
	9.2.3	0,65	0,80	3,23	1,78	2,58	1,78
	9.2.4	0,73	0,89	3,23	1,98	2,87	1,98
	9.2.5	0,87	0,87	1,76	1,93	1,53	1,06
	9.2.6	0,80	0,98	3,23	2,18	3,17	2,19
	9.3.1	0,81	1,46	0,80	3,24	1,17	0,81

* Acurácia expressa em termos do desvio-padrão genético aditivo de forma que todos os métodos podem ser comparados com base na mesma; ** Eficiência (razão entre acurácias*) dos métodos expressa em relação à seleção massal para plantio via sementes; *** Ganho genético em unidades de desvio-padrão genético aditivo, considerando as diferentes intensidades de seleção associadas aos vários métodos; **** Eficiência (razão entre ganhos genéticos) em relação à seleção massal para plantios via sementes, considerando as diferentes intensidades de seleção.

(para clonagem) em testes de famílias de irmãos germanos (9.2.4); seleção de clones a partir de testes clonais ou seleção de indivíduos (para clonagem) em testes de famílias de meios-irmãos (métodos 9.2.2 ou 9.2.3). Para a seleção visando a propagação sexuada, o melhor método também é aquele associado ao delineamento fatorial (9.1.8).

Os resultados revelam que a melhor maneira de se explorar os efeitos de dominância e/ou da capacidade específica de combinação é a clonagem de indivíduos selecionados em testes de famílias de irmãos germanos (sistemas 9.2.6 e 9.2.4). Deve-se ressaltar também a grande eficiência do delineamento fatorial para o melhoramento de espécies perenes, tanto para o plantio via sexuada quanto assexuada. Os resultados obtidos podem também serem extrapolados para progênies interpopulacionais ou interespecíficas, bastando para isto considerar as variâncias e parâmetros ao nível interpopulacional.

É importante relatar também o efeito da intensidade de seleção na eficiência relativa dos sistemas. Considerando a população experimental com tamanho fixo (6.000 plantas), verifica-se que a seleção dos 10 melhores indivíduos pelo sistema (9.2.6) conduz a um ganho genético 22% (2,19/1,79) superior à seleção dos 10 melhores clones em um teste de 300 clones (sistema 9.2.2).

O sistema (9.3.1) embora sendo o mais acurado implica na seleção no próprio campo do produtor, fato que limita a intensidade de seleção. Tal sistema seria especialmente indicado para plantios heterogêneos sob sistemas agroflorestais (Resende *et al.*, 1996b) ou para culturas como o cacau, onde o ciclo produtivo é longo e o cacauicultor não pode aguardar até que o novo plantio comece a produzir (Dias, 1998). Neste caso, a produtividade do plantio pode ser elevada, simplesmente através da substituição das piores plantas por outras com maior grau de melhoramento, sendo que a eliminação das plantas deve ser baseada na produção média de várias safras.

10. REPETIBILIDADE E NÚMERO DE MEDIÇÕES PARA OTIMIZAÇÃO DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

A eficiência da utilização de mais de uma safra na seleção é dada pela razão entre as acurácias pela seleção baseada em várias safras e a acurácia pela seleção baseada em uma só safra. Para a seleção individual ou massal (sistemas 9.1.1, 9.2.1 e 9.3.1) a eficiência é dada por $[m/[1+(m-1)\ r]]^{1/2}$. A eficiência em termos de ganho genético por unidade de tempo (por ano) é dada pela razão entre as acurácias com m e 1 medições multiplicada pela razão entre o intervalo de gerações (L) com 1 e com m medições. Para a erva-mate, por exemplo, o intervalo entre gerações é dado por L = I + S + M + (m-1), onde I é a idade à primeira poda de produção ou colheita, S é o período (em anos) após a poda, necessário para produção de sementes, M é o período após a produção de sementes, necessário para a produção de mudas e m é o número de safras praticado. De maneira geral, I = 3 (Belingheri & Kricum, 1997), S = 2 e M = 2. Assim, atualmente, L = 7 para uma medição, sendo denotado por L1. Para m maior ou igual a 2, L = L1 + m - 1 e o ganho (em unidades de desvio-padrão genético aditivo) anual é dado por $r_{a\bar{a}m}/(L1 + m - 1)$. Verifica-se assim, que esforços no sentido de minimizar I, S e M contribuirão muito para o aumento na taxa de

melhoramento genético das populações de erva-mate, talvez até mais do que a própria maximização da acurácia seletiva.

Na Tabela 11 são apresentados os valores de eficiência seletiva por ciclo de seleção (EC) e anual (EA) para a seleção massal, considerando vários valores de repetibilidade e número de medições. A eficiência anual é dada por $[m / [1 + (m - 1)\rho]]^{1/2} [L1/(L1 + m - 1)]$, $m \geq 2$. Alternativamente, $EA = EC [L1/(L1 + m - 1)]$, $m \geq 2$.

A interpretação da Tabela 11 deve considerar os diferentes objetivos da seleção: a) para o melhoramento a curto prazo (maximização do ganho na geração atual) deve-se analisar a EC, que no caso tanto é válido para a propagação sexuada ou

TABELA 11. Valores de eficiência seletiva por ciclo de seleção (EC) e anual (EA) para a seleção massal baseada em médias de diferentes números (m) de safras, considerando diferentes valores de repetibilidade (ρ).

ρ	m	EC	EA*
0,90	1	1,00	1,00
	2	1,03	0,90
	3	1,04	0,80
0,85	2	1,04	0,91
	3	1,05	0,82
0,80	2	1,05	0,92
	3	1,07	0,83
0,75	2	1,07	0,93
	3	1,10	0,85
	4	1,11	0,77
0,70	2	1,08	0,95
	3	1,12	0,87
	4	1,14	0,79
0,65	2	1,10	0,96
	3	1,14	0,89
	4	1,16	0,81
0,60	2	1,12	0,98
	3	1,17	0,91
	4	1,20	0,84
0,55	2	1,14	0,99
	3	1,20	0,93
	4	1,23	0,86
0,50	2	1,15	1,00
	3	1,22	0,95
	4	1,26	0,89
0,45	2	1,17	1,03
	3	1,26	0,98
	4	1,30	0,91
0,40	2	1,20	1,05
	3	1,29	1,00
	4	1,35	0,94
0,35	2	1,22	1,06
	3	1,33	1,03
	4	1,40	0,98
0,30	2	1,24	1,08
	3	1,37	1,06
	4	1,45	1,02

* Para o cômputo de EA, considerou-se L1 = 7.

assexuada; b) para o melhoramento a longo prazo por seleção recorrente deve-se verificar a EA. Considerando uma repetibilidade estimada de 0,75, verifica-se que para o melhoramento a curto prazo não compensa avaliar mais do que três safras e para o melhoramento a longo prazo por seleção massal o ideal é selecionar com base em apenas uma safra. Devido a esta incompatibilidade, para o melhoramento da erva-mate, sugere-se utilizar o esquema proposto por Resende *et al.* (1997) que permite conciliar os objetivos de melhoramento a curto e longo prazos.

Verifica-se também pela Tabela 11, que com repetibilidade igual a 0,50 a utilização de uma ou duas safras contribui igualmente para o melhoramento a longo prazo. A utilização de duas e três safras só passa a ser vantajosa para o melhoramento a longo prazo quando a repetibilidade for igual ou inferior a 0,45 e 0,35, respectivamente. Pode-se também relatar que quanto menor for I + S + M (ou menor L), menos vantajoso torna-se o uso de medidas repetidas.

As eficiências (por ciclo de seleção) do uso de medidas repetidas para um caráter $\rho = 0,65$, considerando as mesmas condições (N = 60 para progênies e N = 20 para clones) do item 9 são apresentadas na Tabela 12, para alguns valores de herdabilidade e outros sistemas de seleção–propagação.

Constata-se que o ganho em eficiência com a utilização de várias medições depende do método de seleção e da herdabilidade do caráter, mesmo com um valor fixo e conhecido da repetibilidade. A eficiência é máxima para os métodos que utilizam apenas a informação do indivíduo e decresce rapidamente para os métodos que enfatizam mais a informação de médias de família ou de clones. Assim, o uso de duas medições propicia 10% a mais (em relação a uma medição) de ganho genético para as modalidades de seleção massal e praticamente não conduz à maior eficiência para a seleção de genitores (sistema 9.1.2) e de clones em testes clonais (sistema 9.2.2). Para os métodos que usam a informação do indivíduo e da família (sistemas 9.1.3, 9.2.3, 9.1.4 e 9.2.4), o ganho em eficiência reduz-se a metade (5%) ou menos.

Em relação à herdabilidade, a eficiência diminui com o aumento da herdabilidade para os métodos (9.1.2 e 9.2.2) que usam apenas as informações de médias e aumenta com o aumento da herdabilidade para os métodos (9.1.3, 9.2.3, 9.1.4 e 9.2.4) que usam tanto a informação de médias quanto à informação de indivíduos. Neste último caso, quanto maior a h^2 (e h_a^2) maior o peso dado à informação de indivíduo e portanto maior a eficiência. A mesma consideração é válida na comparação entre famílias de meios-irmãos e famílias de irmãos germanos, sendo que a eficiência é maior nas primeiras devido ao maior peso dado à informação do indivíduo no índice de seleção. Na seleção a partir de cruzamentos fatoriais a eficiência deverá ser inferior à eficiência na seleção com famílias de irmãos germanos, visto que maior ênfase é colocada nas informações de famílias de meios-irmãos e irmãos germanos obtidas sob cruzamentos fatoriais.

Os resultados revelam a necessidade de considerar tanto o método de seleção quanto as herdabilidades dos caracteres na recomendação do número adequado de medições em cada indivíduo e não apenas a repetibilidade. Os resultados apresentados nos tópicos 9 e 10 ressaltam que é essencial o conhecimento dos parâmetros h^2, h_a^2 e ρ (todos ao nível de indivíduos) associados aos caracteres sob melhoramento, pois o conhecimento dos mesmos permite: a) o adequado

delineamento dos experimentos de seleção (número de indivíduos por progênie ou de rametes por clone); b) a escolha do delineamento de cruzamento mais eficiente (eficiência relativa dos delineamentos em termos de ganho genético); c) a escolha do sistema de propagação do material selecionado (eficiência da propagação clonal em relação à sexuada); d) a determinação do número adequado de medições ou safras por indivíduo; e) a escolha da estratégia de teste ou avaliação (baseada em testes de progênies ou clonais); f) a predição dos valores genéticos aditivos e genotípicos; g) a estimação do ganho genético com seleção; h) o adequado delineamento de experimentos para a estimação de parâmetros genéticos.

11. ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS E CONTROLE GENÉTICO DE CARACTERES DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA EM ALGUMAS ESPÉCIES PERENES

Conforme verificado nos tópicos anteriores, as estimativas de parâmetros genéticos, além de suas importâncias na inferência sobre o controle genético dos diferentes caracteres e comparação de métodos de seleção, são essenciais nos procedimentos de predição de valores genéticos e, portanto, na seleção propriamente dita.

TABELA 12. Eficiência da utilização de 2 (EC_2), 3 (EC_3) e 4 (EC_4) medições em cada indivíduo em relação à utilização de apenas uma, visando o melhoramento de um caráter quantitativo com repetibilidade de 0,65 e com herdabilidades no sentido restrito (h^2) e amplo (h^2_a) variáveis.

Sistema	h^2	h^2_a	EC_2	EC_3	EC_4
1.1, 2.1 e 3.1	-	-	1,10	1,14	1,16
1.2	0,10	-	1,04	1,05	1,06
	0,20	-	1,02	1,03	1,04
	0,30	--	1,02	1,02	1,03
	0,40	-	1,01	1,02	1,02
2.2	-	0,15	1,02	1,03	1,04
	-	0,30	1,01	1,02	1,02
	-	0,45	1,01	1,01	1,01
	-	0,60	1,01	1,01	1,01
1.3	0,10	-	1,05	1,08	1,09
	0,20	-	1,05	1,08	1,09
	0,30	--	1,06	1,08	1,10
	0,40	-	1,07	1,09	1,11
2.3	0,10	0,15	1,06	1,09	1,10
	0,20	0,30	1,07	1,09	1,11
	0,30	0,45	1,07	1,10	1,12
	0,40	0,60	1,08	1,11	1,13
1.4	0,10	0,15	1,03	1,04	1,04
	0,20	0,30	1,03	1,04	1,04
	0,30	0,45	1,03	1,05	1,05
	0,40	0,60	1,04	1,06	1,07
2.4	0,10	0,15	1,03	1,04	1,05
	0,20	0,30	1,04	1,05	1,06
	0,30	0,45	1,05	1,07	1,08
	0,40	0,60	1,06	1,09	1,10

Na predição de valores genéticos, os componentes de variância são assumidos como conhecidos, mas, a rigor, para a avaliação genética com dados desbalanceados ou não, necessita-se apenas de estimativas fidedignas dos parâmetros das populações base (originais) não selecionadas e não endogâmicas. Para obtenção destas estimativas o melhorista tem duas opções: a) a partir de seus próprios dados experimentais; b) a partir da literatura. Cabe ao melhorista, em função das circunstâncias, discernir qual das duas opções propicia estimativas mais confiáveis.

Exceto para as espécies florestais, estimativas dos parâmetros genéticos úteis (h^2, h^2_a e ρ ao nível de indivíduo) para a predição de valores genéticos, são raramente reportadas para as espécies perenes, sendo que a maioria dos relatos refere-se à herdabilidades no sentido amplo ao nível de médias de clones ou de cruzamentos, as quais não são úteis para a predição de valores genéticos individuais.

Estimativas obtidas de literatura, para a herdabilidade no sentido restrito (h^2) ao nível de indivíduos para alguns caracteres de crescimento em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* são apresentadas nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Resultados médios de estimativas da herdabilidade no sentido restrito ao nível de plantas para várias espécies florestais foram relatados por Cornellius (1994) e são apresentados na Tabela 15.

Na Tabela 16 são apresentadas estimativas da herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduos para o caráter volume em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* na Aracruz Celulose, conforme relato de Rezende & Resende (2000).

TABELA 13. Estimativas da herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduos para caracteres de crescimento, densidade da madeira e resistência ao cancro em *Eucalyptus grandis*.

Altura	Diâmetro	Volume	Densidade	Resistência	No. de Progênies	No. de Estimativas	Idade (anos)	País	Referência
0,11	0,08	0,10	-	-	51	1	1	África do Sul	Van Wyk (1976)
0,45	0,30	0,53	-	-	71	1	8	África do Sul	Van Wyk (1990)
0,39	0,39	0,31	-	-	529	1	5	EUA	Reddy & Rockwood (1989)
0,25	0,25	0,27	-	-	63 a 72	4	5	África do Sul	Verryn *et al.* (1997)
-	-	0,38	-	-	163	21	2,5	Brasil	Duda *et al.* (1997)
0,23	0,23	-	-	-	282	7	3	Brasil	Resende & Higa (1992)
0,19	0,22	0,20	-	-	25	2	3 e 5	Brasil	Resende *et al.* (1994b)
0,22	0,16	-	-	-	39	1	3	Brasil	Resende & Higa (1994)
0,18	0,16	0,17	-	-	33	1	3	Brasil	Resende & Bertolucci (1995)
0,32	0,18	-	-	-	64	1	3	Brasil	Oda *et al.* (1989)
0,45	0,47	-	-	-	-	2	2	Brasil	Borges (1980)
0,26	0,15	-	-	-	64	3	2	Brasil	Kageyama (1980)
0,28	0,13	0,10	0,69	-	64	3	7	Brasil	Moraes (1987)
-	-	-	0,82	-	-	1	3,5	Brasil	Kageyama *et al.* (1983a)
0,27	0,25	0,31	-	-	81	2	2,5	Brasil	Kikuti (1988)
0,35	0,32	0,29	-	-	180	56	5	Brasil	Higa *et al.* (1993)
0,08	0,10	0,10	-	-	101	3	2 a 4	Brasil	DURATEX (1993)
-	-	-	-	0,70	124	3	2	Brasil	Borges & Brune (1981)
Médias Ponderada									
0,31	0,28	0,29	0,76	0,70					

TABELA 14. Estimativas da herdabilidade no sentido restrito ao nível de indivíduos para caracteres de crescimento e densidade da madeira em *Eucalyptus urophylla*.

Altura	Diâmetro	Volume	Densidade	No. de Progênies	No. de Estimativas	Idade (anos)	País	Referência
0,36	0,24	-	-	67	4	3	Brasil	Pinto Jr. (1984)
0,39	0,24	0,25	-	66 a 109	4	7	Brasil	Mori *et al.* (1988)
0,50	0,43	0,44	-	146	2	8	Brasil	Santos *et al.* (1990)
-	0,23	-	-	45	1	3	Brasil	Rezende & Bertolucci (1993)
-	0,35	-	-	45	1	4	Brasil	Rezende & Bertolucci (1993)
-	0,35	-	-	45	1	5	Brasil	Rezende & Bertolucci (1993)
0,15	0,17	-	-	33	1	5	Brasil	Freitas *et al.* (1997)
0,32	0,24	-	0,71	90	4	1,2,3 e 4	China	Wei & Borralho (1995)
	Média Ponderada							
0,36	0,27	0,31	0,71					

TABELA 15. Estimativas médias* de herdabilidade no sentido restrito em nível de plantas para várias espécies florestais, baseadas em 528 estimativas.

	Altura	Diâmetro	Volume	Densidade
Média	0,28	0,23	0,21	0,50
Mediana	0,25	0,19	0,18	0,48

* Adaptado de Cornelliius (1994)

TABELA 16. Estimativas* da herdabilidade (h^2) no sentido restrito ao nível de indivíduos para o caráter volume em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* na Aracruz Celulose.

Espécie	Local	h^2	c^2
E. grandis	Aracruz	0,27	0,02
	Aracruz	0,62	-
	Aracruz	0,28	-
	Aracruz	0,14	-
	Aracruz	0,20	-
	Aracruz	0,18	-
	Aracruz	0,21	-
	Aracruz	0,32	-
E. urophylla	Aracruz	0,43	0,02
	São Mateus	0,19	0,07
	Sul da Bahia	0,25	0,04
	Aracruz	0,69	0,04
	São Mateus	0,34	0,08
	Sul da Bahia	0,70	0,001
Média		0,34	0,04

* c^2 - correlação fenotípica entre indivíduos devida ao ambiente comum da parcela.

Na Tabela 17 são apresentadas estimativas da herdabilidade no sentido amplo ao nível de indivíduos para o caráter volume em *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e híbridos, conforme relato de Rezende & Resende (2000).

Os resultados médios da herdabilidade no sentido restrito para os caracteres de crescimento em *Eucalyptus grandis* apresentaram magnitudes próximas aos resultados médios obtidos para o *E. urophylla* (Tabelas 13 e 14), equivalendo a aproximadamente 0,30, valor este que pode ser considerado de magnitude moderada e que é superior aos valores médios (Tabela 15) relatados para espécies florestais (principalmente coníferas) por Cornellius (1994).

Os resultados médios da herdabilidade no sentido amplo para o caráter volume em *Eucalyptus* também revelaram um valor de magnitude em torno de 0,30. Assumindo que estes valores médios possam representar parâmetros de uma única população, ter-se-ia, a princípio, valores coincidentes das herdabilidades nos sentidos amplo e restrito (concordando com os resultados de Kikuti, 1988) e, conseqüentemente, uma variância não aditiva (ou de dominância, negligenciando a epistasia) nula. Entretanto, os valores da herdabilidade no sentido restrito foram obtidos, tratando as populações de *Eucalyptus* como alógamas. Empregando marcadores enzimáticos, relatos de literatura (Eldridge *et al.*, 1993) apresentam para o *E. grandis* em populações naturais, uma taxa de autofecundação de 15%. Como a maioria (Higa *et al.*, 1993) das estimativas obtidas advém de populações naturais recém introduzidas, torna-se necessário considerar os efeitos do sistema reprodutivo misto nas estimativas da herdabilidade.

Para uma taxa de autofecundação de 15%, sob sistema reprodutivo misto, os coeficientes de parentesco médio entre indivíduos de progênies de polinização aberta equivalem a 0,33 e 0,30, para caracteres sem e com dominância, respectivamente (Resende *et al.*, 1995a). Como na obtenção das estimativas da herdabilidade no sentido restrito foi considerado o coeficiente de parentesco de 0,25, tem-se que a estimativa média deve ser corrigida (multiplicada) pelos fatores 0,25/0,33 e 0,25/0,30, para o caso de ausência e presença de dominância, respectivamente, tornando-se razoável assumir h^2 em torno de 0,25. Este valor é mais próximo do valor médio para espécies florestais, relatado por Cornellius (1994).

TABELA 17. Estimativas* da herdabilidade (h_a^2) no sentido amplo ao nível de indivíduos para o caráter volume em *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e híbridos.

	h_a^2	c^2	σ_F^2	N° de Clones	N° de Estimativas
Média	0,31	0,11	0,006726	9 a 121	81
Mediana	0,30	0,10	0,001577	9 a 121	81
Média	0,30	0,11	0,007830	24 a 121	67
Mediana	0,30	0,10	0,001664	24 a 121	67
Média	0,33	0,11	0,001442	9 a 16	14
Mediana	0,33	0,09	0,001231	9 a 16	14

* c^2 e σ_F^2 correlação fenotípica entre indivíduos devida ao ambiente comum da parcela e variância fenotípica ao nível de indivíduo, respectivamente.

Assumindo-se $h^2 = 0,25$ e $h^2_a = 0,30$, tem-se que a herdabilidade dos efeitos de dominância (d^2) equivale a cerca de 0,05, ou seja, cerca de 20% de h^2 (ou seja $\sigma^2_d / \sigma^2_a = 0,20$), para uma população hipotética pouco melhorada ou com nível intermediário de melhoramento. Este resultado, se confirmado, revela a presença de dominância (conforme esperado e que explica a ocorrência de depressão endogâmica) e baixa magnitude dos efeitos de dominância em relação aos efeitos aditivos, fato que poderia explicar a baixa heterose verificada em ambientes favoráveis, relatada por Martin (1989).

Nas Tabelas 18, 19 e 20 são apresentadas estimativas de parâmetros genéticos ao nível de indivíduo para algumas espécies perenes.

TABELA 18. Estimativas do parâmetro genético herdabilidade individual no sentido restrito (h^2) em algumas espécies perenes.

Pinus caribaea var. *hondurensis*			
Caráter	Idade (anos)	h^2	Referência
Volume	6,5	0,11	Ledig & Whitmore (1981)
	5,0	0,18	Resende *et al.* (1995c)
	5,0	0,30	Sampaio (1996)
	3,0	0,17	Camcore (1997)
	5,0	0,19	Camcore (1997)
	8,0	0,16	Camcore (1997)
Altura	6,5	0,10	Ledig & Whitmore (1981)
	2,0	0,36	Kageyama *et al.* (1983b)
	8,0	0,29	Dean *et al.* (1986); Cotterill & Dean (1990)
	5,0-7,0	0,20	Woolaston *et al.* (1990); Cotterill & Dean (1990)
	5,0	0,06	Sampaio (1996)
	9,5	0,22	Resende (1999b)
Diâmetro	6,5	0,19	Ledig & Whitmore (1981)
	8,0	0,48	Dean *et al.* (1986); Cotterill & Dean (1990)
	5,0-7,0	0,30	Woolaston *et al.* (1990); Cotterill & Dean (1990)
	5,0	0,20	Sampaio (1996)
	9,5	0,13	Resende (1999b)
Média	6,3	0,21	

Acácia-negra (*Acacia mearnsii*)		
Caráter	h^2	Referência
Diâmetro	0,20; 0,11; 0,34	Wright (1976); Resende (1999a)
Altura	0,08; 0,30	Resende (1999a)
Teor de tanino	0,60; 0,28	Wright (1976); Resende (1999a)
Relação tanantes/não tanantes	0,21	Resende (1999a)
Resistência à gomose	0,05	Resende (1999a)
Resistência ao serrador	0,04	Resende (1999a)
Espessura da casca	0,20	Wright (1976)

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Caráter	h^2	Referência
Massa foliar	0,19	Resende *et al.* (1995b)
Volume da copa	0,07	Resende *et al.* (1995b)
Enraizamento de estacas	0,06 - 0,25	Resende *et al.* (1995b)

Seringueira (*Hevea brasiliensis*)

Caráter	h^{2*}	No. de estimativas	Referência
Produção de borracha	0,25	12	Resende *et al.* (1996b)

* = média dos dados de literatura.

Dendê (*Elaeis guineensis*)

Caráter	h^2	Referência
Número de cachos	0,35	Soh (1994)
Peso do cacho	0,20	Soh (1994)
Óleo/cacho	0,15	Soh (1994)
Frutos/cacho	0,15	Soh (1994)

Maçã (*Malus domestica*)

Caráter	h^2	Referência
Tamanho do fruto	0,34	Durel *et al.* (1998)
Textura	0,34	Durel *et al.* (1998)
Sabor	0,39	Durel *et al.* (1998)
Conteúdo de suco	0,39	Durel *et al.* (1998)
Atratividade	0,38	Durel *et al.* (1998)
Circunferência do tronco	0,51	Durel *et al.* (1998)
Resistência ao Mildeo	0,68	Durel *et al.* (1998)

Pera (*Pyrus pyrifolia*)

Caráter	h^2	Referência
Peso de frutos	0,73	Abe *et al.* (1995)
Firmeza	0,29	Abe *et al.* (1995)
Conteúdo de Sólidos Solúveis	0,42	Abe *et al.* (1995)
pH do suco da fruta	0,64	Abe *et al.* (1995)
Tempo para amadurecimento	0,95	Abe *et al.* (1993)

Café (*Coffea canephora*)

Caráter	h^2	Referência
Peso de sementes	0,15 a 0,91	Leroy *et al.* (1994)
Peso de sementes	0,73	Montagnon *et al.* (1998)
Conteúdo de cafeína	0,80	Montagnon *et al.* (1998)
Conteúdo de gordura	0,74	Montagnon *et al.* (1998)
Conteúdo de sacarose	0,11	Montagnon *et al.* (1998)

Cacau (*Theobroma cacao*)

Caráter	h^2	Referência
Número de frutos por planta	0,10	Resende & Dias (2000)

TABELA 19. Estimativas do parâmetro genético herdabilidade individual no sentido amplo (h_a^2) em algumas espécies perenes.

Pinus caribaea var. *hondurensis*		
Caráter	h_a^2	Referência
Diâmetro	0,39	Resende (1999b)
Altura	0,92	Resende (1999b)

Seringueira (*Hevea brasiliensis*)			
Caráter	h_a^2*	N° de estimativas	Referência
Produção de borracha	0,30	4	Resende *et al.* (1996b)

* = média dos dados de literatura.

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)			
Caráter	h_a^2*	N° de estimativas	Referência
Enraizamento de estacas	0,27	3	Resende *et al.* (1995b)

* = estimativa média.

Dendê (*Elaeis guineensis*)		
Caráter	h_a^2*	Referência
Número de cachos	0,70	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Peso médio do cacho	0,50	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Produção de cachos	0,40	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Frutos/Cacho	0,30	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Mesocarpo/Fruto	0,60	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Óleo/Mesocarpo	0,50	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Óleo/Cacho	0,40	Baudouin & Durandgasselin (1991)
Produção de óleo	0,40	Baudouin & Durandgasselin (1991)

Cacau (*Theobroma cacao*)		
Caráter	h_a^2*	Referência
Altura da planta	0,62 e 0,77	Valois e Nascimento (1986)
Diâmetro do caule	0,24	Valois e Nascimento (1986)
Número de frutos por planta	0,38	Resende & Dias (2000)

De maneira geral, a classificação dos coeficientes de repetibilidade quanto à magnitude pode ser realizada comparando-se o ganho fenotípico permanente a ser obtido considerando uma medição (G_1) com aquele a ser obtido considerando-se m medições (G_m) de onde se obtém a relação $G_1/G_m = \{[1+(m-1)\ \rho\ ]/m\}^{1/2}$. Assumindo o padrão m = 2 para G_m têm-se as seguintes classificações para a repetibilidade:

- repetibilidade alta: $G_1/G_m \geq 0,90 \Rightarrow r \geq 0,60$
- repetibilidade média: $0,80 < G_1/G_m < 0,90 \Rightarrow 0,30 < r < 0,60$
- repetibilidade baixa: $G_1/G_m \leq 0,80 \Rightarrow r \leq 0,30$

TABELA 20. Estimativas do parâmetro genético repetibilidade individual (ρ) em algumas espécies perenes.

Espécie	Caráter	ρ	Nº. Estimativas	Referência
Eucalyptus urophylla	Circunferência do tronco	0,92	21	Resende (1999b)
	Incremento anual na circunferência	0,69	1	Resende (1999b)
Erva-mate	Massa foliar	0,70	3	Resende *et al.* (1995b)
Seringueira	Produção de borracha	0,80	4	Resende *et al.* (1996b)
Cacaueiro	Número de frutos sadios	0,50	1	Dias & Souza (1993)
	Peso de sementes úmidas por planta	0,53	1	Dias & Souza (1993)
	Peso de sementes úmidas por frutos	0,67	1	Dias & Souza (1993)
	Número de frutos por planta	0,57		Resende & Dias (2000)
Coqueiro	Número de frutos por planta	0,45	1	Siqueira (1982)
Cupuaçu	Comprimento do fruto	0,82	1	Costa *et al.* (1997)
	Circunferência do fruto	0,50	1	Costa *et al.* (1997)
	Espessura da casca	0,93	1	Costa *et al.* (1997)
	Peso do fruto	0,77	1	Costa *et al.* (1997)
	Número de sementes	0,55	1	Costa *et al.* (1997)
	Porcentagem de casca	0,63	1	Costa *et al.* (1997)
	Porcentagem de polpa	0,70	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Porcentagem de sementes	0,72	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Porcentagem de acidez da polpa	0,63	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Porcentagem de casca	0,50	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Peso da polpa	0,61	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Relação brix/acidez	0,60	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Peso da casca	0,58	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Largura do fruto	0,56	1	Fonseca *et al.* (1990)
	Peso total	0,56	1	Fonseca *et al.* (1990)
Guaranazeiro	Tamanho da inflorescência	0,77	1	Valois *et al.* (1979)
	Número de botões	0,74	1	Valois *et al.* (1979)
	Número de frutos	0,66	1	Valois *et al.* (1979)
	Número de sementes	0,74	1	Valois *et al.* (1979)
Média		0,66		

Com base nesta classificação pode-se inferir que a maioria dos caracteres quantitativos de espécies vegetais perenes apresenta repetibilidade alta. O valor médio encontrado foi de 0,66, indicando que mesmo com h^2 baixa (em torno de 0,20 para os referidos caracteres em erva-mate, seringueira, *Pinus* e *Eucalyptus*) a repetibilidade é alta. Considerando que h^2_a situa-se ao redor de 0,30 para seringueira e para *Eucalyptus*, verifica-se que a fração $p^2 = \sigma^2_p / \sigma^2_F$ provavelmente seja alta (em torno de 0,35 a 0,50) para espécies vegetais perenes, revelando um forte componente ambiental permanente. Em animais domésticos, as repetibilidades verificadas (Willis, 1991) não são tão altas, citando-se os valores de 0,45 para produção de leite ($h^2 = 0,30$) em bovinos e 0,15 para tamanho e peso da leitegada em suínos, de forma que o componente p^2 parece ser bem mais baixo. De fato, a superioridade de p^2 para espécies

vegetais perenes em relação àquelas verificadas para os animais é esperada em função dos animais estarem menos sujeitos a efeitos ambientais permanentes devido à suas capacidades de movimento.

Para espécies como o coqueiro, que apresenta flutuações bianuais de produção (Shrikhande, 1957), as baixas estimativas de repetibilidade obtidas podem ser atribuídas ao tipo de análise empregada. Nestes casos, o método de análise de variância subestima a repetibilidade (Vasconcellos *et al.*, 1985).

12. ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS PELO MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA RESTRITA (REML)

Com o advento da metodologia de modelos mistos ou BLUP individual, houve uma grande mudança no pensamento sobre a estimação de componentes de variância. Anteriormente, as covariâncias entre parentes eram estimadas e interpretadas em termos de suas esperanças matemáticas (igualando-as aos seus valores esperados), gerando os componentes de variância. Atualmente, os componentes de variância podem ser estimados diretamente como as variâncias dos efeitos aleatórios do modelo linear misto.

Neste contexto, o método de máxima verossimilhança restrita (REML) sob modelo individual, tornou-se o método padrão para a estimação de componentes de variância e parâmetros genéticos a partir de dados desbalanceados. A preferência por este método decorre de suas propriedades estatísticas superiores às propriedades dos estimadores de quadrados mínimos e de máxima verossimilhança (Searle *et al.*, 1992).

A aplicação do REML depende essencialmente das equações de modelo misto associadas ao modelo linear e dos algorítmos associados aos estimadores. Considerando (como exemplo) a avaliação de famílias de irmãos germanos (em parcelas com várias plantas) e das matrizes genitoras (podendo estas serem avaliadas em diferentes experimentos e/ou anos) tem-se o seguinte modelo linear misto:

$$y = Xf + Za + Zd + Wc + e \qquad (5)$$

em que:

y, f, a, d, c e e – vetores de dados, de efeitos fixos (médias de blocos), de efeitos aditivos (aleatórios), de efeitos de dominância (aleatórios), de efeitos de parcelas (efeitos aleatórios de ambiente comum das parcelas) e de erros aleatórios, respectivamente.

X, Z e W – matrizes de incidência para f, a(d) e c, respectivamente.

As equações de modelo misto associadas ao modelo são:

$$\begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z+A^{-1}\lambda_1 & Z'Z & Z'W \\ Z'X & Z'Z & Z'Z+D^{-1}\lambda_2 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'Z & W'W+I\lambda_3 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix} \qquad (6)$$

$$\lambda_1 = \frac{1-h_a^2-c^2}{h^2} = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} \; ; \; \lambda_2 = \frac{1-h_a^2-c^2}{h_a^2-h^2} = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_d^2} \; ; \; \lambda_3 = \frac{1-h_a^2-c^2}{c^2} = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_c^2} \; .$$

A e D = matrizes de parentesco genético aditivo e de dominância, respectivamente.

Atribuindo-se valores iniciais para os componentes de variância em (6), obtém-se a predição para os efeitos a, d e c. Calculando-se as variâncias desses efeitos preditos, obtêm-se as variâncias $\hat{\sigma}_a^2$ (variância genética aditiva), $\hat{\sigma}_d^2$ (variância genética de dominância) e $\hat{\sigma}_c^2$ (variância entre parcelas), as quais provavelmente serão diferentes dos valores iniciais utilizados em (6), significando que os valores iniciais não foram plausíveis ou verossímeis. Dessa forma, deve-se resolver novamente as MME, usando estes componentes de variância calculados. Procedendo-se sucessivamente desta maneira atinge-se a convergência para os componentes de variância, ou seja, tem-se que os valores utilizados nas MME equivalem às próprias variâncias dos efeitos preditos, significando que os valores utilizados nas MME passaram a ser plausíveis ou verossímeis com o conjunto de dados. Este é o princípio da verossimilhança.

Os estimadores REML para obtenção das variâncias dos efeitos aleatórios, empregando-se o algorítmo EM (*Expectation-Maximization*) de Dempster *et al.* (1977) são:

$$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{f}'X'y - \hat{a}'Z'y - \hat{d}'Z'y - \hat{c}'W'y]/[N - r(x)]$$

$$\hat{\sigma}_a^2 = [\hat{a}'A^{-1}\,\hat{a} + \hat{\sigma}_e^2 \; tr \; A^{-1}\,C^{22})\,/q$$

$$\hat{\sigma}_d^2 = [\hat{d}'D^{-1}\,\hat{d} + \hat{\sigma}_e^2 \; tr \; D^{-1}\,C^{33})\,/q$$

$$\hat{\sigma}_c^2 = [\hat{c}'c + \hat{\sigma}_e^2 \; tr \; C^{44}) \text{ , em que;}$$

tr = operador traço matricial;

r(x) = posto da matriz X;

N-r(x) = número de graus de liberdade do erro;

q = número de indivíduos;

s = número de parcelas;

N = número total de dados.

C^{22}, C^{33} e C^{44} provêm de:

$$C^{-1} = \begin{bmatrix} C^{11} & C^{12} & C^{13} & C^{14} \\ C^{21} & C^{22} & C^{23} & C^{24} \\ C^{31} & C^{32} & C^{33} & C^{34} \\ C^{41} & C^{42} & C^{43} & C^{44} \end{bmatrix}$$ = inversa generalizada da matriz dos coeficientes das MME. (7)

Verifica-se que, em associação com o modelo misto ao nível de indivíduo, o método REML estima os componentes de variância diretamente como as variâncias dos efeitos aleatórios do modelo mas, considera também todos os parentescos (matrizes A e D) entre os indivíduos em avaliação. Na estimação são considerados, também, os efeitos ambientais sistemáticos ou fixos do modelo, de forma que os componentes de variância são válidos dentro de (e também entre) cada nível dos efeitos fixos. Em resumo, a iteração dos componentes de variância (variância dos efeitos aleatórios preditos) nas equações de modelo misto, permite verificar a verossimilhança de particulares valores numéricos dos parâmetros, ou seja, permite constatar a plausibilidade de que os dados tenham sido amostrados de uma população com os parâmetros avaliados.

O método REML associado à metodologia de modelos mistos é uma ferramenta flexível para a estimação de parâmetros genéticos e apresenta as seguintes vantagens:

- pode ser aplicada a dados desbalanceados;
- permite utilizar simultaneamente um grande número de informações, provenientes de diferentes gerações, locais e idades, gerando estimativas mais precisas;
- não exige dados obtidos sob estruturas rígidas de experimentação, podendo ser aplicada a dados obtidos normalmente nos programas de melhoramento, os quais não precisam estar associados a delineamentos, bastando que se tenha informações sobre a genealogia dos indivíduos;
- pode permitir a estimação dos efeitos de dominância e epistáticos, além dos aditivos, pois utiliza um maior número de relações de parentesco;
- permite o ajuste de vários modelos alternativos, podendo-se escolher o que se adequa melhor aos dados e ao mesmo tempo é parcimonioso (apresenta menor número de parâmetros).

Em função destas vantagens, a estimação de parâmetros genéticos deve basear-se no procedimento REML/BLUP sob modelo individual para todas as espécies perenes em que os dados são obtidos ao nível de indivíduos e têm-se informações sobre a genealogia. Neste caso, além das espécies florestais (*Eucalyptus, Pinus, Acacia*, erva-mate e seringueira), dentre as espécies (arbóreas frutíferas) potenciais para aplicação do procedimento REML/BLUP, destacam-se: acerola (Paiva *et al.*, 1996; 1999), café robusta (Ferrão *et al.*, 1999), caju (Azevedo *et al.*, 1998), cacau (Pereira *et al.*, 1999), coco (Siqueira, 1982), cupuaçu (Souza *et al.*, 1998), dendê (Barcelos & Amblard, 1994), maçã (Denardi & Camilo, 1997), pupunha (Clement & Bovi, 1999), dentre outras (Clement *et al.*, 1982; Paiva, 1998; Bruckner, 1999).

Dentre os softwares recomendados para a estimação de parâmetros genéticos por REML, destaca-se o DFREML (Meyer, 1998), o qual foi empregado e descrito em detalhes por Resende (1999b).

13. USO DOS MODELOS DE REGRESSÃO ALEATÓRIA NA ANÁLISE DE MEDIDAS REPETIDAS

Os modelos de regressão aleatória (ou funções de covariância) são úteis ao melhoramento de espécies perenes por permitirem a descrição, de maneira mais

realística, dos fenômenos associados a dados longitudinais, como as curvas de crescimento e as medidas repetidas no tempo. Tais modelos permitem considerar que o caráter em questão pode estar mudando continuamente e gradualmente através do tempo e, portanto, podem ser mais realísticos que o modelo de repetibilidade. Fundamentos associados aos modelos de regressão aleatória podem ser encontrados em Henderson Jr. (1982), Meyer & Hill (1997) e Resende (1997; 1999b), dentre outros.

Na análise quantitativa de medidas repetidas quatro classes de modelos de análise podem ser empregados: a) modelos univariados para cada idade; b) modelos de repetibilidade; c) modelos de regressão aleatória; d) modelos multivariados. Destes, os mais completos são os modelos multivariados, que utilizam toda a informação simultaneamente e tratam cada idade como um caráter, considerando suas diferentes herdabilidades e correlações genéticas. Entretanto, tais modelos são superparametrizados e praticamente proibitivos na prática quando muitas idades são consideradas. Isto ocorre devido ao fato de que, neste caso, problemas de estimação surgem principalmente quando o verdadeiro parâmetro encontra-se próximo ao limite do espaço paramétrico (Meyer & Hill, 1997), acarretando problemas computacionais e produzindo estimativas imprecisas. Assim, devem ser preferidos modelos com menor número de parâmetros e que descrevam adequadamente os dados observados.

Os modelos de regressão aleatória podem ser considerados como modelos multivariados simplificados ou reduzidos, que permitem a obtenção dos mesmos parâmetros de interesse que podem ser obtidos pelos modelos multivariados, mas com uma menor parametrização. Considerado um caráter avaliado em sete idades consecutivas, o modelo multivariado requereria 56 parâmetros (28 covariâncias aditivas, 21 covariâncias de ambiente permanente e 7 variâncias residuais), ao passo que a regressão aleatória poderia empregar apenas 13 parâmetros e fornecer a mesma quantidade de informações.

Por sua vez, o modelo de repetibilidade assume que o caráter avaliado repetidas vezes sobre o indivíduo é o mesmo caráter ao longo das idades, ou seja, assume que a correlação genética entre medidas repetidas desse caráter equivale a 1; esta nem sempre é a realidade para caracteres associados à curvas de crescimento. Por outro lado, os modelos univariados tendem a ser imprecisos por ignorar a correlação entre as avaliações repetidas ao longo do tempo.

Em função do exposto, Meyer & Hill (1997) relatam que os modelos de regressão aleatória deverão suplantar os modelos menos realísticos até então usados. Especialmente no melhoramento florestal, esta técnica foi aplicada por Resende (1999b), que relatou as seguintes vantagens da mesma: permite descrever continuamente a estrutura de covariâncias de caracteres de crescimento ao longo do tempo; permite a estimação simultânea de parâmetros genéticos ao longo das idades, considerando a mudança genética do caráter ao longo do tempo; permite a predição de valores genéticos de indivíduos avaliados em diferentes idades e a projeção destes valores genéticos para uma idade comum para efeitos de ordenamento e seleção; permite a obtenção de curvas de valores genéticos para cada indivíduo em função da idade.

14. AVALIAÇÃO GENÉTICA VIA INFERÊNCIA BAYESIANA

Uma deficiência do procedimento REML/BLUP para a estimação/predição de componentes de variância/valores genéticos refere-se ao fato de que o método

REML propicia intervalos de confiança apenas aproximados para os parâmetros genéticos, através do uso de aproximações e suposições de normalidade assintótica. Isto porque a distribuição e variância dos estimadores não são conhecidos e assim questões referentes à efetividade da seleção não podem ser respondidas com rigor.

A análise Bayesiana baseia-se no conhecimento da distribuição *a posteriori* dos parâmetros genéticos e possibilita a construção de intervalos de confiança exatos para as estimativas dos parâmetros genéticos. Assim, esta análise propicia uma descrição mais completa sobre a confiabilidade dos parâmetros genéticos do que o método REML (Resende, 1997; 1999b).

A inferência estatística Bayesiana baseia-se na distribuição condicional do parâmetro (θ) dado o vetor de dados (y), ou seja na distribuição *a posteriori* do parâmetro dadas as observações fenotípicas, a qual equivale a:

$$f(\theta|y) = \frac{f(y|\theta)\ f(\theta)}{\int_R f(y|\theta)\ f(\theta)\ d\ \theta}$$, em que:

$f(y \mid \theta)$ - função densidade de probabilidade da distribuição condicional de uma observação (y) dado θ (denominada função de verossimilhança ou modelo para os dados).

$f(\theta)$ - função densidade de probabilidade da distribuição *a priori*, que é também a densidade marginal de θ. Esta função denota o grau de conhecimento acumulado sobre θ, antes da observação de y.

$\int_R f(y|\theta)\ f(\theta) = d\theta$ - distribuição marginal ou preditiva de y com respeito a θ, onde R é a amplitude da distribuição de θ.

Verifica-se então que a distribuição *a posteriori* é proporcional à verossimilhança x *priori*, ou seja, a função de verossimilhança conecta *a priori* à *posteriori* usando para isto os dados do experimento (observações). Dessa forma, a distribuição *a posteriori* contempla o grau de conhecimento prévio sobre o parâmetro (θ) e também as informações adicionais propiciadas pelo experimento (y).

Para a situação em que tanto a distribuição *a priori* quanto a distribuição das informações são normais, ou seja, $\theta \sim N(u, r^2)$ e $(y|\theta) \sim N(\theta, \sigma^2)$ com σ^2 conhecido, a distribuição *a posteriori* de θ é também normal, ou seja $(\theta|Y = y) \sim N(u_1, r^2_1)$ onde:

$$\mu_1 = \frac{r^{-2}\mu + \sigma^{-2}y}{r^{-2} + \sigma^{-2}}\ ;\ r_1^{-2} = r^{-2} + \sigma^{-2}$$

Usando esta distribuição *a posteriori*, pode-se demonstrar que os fundamentos básicos da predição de valores genéticos são essencialmente de natureza Bayesiana, conforme apresentado inicialmente por Robertson (1955).

Os efeitos genéticos aditivos são definidos como desvios e uma população de efeitos genéticos apresenta zero como média e σ^2_a como variância. A melhor predição

do efeito genético de um indivíduo sem nenhuma informação, tomado aleatoriamente da população é a média populacional u, a qual pode ser tomada como o estimador *a priori*, cuja variância é σ_a^2 . Tomando uma informação do indivíduo, um segundo estimador do efeito genético é o desvio (y-u) fenotípico em relação à média populacional, o qual possui variância $\sigma_e^2 = \sigma_y^2 - \sigma_a^2$. Estes dois estimadores independentes podem ser combinados linearmente da melhor maneira possível tomando as recíprocas das respectivas variâncias como pesos. Sob o enfoque Bayesiano, a esperança da distribuição *a posteriori* corresponde à média ponderada pela precisão, das médias da *priori* e da verossimilhança. Assim, tem-se:

$$\hat{a} = \left(\frac{\text{estimador } a \text{ priori}}{\sigma_a^2} + \frac{\text{estimador informação observada}}{\sigma_y^2 - \sigma_a^2} \right) / \left(\frac{1}{\sigma_a^2} + \frac{1}{\sigma_y^2 - \sigma_a^2} \right) =$$

$$= \left(\frac{0}{\sigma_a^2} + \frac{Y-u}{\sigma_y^2 - \sigma_a^2} \right) / \left(\frac{1}{\sigma_a^2} + \frac{1}{\sigma_y^2 - \sigma_a^2} \right) = h^2 (y-u),$$

como no enfoque da inferência estatística clássica, onde h^2 é a herdabilidade. Este é também (considerando y como a média dos indivíduos selecionados) o estimador para o ganho genético para a seleção massal.

No contexto Bayesiano, as equações de modelo misto (denominadas equações de modelo misto de Robertson) são dadas por:

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X + S^{-1} & X'R^{-1}Z \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z + G^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E(f|y) \\ E(a|y) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}Y + S^{-1} r_1 \\ Z'R^{-1}Y + G^{-1}0 \end{bmatrix}$$

onde $r_1 = E(f)$ e $0 = E(a)$.

Tomando a informação *a priori* sobre os efeitos fixos como não informativa (expressa como $S \to \infty$ e então $(S^{-1} \to 0)$, tem-se que esta equação resultante equivale as equações do modelo misto (MME):

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z + G^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{f} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}Y \\ Z'R^{-1}Y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$R = I\sigma_e^2$; $G = A\sigma_a^2$ e $S = Var(f)$.

O problema básico da implementação da análise Bayesiana refere-se à integração numérica (no espaço do parâmetro) da função densidade de probabilidade *a posteriori*. Tal integração, por métodos analíticos, é impossível na prática. Assim, tem sido utilizado o procedimento de simulação estocástica denominado amostragem de Gibbs (GS) para a viabilização da estimação Bayesiana (Sorensen, 1996).

Além das distribuições (normais) assumidas para os efeitos aleatórios (a) no modelo linear clássico e para a verossimilhança do vetor de observações (y), a abordagem Bayesiana requer atribuições para as distribuições *a priori* dos efeitos

fixos e componentes de variância. De maneira geral, são atribuídas distribuições *a priori* não informativas ou uniformes para os efeitos fixos e componentes de variância, como forma de caracterizar um conhecimento *a priori* vago sobre os referidos efeitos e componentes (Gianola & Fernando, 1986).

Utilizando-se distribuições *a priori* não informativas para os efeitos fixos e componentes de variância, têm-se que as modas das distribuições marginais *a posteriori* dos parâmetros genéticos correspondem às estimativas obtidas por REML e geram estimativas de componentes de variância pelo método VEIL (ou de verossimilhança integrada) apresentados por Gianola & Foulley (1990). A grande vantagem da análise Bayesiana, neste caso, refere-se à obtenção dos desvios-padrão e intervalos de confiança exatos para os parâmetros genéticos bem como a obtenção de estimativas mais precisas. Resende (1999b) empregando as abordagens REML e GS obteve estimativas de $0,32 \pm 0,06$ e $0,34 \pm 0,005$, respectivamente, para a herdabilidade no sentido restrito, confirmando a grande precisão do método GS.

Quanto à estimação dos efeitos fixos (efeitos de bloco e de anos de medição) e a predição dos efeitos aleatórios (valores genéticos), têm-se que as médias das distribuições marginais *a posteriori* dos parâmetros de locação (efeitos fixos e aleatórios), dado os componentes de variância ou parâmetros de dispersão, equivalem às soluções das equações do modelo misto do BLUP desde que: sejam atribuídas *prioris* não informativas para os efeitos fixos, *prioris* normais para os efeitos aleatórios e verossimilhança normal para o vetor de observações. Neste caso, a vantagem da abordagem Bayesiana refere-se à obtenção de valores genéticos preditos com menores desvios-padrão.

Em resumo, a análise Bayesiana propicia estimativas mais precisas de componentes de variância, parâmetros genéticos, valores genéticos e ganhos genéticos. Adicionalmente, a estimação Bayesiana permite a análise exata de amostras de tamanho finito. Este último aspecto é muito importante, especialmente para programas de melhoramento baseados em conjuntos de dados desbalanceados, onde tal abordagem propicia uma elegante análise de amostra finita, a qual não pode ser obtida pela metodologia clássica de modelos mistos.

15. DELINEAMENTOS DE CRUZAMENTO

Uma vez que a eficiência dos programas de melhoramento de espécies perenes depende da utilização de eficientes delineamentos de cruzamento, torna-se relevante a comparação entre diferentes delineamentos.

Resende (1999b) comparou a eficiência de delineamentos de cruzamento envolvendo progênies não endogâmicas. Alguns resultados referentes às comparações entre os delineamentos de policruzamento (progênies de meios-irmãos), pares simples (progênies de irmãos germanos) e fatorial desconexo 4 x 4, são apresentados nas Tabelas 21 e 22 (para delineamentos com 6 plantas por parcela).

Os resultados revelaram a superioridade do delineamento de pares simples sobre o de policruzamento em todas as situações, ou seja, em presença ou ausência de dominância e nos sistemas de propagação sexuada e assexuada. As maiores eficiências foram obtidas para caracteres de mais baixa herdabilidade e em ausência de dominância ($h_a^2 = h^2$).

TABELA 21. Acurácias seletivas associadas aos delineamentos de policruzamento (r_{IA1}^{MI}), pares simples (r_{IA1}^{IG}) e fatorial desconexo 4 x 4 (r_{IAF_4}), bem como eficiências do delineamento de pares simples sobre o policruzamento (E_1), do fatorial sobre policruzamentos (E_2) e do fatorial sobre pares simples (E_3). Delineamento experimental de blocos ao acaso com 6 plantas por parcela e propagação sexuada.

h^{2*}	h_a^{2*}	r_{IA1}^{MI}	r_{IA1}^{IG}	r_{IAF_4}	E_1	E_2	E_3
0,05	0,05	0,38	0,56	0,62	1,47	1,63	1,11
	0,075	0,38	0,52	0,59	1,37	1,55	1,13
0,10	0,10	0,46	0,63	0,66	1,37	1,43	1,05
	0,15	0,46	0,58	0,64	1,26	1,39	1,10
0,20	0,20	0,56	0,69	0,71	1,23	1,27	1,03
	0,30	0,56	0,64	0,68	1,14	1,21	1,06
0,30	0,30	0,63	0,73	0,74	1,16	1,17	1,01
	0,45	0,63	0,68	0,71	1,08	1,13	1,04
0,40	0,40	0,69	0,77	0,77	1,12	1,12	1,00
	0,60	0,69	0,72	0,75	1,04	1,09	1,04
0,50	0,50	0,75	0,81	0,81	1,08	1,08	1,00
	0,75	0,75	0,77	0,80	1,03	1,07	1,04

* h^2 e h_a^2 - herdabilidades no sentido restrito e amplo, respectivamente.

TABELA 22. Acurácias seletivas associadas aos delineamentos de policruzamento (r_{IA2}^{MI}), pares simples e (r_{IG2}^{IG}) fatorial desconexo 4 x 4 (r_{IAF_4}), bem como eficiências do delineamento de pares simples sobre o policruzamento (E_1), do fatorial sobre policruzamentos (E_2) e do fatorial sobre pares simples (E_3). Delineamento experimental de blocos ao acaso com 6 plantas por parcela e propagação assexuada.

h^{2*}	h_a^{2*}	r_{IG2}^{MI}	r_{IG2}^{IG}	r_{IAF_4}	E_1	E_2	E_3
0,05	0,05	0,38	0,56	0,62	1,47	1,63	1,11
	0,075	0,41	0,57	0,65	1,39	1,59	1,14
0,10	0,10	0,46	0,63	0,66	1,37	1,43	1,05
	0,15	0,52	0,64	0,71	1,23	1,37	1,11
0,20	0,20	0,56	0,69	0,71	1,23	1,27	1,03
	0,30	0,65	0,72	0,79	1,11	1,22	1,10
0,30	0,30	0,63	0,73	0,74	1,16	1,17	1,01
	0,45	0,75	0,79	0,85	1,05	1,13	1,08
0,40	0,40	0,69	0,77	0,77	1,12	1,12	1,00
	0,60	0,84	0,86	0,92	1,02	1,10	1,07
0,50	0,50	0,75	0,81	0,81	1,08	1,08	1,00
	0,75	0,93	0,95	1,00	1,02	1,08	1,05

* h^2 e h_a^2 - herdabilidades no sentido restrito e amplo, respectivamente.

O fatorial desconexo 4 x 4 apresentou também maior eficiência sobre o policruzamento em todas as situações e também maior eficiência que o delineamento de pares simples em quase todas as situações. A eficiência do fatorial sobre pares simples mostrou-se mais significativa (entre 5% e 14% de superioridade) para caracteres de baixa ($\leq$ 0,30) herdabilidade e em presença de dominância. Considerando

apenas a propagação vegetativa em presença de dominância a superioridade do fatorial sobre pares simples mostrou-se acima de 5% para todos os níveis de herdabilidade considerados.

A superioridade do fatorial desconexo 4 x 4 sobre pares simples é muito representativa pois não implica em qualquer custo adicional, já que ambos baseiam-se em cruzamentos controlados e estão associados ao mesmo número total de cruzamentos. Assim, na opção por cruzamentos controlados o fatorial desconexo 4 x 4 deve ser utilizado. Esta inferência pode ser estendida também para programas de seleção recorrente recíproca em que se objetiva também a seleção de clones superiores dentro de progênies associadas a cruzamentos interpopulacionais.

Na opção entre cruzamentos controlados (fatorial desconexo 4 x 4) e polinização livre (policruzamentos), deve prevalecer a alta eficiência (E_2) do fatorial sobretudo para caracteres de baixa herdailidade. Para caracteres com herdabilidade menor ou igual a 0,20, a superioridade mostrou-se acima de 20% em todas as situações.

Ainda na comparação entre polinização aberta e polinização controlada visando a maximização do ganho genético a curto prazo, Resende & Vencovsky (1993) compararam a seleção combinada com progênies de autofecundação (S_1) e com progênies de polinização aberta. Para herdabilidades no sentido restrito e amplo de 0,10 e 0,15, respectivamente, os referidos autores obtiveram uma superioridade da ordem de 45% para a seleção com S_1. No presente trabalho, para estes mesmos níveis de herdabilidade, a superioridade do fatorial 4 x 4 sobre o policruzamento foi de 39%. Considerando os vários problemas (baixa produção de sementes, ausência de coincidência de florescimento entre os vários indivíduos S_1's por ocasião da recombinação, possíveis problemas experimentais) práticos potenciais associados à utilização de S_1's, pode-se relatar que a utilização do fatorial desconexo 4 x 4 é uma opção muito mais segura e que apresenta ganho esperado similar à utilização de S_1. Outra desvantagem da utilização de S_1's refere-se à redução no tamanho efetivo populacional, fator este que é muito relevante no melhoramento de espécies perenes (Resende & Vencovsky, 1990).

As Tabelas 21 e 22 permitem também comparar as eficiências (através das acurácias seletivas) dos sistemas de propagação assexuada e sexuada para os vários níveis de herdabilidade. Conforme esperado, constata-se que, em presença de dominância a propagação vegetativa é sempre superior a propagação sexuada.

16. SELEÇÃO RECORRENTE EM ESPÉCIES ARBÓREAS E FRUTEIRAS

O aspecto perene de uma espécie conduz a um impacto direto nos esquemas de melhoramento, os quais devem ser capazes de produzir resultados práticos dentro de um período de tempo relativamente curto. Dessa forma, cultivares melhoradas devem ser criadas durante os diferentes estágios do melhoramento populacional propriamente dito.

A maneira mais adequada de conciliar a rápida obtenção de cultivares melhoradas e o melhoramento a longo prazo das espécies perenes é a adoção de esquemas de seleção recorrente. Em termos genéricos, as duas principais formas de seleção recorrente são a seleção recorrente intrapopulacional (SRI) e a seleção recorrente recíproca (SRR) (Gallais, 1978; 1989). A SRI capitaliza os efeitos aditivos dos alelos

e, portanto, é uma ferramenta muito poderosa para o melhoramento populacional. Por outro lado, a SRR enfatiza o melhoramento do híbrido interpopulacional, através do melhoramento do valor genético aditivo e também da heterose. Os aspectos relacionados aos métodos de seleção e delineamentos de cruzamento para o melhoramento intrapopulacional já foram discutidos em tópicos anteriores. A seguir serão abordados aspectos referentes ao melhoramento de híbridos interpopulacionais.

A heterose ou vigor híbrido está associada à capacidade específica de combinação (CEC) entre os genitores, sendo função da diversidade genética entre os progenitores e da dominância alélica nos locos que controlam o caráter de interesse. Dessa forma, um fator primordial na opção pela seleção para a capacidade geral de combinação (seleção recorrente intrapopulacional para os efeitos aditivos) ou pela seleção para capacidade específica de combinação (seleção recorrente recíproca enfatizando o híbrido interpopulacional) é o conhecimento da base genética do caráter de interesse, principalmente quanto ao parâmetro grau médio de dominância. Determinados caracteres não exibem dominância e, portanto, para o melhoramento destes, não se justifica a seleção para a CEC.

Adicionalmente, na comparação entre a SRR e a SRI no melhoramento de espécies perenes, outras questões de ordem prática devem ser consideradas tais quais: o maior custo, o maior intervalo de gerações, a menor intensidade de seleção e o menor tamanho efetivo populacional associados à SRR. Em termos de ganho genético por unidade de tempo, as duas estratégias podem ser comparadas (com vistas ao melhoramento do híbrido interpopulacional) pela expressão a seguir, que fornece a eficiência da SRI sobre a SRR:

$$E_f = \frac{G_{SRI}}{G_{SRR}} = \frac{r_{G_{IR}}\ h_I\ K_I\ t_R}{h_R\ K_R\ t_I}\ , \text{ onde:}$$

h_I^2 e h_R^2 = herdabilidades intrapopulacional e interpopulacional (recíproca), respectivamente;

K_I e K_R = diferenciais de seleção associados à seleção intrapopulacional e recíproca, respectivamente;

t_I e t_R = intervalos de geração para a seleção intrapopulacional e recíproca, respectivamente;

r_{GIR} = correlação genética entre progênies intrapopulacionais e interpopulacionais.

Em geral, pode-se inferir que $K_I > K_R$ (pois na SRI geralmente trabalha-se com populações maiores) e que $t_R > t_I$, fatos que contribuem para maior eficiência da SRI. O valor de $r_{GIR}\ h_I/h_R$ é totalmente dependente das propriedades genéticas do caráter nas populações específicas. Assumindo $h_I/h_R \simeq 1$, verifica-se que a eficiência depende sobretudo da correlação genética entre progênies intrapopulacionais e interpopulacionais. Esta correlação pode ser vista como uma correlação entre a

capacidade geral de combinação dos genitores dentro das populações com a capacidade geral de hibridação (Gallais, 1989) destes genitores. Assim, torna-se prioritário na comparação entre SRR e SRI, quantificar a magnitude da correlação entre capacidade geral de combinação e capacidade geral de hibridação. Para populações não divergentes ou pouco divergentes esta correlação provavelmente tenderá a 1 e a SRI deverá suplantar a SRR em termos de ganho por unidade de tempo (neste caso, os ganhos por ciclo, considerando iguais intensidades de seleção, deverão ser iguais para SRI e SRR). Segundo Souza Jr. (1999), para populações divergentes, as correlações entre progênies intrapopulacionais e interpopulacionais obtidas de uma mesma planta deverão ser alta para uma população e baixa para a outra população. Neste caso, a SRR poderá conduzir a melhores resultados.

Shelbourne (1993) comparou várias estratégias de melhoramento de híbridos interespecíficos e concluiu que a SRI propicia maiores ganhos genéticos por ano e é mais robusta que a SRR em termos de tamanho efetivo populacional. Apesar desta aparente vantagem da SRI, a SRR provavelmente propicia a identificação de genótipos excepcionalmente produtivos antes que a SRI, embora a longo prazo a SRI tenda a suplantar a SRR. Desta forma, as duas estratégias podem ser utilizadas simultaneamente, principalmente nos primeiros ciclos de seleção onde a realização de cruzamentos interespecíficos propiciaria: a estimação da capacidade geral de hibridação dos genitores; a estimação da correlação entre capacidade geral de combinação e capacidade geral de hibridação; a identificação precoce de híbridos superiores através do direcionamento dos cruzamentos entre os genitores com maiores capacidades gerais de hibridação (Resende & Higa, 1990).

Recentemente, Souza Jr. (1993; 1999) mostrou que a SRR e SRI são métodos incapazes de melhorar adequadamente os híbridos interpopulacionais e as duas populações simultaneamente. Assim, tal autor propôs um esquema modificado denominado THS, o qual avalia progênies interpopulacionais para uma (a mais produtiva) população e progênies intrapopulacionais para a outra (a menos produtiva) população. Tal método, quando aplicado em populações divergentes, conduz a cerca de 7% e 25% a mais de ganho genético, por ciclo, no híbrido interpopulacional, do que a SRR e SRI, respectivamente, para caracteres com graus médios de dominância (d/a) entre 0,75 e 1,0. Para o melhoramento das populações *per se*, o procedimento THS é tão eficiente quanto a SRR para a população mais produtiva e tão eficiente quanto a SRI para a população menos produtiva. É importante ressaltar que para as condições citadas anteriormente (populações divergentes e nível de dominância entre 0,75 e 1,0) a SRR é entre 11% e 20% mais eficiente que a SRI para o melhoramento do híbrido interpopulacional, cerca de 20% mais eficiente que a SRI para o melhoramento da população mais produtiva e entre 25% e 30% menos eficiente que a SRI para o melhoramento da população menos produtiva (Souza Jr., 1999). É importante ressaltar que os resultados relatados referem-se a ganhos por ciclo de seleção e não por unidade de tempo e que foram consideradas iguais intensidades de seleção para os diferentes esquemas (SRR, SRI e THS).

Os resultados relatados por Souza Jr. (1993; 1999) não são prontamente extrapoláveis para espécies perenes, pois nos esquemas que envolvem a SRI foi considerada apenas a seleção de genitores com base no comportamento de suas

progênies. Em espécies perenes, a seleção intrapopulacional é geralmente baseada em índice incluindo as informações do indivíduo e da média de sua família, com recombinação dos próprios indivíduos avaliados. Isto conduz a maior intensidade de seleção e também a menor acurácia em relação à seleção de genitores. Considerando um balanço entre a menor acurácia e a maior intensidade de seleção (Tabela 10), tem-se que a seleção pelo índice conduz a maior ganho que a seleção de genitores. Dessa forma, o esquema de Souza Jr. parece adequado também para espécies perenes.

Na opção pela SRR, dois tipos de progênies interpopulacionais podem ser prontamente empregados para espécies perenes: meios-irmãos (MI) – usando mistura de pólen de pelo menos 4 ou 5 testadores da população recíproca – e irmãos germanos (IG). As expressões do ganho genético no híbrido interpopulacional, com seleção baseada nas médias das progênies e recombinação dos genitores são dadas por (Resende & Higa, 1990):

$G_{s_1} = K_1\ (1/4)\ \sigma^2_{A_{12}} / \sigma_{F_{12}} + K_1\ (1/4)\ \sigma^2_{A_{21}} / \sigma_{F_{21}}$, para progênies de meios-irmãos;

$G_{s_2} = K_2\ (1/4)\ \sigma^2_{A_{(12)}} / \sigma_{F_{(12)}} + K_2\ (1/4)\ \sigma^2_{A_{(12)}} / \sigma_{F_{(12)}}$, para progênies de irmãos germanos;

em que:

$\sigma^2_{A_{12}}$ e $\sigma^2_{A_{21}}$ = variâncias genéticas aditivas interpopulacionais que surgem quando as populações 2 e 1 são utilizadas como doadoras de pólen nos cruzamentos, respectivamente;

$\sigma_{F_{12}}$ e $\sigma_{F_{21}}$ = desvios padrões fenotípicos entre médias de famílias de meios-irmãos interpopulacionais, quando as populações 2 e 1 são utilizadas como doadoras de pólen nos cruzamentos, respectivamente;

$\sigma^2_{A_{(12)}}$ e $\sigma^2_{F_{(12)}}$ = variâncias genética aditiva interpopulacional e fenotípica entre médias de famílias de irmãos germanos interpopulacionais, respectivamente;

$\sigma^2_{D_{(12)}}$ = variância genética de dominância interpopulacional;

K_1 e K_2 = diferenciais de seleção padronizados associados a seleção de genitores nos esquemas com meios-irmãos e irmãos germanos, respectivamente.

Considerando iguais (K_1 e K_2) intensidades de seleção, e que $\sigma^2_{F_{(12)}} = (1/2)\ \sigma^2_{A_{(12)}} + (1/4)\ \sigma^2_{D_{(12)}}$ + variância residual média e $\sigma^2_{F_{12}} = (1/4)\ \sigma^2_{A_{12}}$ + variância ambiental média, verifica-se que o esquema empregando meios-irmãos é mais eficiente.

Expressando as herdabilidades ao nível de médias de progênies (h^2_m) como função das herdabilidades ao nível de indivíduo e o ganho genético em função de $G_s = K\ r_{IA}\ \sigma_{A(12)}$, onde r_{IA} é a acurácia seletiva e supondo $\sigma^2_{A_{(12)}} = (\sigma^2_{A_{21}} + \sigma^2_{A_{12}})/2$, tem-se:

- Para a SRR com famílias de meios-irmãos:

$$h_m^2 = \frac{b(1/4)\ h_{(12)}^2}{1+(b-1)\ (1/4)\ h_{(12)}^2}$$, para experimentos com uma planta por parcela.

$$h_m^2 = \frac{nb\ (1/4)\ h_{(12)}^2}{1+(n-1)\ [(1/4)\ h_{(12)}^2 + c^2]+(b-1)\ n\ (1/4)\ h_{(12)}^2}$$, para experimentos com n plantas por parcela.

$$r_{IA_{MI}} = \left[\frac{b\ (1/16)\ h_{(12)}^2}{1+(b-1)\ (1/4)\ h_{(12)}^2}\right]$$, para experimentos com uma planta por parcela.

$$r_{IA_{MI}} = \left[\frac{nb\ (1/16)\ h_{(12)}^2}{1+(n-1)\ [(1/4)\ h_{(12)}^2 + c^2]+(b-1)\ n\ (1/4)\ h_{(12)}^2}\right]^{1/2}$$, para experimentos com n plantas por parcela.

• Para a SRR com famílias de irmãos germanos:

$$h_m^2 = \frac{b(1/4)\ h_{(12)}^2}{1+(b-1)\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2)]}$$, para experimentos com uma planta por parcela.

$$h_m^2 = \frac{nb\ (1/4)\ h_{(12)}^2}{1+(n-1)\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2) + c^2]+(b-1)\ n\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2)]}$$, para experimentos com n plantas por parcela.

$$r_{IA_{IG}} = \left[\frac{b\ (1/16)\ h_{(12)}^2}{1+(b-1)\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2)]}\right]^{1/2}$$, para experimentos com uma planta por parcela.

$$r_{IA_{IG}} = \left[\frac{nb\ (1/16)\ h_{(12)}^2}{1+(n-1)\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2) + c^2]+(b-1)\ n\ [(1/2)\ h_{(12)}^2 + (1/4)\ (h_{a(12)}^2 - h_{(12)}^2)]}\right]^{1/2}$$, para experimentos com n plantas por parcela.

Nas expressões apresentadas, têm-se as seguintes definições:

b = número de repetições;

$h_{(12)}^2$ e $h_{a(12)}^2$ = herdabilidades individuais interpopulacionais nos sentidos restrito e amplo, respectivamente.

c^2 = correlação devida ao ambiente comum da parcela.

Considerando os parâmetros $h^2_{(12)}$ =0,25, $h^2_{a(12)}$ = 0,30 e c^2 = 0,10 os quais foram obtidos (Rezende & Resende, 2000) a partir de populações de *E. grandis* e *E. urophylla*, têm-se as seguintes acurácias e eficiências (E):

a) $r_{IA_{MI}}$ = 0,4472; $r_{IA_{IG}}$ = 0,3208; E = $r_{IA_{MI}}$ / $r_{IA_{IG}}$ = 1,39 para experimentos com uma planta por parcela e b = 60 blocos.

b) $r_{IA_{MI}}$ = 0,4251; $r_{IA_{IG}}$ = 0,3123; E = $r_{IA_{MI}}$ / $r_{IA_{IG}}$ = 1,36 para experimentos com n = 6 plantas por parcela e b = 10 blocos.

Verifica-se então, que para a mesma intensidade de seleção, a SRR com meios-irmãos é pelo menos 36% mais eficiente que a SRR com progênies de irmãos germanos (é importante relatar que um esquema mais eficiente que ambos são os cruzamentos fatoriais ou dialélico parcial, os quais utilizam simultaneamente meios-irmãos e irmãos germanos, entretanto, tal esquema limita o número de genitores a serem utilizados).

Porém, para atingir a mesma intensidade de seleção a SRR com MI necessita-se avaliar o dobro do número de progênies. Considerando a avaliação de um mesmo número de progênies na SRR com MI e na SRR com IG, tem-se de acordo com a proporção selecionada:

Proporção Selecionada						
MI	IG	K_1	K_2	$K_1\, r_{IA_{MI}}$=*	$K_2\, r_{IA_{IG}}$=⊕	Ef = */⊕
0,50	0,25	0,80	1,27	0,3578	0,4074	0,8783
0,30	0,15	1,16	1,55	0,5188	0,4972	1,0434
0,20	0,10	1,40	1,76	0,6261	0,5646	1,1089
0,10	0,05	1,76	2,06	0,7871	0,6608	1,1911

Verifica-se assim que, para proporções de seleção igual ou inferior a 30%, a SRR com MI continua sendo superior à SRR com IG, mesmo quando se avalia metade do número de genitores em cada população pela SRR com MI.

Para a presente situação considerando a avaliação de 200 genitores em cada população têm-se as seguintes possibilidades, considerando a seleção de 30 genitores:

a) SRR com IG
- número de cruzamentos controlados = 200
- número de progênies para avaliação = 200
- ganho genético em unidades de $\sigma_{A(12)}$ = 0,4972

b) SRR com MI
- número de cruzamentos controlados = 400
- número de progênies para avaliação = 400
- ganho genético em unidades de $\sigma_{A(12)}$= 0,6932

c) THS
- número de cruzamentos controlados = 200
- número de progênies para avaliação = 400
- ganho genético em unidades de $\sigma_{A(12)}$, considerando a eficiência de 7% (Souza Jr., 1999) sobre a SRR com MI = 0,7417

Considerando a avaliação de 100 genitores em cada população e a seleção de 30 genitores, tem-se:

d) SRR com MI
- número de cruzamentos controlados = 200
- número de progênies para avaliação = 200
- ganho genético em unidades de $\sigma_{A(12)}$=0,5188

e) THS
- número de cruzamentos controlados = 100
- número de progênies para avaliação = 200
- ganho genético em unidades de $\sigma_{A(12)}$=0,5551

De todas estas situações, verifica-se que aquela que propicia menor ganho é a situação (a). As eficiências de ganho genético em relação à (a) são: (b)/(a) = 1,39; (c)/(a) = 1,49; (d)/(a) = 1,04; (e)/(a) = 1,11.

Na opção por recombinar 50 genitores, os ganhos genéticos em (a), (b), (c), (d) e (e) equivalem a 0,4074; 0,5679; 0,6067; 0,3578 e 0,3828, respectivamente, e as eficiências equivalem a (b)/(a) = 1,39; (c)/(a) = 1,49; (d)/(a) = 0,8783 e (e)/(a) = 0,9396.

Considerando as dificuldades e os custos envolvidos na realização de cruzamentos controlados e na avaliação de um maior número de progênies cabe ao melhorista decidir pela melhor opção. De maneira geral, o esquema THS parece mais favorável por envolver a realização de um menor número de cruzamentos controlados, sem comprometer o ganho genético.

O ganho genético pela seleção com o esquema THS é dado por $G_{s_3} = K_3\ (1/4)\ \sigma^2_{A_{12}} / \sigma_{F_{12}} + K_3\ (1/4)\ \sigma_{A_2A_1} / \sigma_{F_{22}}$, considerando 1 como a população mais produtiva e 2 como a menos produtiva.

$\sigma_{A_2A_1}$ refere-se à covariância genética aditiva entre genótipos intrapopulacionais da população 2 e interpopulacionais, sendo que $\sigma_{A_2A_1}$ e $\sigma^2_{A_{12}}$ são dados por Souza Jr. (1999):

$$\sigma_{A_2A_1} = \sigma^2_{A_{22}} + 2Cov_{(A_2\tau_{21})}$$

$$\sigma^2_{A_{12}} = \sigma^2_{A_{11}} + \sigma^2_{\tau_{12}} + 4Cov_{(A_1\tau_{12})}$$, em que:

$\sigma^2_{A_{11}}$ e $\sigma^2_{A_{22}}$ = variâncias aditivas intrapopulacionais das populações 1 e 2, respectivamente.

$\sigma^2_{\tau_{12}}$ = variância dos desvios dos efeitos aditivos intra (população 1) e interpopulacionais.

$Cov_{(A_1\tau_{12})}$ e $Cov_{(A_2\tau_{21})}$ = covariâncias dos efeitos aditivos intrapopulacionais com os desvios dos efeitos aditivos intra e interpopulacionais.

Com base na expressão de $\sigma^2_{A_{12}}$ verifica-se que a SRR utiliza os efeitos aditivos intrapopulacionais ($\sigma^2_{A_{11}}$) e os efeitos de dominância ($\sigma^2_{\tau_{12}}$) nos locos em que as populações são divergentes e que apresentam dominância. Dessa forma a SRR explora e aumenta a heterose dos cruzamentos. É importante notar que a SRR não utiliza a variância genética de dominância.

Fazendo-se um paralelo entre a SRR e THS para o melhoramento do híbrido interpopulacional, tem-se, para efeito comparativo, que:

a) SRR

Faz uso de h^2_{12} e h^2_{21} para as frações do ganho associados as recombinações nas populações 1 e 2, respectivamente.

b) THS

Faz uso de h^2_{12} e $h_{21}\, h_{22}\, r_{G21}$ para as frações do ganho associado à recombinação nas populações 1 e 2, respectivamente.

Verifica-se assim que, quando as herdabilidades intrapopulacional na população 2 (h^2_{22}) e interpopulacional (h^2_{21}) são iguais e a correlação $r_{G21} = \sigma_{A2A1}/(\sigma_{A22}\, \sigma_{A21})$ entre progênies intrapopulacionais da população 2 e interpopulacionais for igual a 1, os esquemas SRR e THS conduzem ao mesmo ganho genético. E isto ocorre quando as populações não são divergentes. Com divergência, a vantagem de THS sobre SRR deve advir então, da superioridade de h^2_{22} sobre h^2_{21}. A eficiência da THS sobre SRR é diretamente proporcional a $h_{22}\, r_{G21} / h_{21}$. A eficiência de um índice de seleção combinando as *performances* intrapopulacional 2 e interpopulacional em relação ao uso de progênies interpopulacionais, para o melhoramento do híbrido interpopulacional, é dada por:

$$\left[1+\frac{(h_{22}\, r_{G21}/h_{21} - r_{F_{21}})^2}{1-r^2_{F_{21}}}\right]^{1/2}$$

, onde $r_{F_{21}}$ é a correlação fenotípica entre as *performances* intrapopulacional e interpopulacional. A eficiência deste índice em relação ao uso apenas de progênies intrapopulacionais da população 2 é dada por:

$$h_{21}/(h_{22}\, r_{G_{21}}) \left[1+\frac{(h_{22}\, r_{G21}/h_{21} - r_{F_{21}})^2}{1-r^2_{F_{21}}}\right]^{1/2}$$

Em espécies perenes, considerando a facilidade de obtenção de progênies intrapopulacionais por polinização aberta, torna-se relevante verificar a eficiência do índice combinando as *performances* intrapopulacional e interpopulacional visando a seleção e recombinação na população 1 (a mais produtiva). Neste caso, a eficiência é dada por:

$$E=\left[1+\frac{(h_{11}\, r_{G12}/h_{12} - r_{F_{12}})^2}{1-r^2_{F_{12}}}\right]^{1/2}$$

Considerando que r_F refere-se à correlação fenotípica em plantas distintas tem-se que:

$r_{G_{12}} = \frac{r_F}{h_{11}\, h_{12}}$ e, portanto, $r_F = r_{G12}\, h_{11}\, h_{12}$ (= herdabilidade do diferencial de seleção direto associado as progênies interpopulacionais, via seleção indireta nas progênies intrapopulacionais). Dessa forma, tem-se que:

$$E = \left[1 + \frac{(h_{11}\, r_{G12}/h_{12} - r_{G_{12}}\, h_{11}\, h_{12})^2}{1-(r_{G_{12}}\, h_{11}\, h_{12})^2}\right]^{1/2}.$$

Assumindo $h^2_{11} = h^2_{12} = 0{,}30$ e $r_{G_{12}} = 0{,}80$ (que denota que a seleção indireta é cerca de 20% menos eficiente), tem-se que E = 1,15, ou seja, nesta situação, o uso simultâneo das informações das progênies intrapopulacionais e interpopulacionais propicia 15% a mais de ganho genético na contribuição da população 1 para o melhoramento do híbrido interpopulacional.

O índice é dado por $I = b_1 X_{F_{12}} + b_2 X_{F_{11}}$, em que b_i referem-se aos pesos dos valores fenotípicos e $X_{F_{12}}$ e $X_{F_{11}}$ referem-se aos valores fenotípicos associados aos materiais interpopulacionais e intrapopulacionais, respectivamente. Atribuindo 1 a b_1, b_2 é dado por:

$$b_2 = \frac{\sigma_{F_{12}}}{\sigma_{F_{11}}} \frac{r_{G12}\, h_{11} - r_{F_{12}}\, h_{12}}{h_{12} - r_{F_{12}}\, r_{G_{12}}\, h_{11}}$$

$$= \frac{\sigma_{F_{12}}}{\sigma_{F_{11}}} \frac{r_{G12}\, h_{11} - r_{G_{12}}\, h_{11}\, h^2_{12}}{h_{12} - r^2_{G_{12}}\, h^2_{11}\, h_{12}}.$$

Assumindo $\sigma_{F12} = \sigma_{F11}$, tem-se $b_2 = 0{,}69$, para o presente exemplo. Neste caso, peso 1 é dado à *performance* interpopulacional e peso 0,69 à *performance* intrapopulacional.

A seguir são relatados aspectos relacionados à seleção recorrente em algumas espécies perenes.

Eucalyptus

Em *Eucalyptus*, suspeita-se que os efeitos de dominância existam e apresentem baixa magnitude para os caracteres de crescimento (Hardner *et al.*, 1996; Hodge *et al.*, 1996; Borralho, 1997; Rezende & Resende, 2000). Quanto à heterose propriamente dita, tem sido verificado que a mesma é de alta magnitude apenas em sítios marginais para ambas as espécies genitoras, sendo que em sítios favoráveis às mesmas, a superioridade do híbrido não tem sido confirmada (Martin, 1989; Eldridge *et al.*, 1993). Assim, segundo Martin (1989), o vigor híbrido em *Eucalyptus* pode ser classificado como ambientalmente dependente.

Apesar de aparentemente baixa, a existência de dominância já é suficiente para propiciar uma ligeira vantagem da propagação clonal sobre a sexuada e para permitir a exploração da capacidade específica de combinação entre genitores,

principalmente ao nível interespecífico. Dessa forma, híbridos de *Eucalyptus* vêm sendo utilizados em vários países destacando-se as combinações E. grandis x E. urophylla no Brasil, África do Sul, Colômbia e Venezuela e *E. grandis* x *E. urophylla, E. grandis* x *E. tereticornis e E. urophylla* x *E. pellita* no Congo.

Ao nível mundial, a primeira e única estratégia de melhoramento de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* foi implementada a partir de 1989 no Congo (Vigneron, 1991; 1992), empregando a seleção recorrente recíproca baseada em cruzamentos fatoriais e cujos resultados iniciais foram publicados por Bouvet *et al.* (1992), Bouvet (1995) e Bouvet & Vigneron (1995). A estratégia de SRR empregada envolve os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* e *E. urophylla* x *E. pellita*. Para a população híbrida *E. urophylla* x *E. grandis*, a relação verificada para σ_d^2 / σ_a^2 do caráter volume aos 3 anos foi de 0,20 (Bouvet, 1995; Bouvet & Vigneron, 1995), concordando com o resultado de Rezende & Resende (2000). Para o *E. urophylla* x *E. pellita*, a relação σ_d^2 / σ_a^2 mostrou-se mais elevada. Com base em análise crítica dos primeiros resultados obtidos no programa de melhoramento de híbridos de *Eucalyptus* no Congo, Bouvet (1995) concluiu pela adequabilidade da seleção recorrente recíproca baseada em famílias de irmãos germanos. Baudouin *et al.* (1997) relataram a obtenção de cinco variedades híbridas que elevaram a produtividade média de 20 para 35 m^3/ha/ano.

As considerações realizadas permitem concluir que a dominância em *Eucalyptus*, provavelmente é suficiente para proporcionar efeitos consideráveis da capacidade específica de combinação envolvendo cruzamento entre genitores, concordando com Cotterill (1997) que relata a ocorrência de efeitos de alta magnitude para a capacidade específica de combinação em *Eucalyptus globulus* (ao contrário do observado para *Pinus*, em que a capacidade geral de combinação dos genitores mostrou-se uma boa preditora da média da família de irmãos germanos obtidas do cruzamento entre eles), gerando famílias excepcionais de irmãos germanos, destinadas à propagação vegetativa.

Pinus

Em *Pinus*, os efeitos de dominância são, aparentemente, de baixa magnitude para características de crescimento, tendo-se constatado heterose praticamente nula (Cotterill *et al.*, 1987; Cotterill, 1997). Os efeitos da capacidade específica de combinação não são importantes em *Pinus*, sendo que a capacidade geral de combinação dos genitores é uma boa preditora da média do cruzamento entre os mesmos (Cotterill, 1997).

Com base no exposto e considerando que os plantios clonais (que permitem a fixação imediata de genótipos heteróticos) não são ainda muito praticados em *Pinus*, as estratégias de melhoramento são, em geral, baseadas em SRI (conforme revisão apresentada em Resende, 1999a).

Acácia-negra (*Acacia mearnsii*)

Para a acácia-negra não existem ainda informações sobre os níveis de dominância associados aos principais (produção de tanino e de madeira) caracteres de importância econômica. Este fato, associado a não utilização de plantios clonais ao nível operacional, têm conduzido a adoção de programas de SRI (Higa & Resende, 1992), no Brasil, África do Sul e China.

Seringueira (*Hevea brasiliensis*)

Os programas de melhoramento genético da seringueira no Brasil enfatizam principalmente os caracteres produção de borracha, resistência ao "mal das folhas" e vigor (circunferência do caule). Para o caráter produção de borracha, Resende *et al.* (1996b) relataram os valores médios de literatura de 0,20 e 0,30 para os parâmetros herdabilidades individuais no sentido restrito e amplo, respectivamente. Estes valores revelam a existência de dominância e provável heterose para o caráter, concordando com os relatos de Paiva & Gonçalves (1989).

Adicionalmente, os plantios clonais são a regra em seringueira. Entretanto, programas de seleção recorrente recíproca não foram ainda implementados em seringueira (Baudouin *et al.*, 1997), provavelmente devido à utilização, por longo tempo (desde 1876), de uma única população de base genética estreita nos programas de melhoramento de todo o mundo. Recentemente novas introduções (materiais silvestres) foram realizadas, mas o nível de produção destas populações é ainda muito baixo (cerca de 10% daquele observado para a população melhorada), fato que tem demandado a adoção prévia de um programa de SRI nestas populações para, posteriormente, utilizá-las em cruzamento (Baudouin *et al.*, 1997).

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Para a erva-mate (espécie destinada à obtenção de bebidas estimulantes) não existem ainda informações sobre o nível de dominância do caráter produção de massa verde e sobre a adequabilidade prática da propagação vegetativa. Estes fatores, associados à recente domesticação da espécie têm conduzido à adoção de programas de SRI (Resende *et al.*, 1995b; 1997; Belingheri & Kricun, 1997).

Chá-da-Índia *(Camellia sinensis)*

Os programas de melhoramento genético do chá iniciaram-se por volta de 1910 na Indonésia, África, China e Índia, portanto, bem antes do desenvolvimento da Genética Quantitativa e da Estatística Experimental. Em função disto as técnicas empregadas (seleção seguida de clonagem) conduziram a um grande estreitamento da base genética à semelhança do que ocorreu com a seringueira. Dessa forma, recentemente, os programas têm priorizado a introdução de germoplasma e a prática da SRI (Resende *et al.*, 1998).

Café-robusta *(Coffea canephora)*

As principais variedades de café-robusta utilizadas na África são híbridos advindos do cruzamento entre dois grupos genéticos com características complementares. Em função disto um programa de seleção recorrente recíproca vem sendo conduzido desde 1984 na Costa do Marfim, o qual conduziu a um ganho genético de 60% para o caráter produção de café. Este resultado confirma assim a adequabilidade da SRR (Baudouin *et al.*, 1997). No Brasil, a seleção recorrente intrapopulacional e a seleção de clones visando a propagação vegetativa têm sido realizadas com sucesso no Estado do Espírito Santo (Ferrão *et al.*, 1999).

Café-arábica *(Coffea arabica)*

O café arábica é uma espécie autógama, fato que tem conduzido a adoção dos métodos de seleção de linhas em plantios comerciais e método genealógico

(Mendes, 1999). Estudos recentes têm demonstrado a significância dos efeitos da capacidade específica de combinação e a importância da utilização de híbridos (Cilas *et al.*, 1998). No Brasil, a seleção recorrente intrapopulacional foi proposta como uma alternativa viável para o melhoramento desta espécie (Ramalho *et al.*, 1999).

Cacau *(Theobroma cacao)*

Em cacau as variedades cultivadas são geralmente propagadas através de sementes híbridas (Dias, 1998; Pereira *et al.*, 1999), visando capitalizar a heterose, a qual tem sido observada para produção, componentes de produção, vigor, resistência a doença e precocidade (Dias, 1998). No programa de melhoramento em desenvolvimento na Costa do Marfim, quatro populações foram divididas em dois grupos, sendo que dois ciclos de SRI serão desenvolvidos dentro de cada grupo e, posteriormente, será iniciado um programa de SRR envolvendo os dois grupos (Clement *et al.*, 1993; Baudouin *et al.*, 1997).

Dendê *(Elaeis guineensis)*

As variedades comerciais de dendê são produzidas por polinizações envolvendo duas populações distintas, uma utilizada como genitor feminino (*Deli dura*) e a outra como genitor masculino (*African pisifera*), visando conciliar características agronômicas favoráveis. Dessa forma, um programa de SRR foi adotado visando o melhoramento do dendê na África (Baudouin *et al.*, 1997).

Coco *(Cocos nucifera)*

Devido à superioridade das cultivares híbridas, o programa de melhoramento do coco na África baseia-se em um esquema de SRR que visa melhorar simultaneamente os híbridos Anão x Gigante e Gigante x Gigante (Baudouin *et al.*, 1997).

Maçã *(Malus domestica)*

Para a maioria dos caracteres agronômicos da maçã, os efeitos aditivos parecem ser muito mais importantes do que os não aditivos. Assim, programas de SRI poderiam ser especialmente indicados (Noiton & Shelbourne, 1992; Durel *et al.*, 1998).

Caju (*Anacardium occidentale*)

No cajueiro, hibridações envolvendo os tipos anão e comum têm sido realizadas com freqüência, tendo-se constatado heterose para os caracteres número de castanhas por plantas, peso médio da castanha e peso médio da amêndoa (Cavalcanti *et al.*, 2000). Dessa forma, programas de seleção recorrente recíproca são indicados para esta espécie.

Com base nos programas de melhoramento de espécies perenes citados pode-se inferir que a SRR é recomendada especialmente quando os propágulos melhorados a serem utilizados comercialmente são híbridos e/ou clones e/ou quando os efeitos da capacidade específica de combinação são significativos. Dessa forma, espécies como *Eucalyptus*, seringueira, café-canefora, cacau, caju, coco e dendê são particularmente favoráveis a programas de SRR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; SATO.P.; SAITO, T.; KURIHARA, A.; KOTOBUTI, K. Inheritance of ripening time of fruit of japanese pear. **Japanese Journal of Breeding**, v.43, p.289, 1993.

ABE, K.; SATO.P.; SAITO, T.; KURIHARA, A.; KOTOBUTI, K. Narrow-sense heritability of fruit characters in Japanese pear. **Breeding Science**, v.45, p.1-5, 1995.

AZEVEDO, D.M.P.; CRISÓSTOMO, J.R.; ALMEIDA, F.C.G.; ROSSETTI, A.G. Estimates of genetic correlations and correlated responses to selection in cashew. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.399-402, 1998.

BARCELOS, E.; AMBLARD, P. **Oil Palm Breeding Program at EMBRAPA/BRAZIL**. Manaus: EMBRAPA, CPAA, 1994. 20p.

BAUDOUIN, L.; BARIL, C.; CLEMENTDEMANGE, A.; LEROY, T.; PAULIN, D. Recurrent selection of tropical tree crops. **Euphytica**, v.96, p.101-114, 1997.

BAUDOUIN, L.; DURANDGASSELIN, T. Genetic transmission of characters linked to oil yields in oil palm by cloning results for young palms. **Oleagineux**, v.46, p.313-320, 1991.

BELINGHERI, D.; KRICUN, S.D.P. Programa de mejoramiento genetico de la yerba mate en el INTA - Argentina In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., Curitiba, 1997. **Anais**. Curitiba, 1997. p.267-278.

BORGES, R.C.G. Estimativas de herdabilidade e correlações entre caracteres de crescimento em *Eucalyptus grandis*. Viçosa: UFV, 1980. 42p. Dissertação, Mestrado.

BORGES, R.C.G.; BRUNE, A. Estudo da herdabilidade quanto à resistência a *Diaporthe cubensis* em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.5, p.115-120, 1981.

BORRALHO, N.M.G. Seed orchards or cuttings: wich is the best? In: IUFRO CONFERENCE. **Silviculture and improvement of eucalypt**: proceedings. Colombo: EMBRAPA, 1997. v.1, p.330-336.

BOUVET, J.M. Selection precoce de l'*Eucalyptus* au Congo. **Bois et Forêts des Tropiques**, v.246, p.23-40, 1995.

BOUVET, J.M.; COUTEAU, N.; VIGNERON, P. Premiers elements de l'analyse des plans factoriels du schema de selection recurrent reciproque de l'*Eucalyptus* au Congo. In: IUFRO SYMPOSIUM. **Production de varieties genetiquement ameliorees d'especes forestieres à croissance rapide**. Bordeaux: AFOCEL, 1992. p.317-326.

BOUVET, J.M.; VIGNERON, P. Age trends in variances and heritabilities in *Eucalyptus* factorial mating designs. **Silvae Genetica**, v.44, p.206-216, 1995.

BRUCKNER, C.H. Melhoramento de fruteiras. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.679-714.

BUENO FILHO, J.S.S. Uso de modelos mistos no melhoramento de populações florestais. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 160p. Tese, Doutorado.

CAMCORE. Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative. **Annual report**. Raleigh: North Carolina State University, 1997. 23p.

CAVALCANTI, J.J.V; PINTO, C.B.P.; CRISÓSTOMO, J.R.; FERREIRA, D.F. Análise dialélica para a avaliação de híbridos interpopulacionais de cajueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1567-1575, 2000.

CILAS, C.; BOUHARMONT, P.; BOCCARA, M.; ESKES, A.B.; BARADAT, P. Prediction of genetic value for coffee production in *Coffea arabica* from a half-diallel with lines and hybrids. **Euphytica**, v.104, p.49-59, 1998.

CLEMENT, C.R.; MULLER, C.H.; FLORES, W.B.C. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v.12, p.677-695, 1982.

CLEMENT, C.R.; BOVI, M.L.A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. In: SEMINÁRIO DO AGRO-NEGÓCIO, 1., Porto Velho, 1999. **Palmito de pupunha na Amazônia**: anais: Rondônia: EMBRAPA,CPAF, 1999. p.57-70. (Documentos, 41)

CLEMENT, D.; ESKES, A.; SOUNIGO, O.; GORAN, J. Amelioration genetique du cacaoyer en Côte d'Ivoire, presentation d'un nouveau schema de selection. In: INTERNATIONAL CACOA RESEARCH CONFERENCE, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 1993. **Proceedings**. p.451-455.

CORNELLIUS, J. Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. **Canadian Journal of Forestry Research**, v.24, p.371-379, 1994.

COSTA, J.G.; LEDO, A.S.; OLIVEIRA, M.N. Estimativas de repetibilidade de características de frutos de cupuaçuzeiro no Estado do Acre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.313-318, 1997.

COTTERILL, P.P. Nucleus breeding: is it OK for *Pinus* and *Eucalyptus*? In: IUFRO CONFERENCE. **Silviculture and improvement of eucalypt**: proceedings. Colombo: EMBRAPA, 1997. v.1, p.277-284.

COTTERILL, P.P.; DEAN, C.A. **Successful tree breeding with index selection**. Melbourne: CSIRO,1990. 80p.

COTTERILL, P.P.; DEAN, C.A.; VAN WYK, G. Additive and dominance genetic effects in *Pinus pinaster, P. radiata* e *P. elliottii* and some implications for breeding strategies. **Silvae Genetica**, v.36, p.221-232, 1987.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, O.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1994. 390p.

DEAN, C.A.; COTTERILL, P.P.; EISEMANN, R.L. Genetic parameters and gains expected from selection in *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in Northern Queensland, Austrália. **Silvae Genetica**, v.35, p.229-236, 1986.

DEMPSTER, A.P.; LAIRD, N.M.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistic Society**, v.39, p.1-38, 1977.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Epagri 406-Baronesa: nova cultivar de macieira de maturação tardia para o Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.185-189, 1997.

DIAS, L.A.S. Novos rumos no melhoramento genético do cacaueiro. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Lavras, 1998. p.9-27.

DIAS, L.A.S.; SOUZA, C.A.S. Aplicação do coeficiente de repetibilidade na seleção de cacaueiros em plantação comercial. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.364, 1993.

DUDA, L.L.; RESENDE, M.D.V. de; CANDIDO, H.C.S. Avaliação genética e seleção em *Eucalyptus grandis* na região de Arapoti-PR. **Revista Árvore**, v.21, p.537-545, 1997.

DURATEX. Teste de progênies de *E. grandis* em Itapetininga. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., Curitiba, 1993. **Anais**. Curitiba: SBS, 1993. p.155-157.

DUREL, C.E.; LAURENS, F.; FOUILLET, A.; LESPINASSE, Y. Utilization of pedigree information to estimate genetic parameters from large unbalanced data sets in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1077-1085, 1998.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford Science Publications, 1993. 288p.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G. Programas de melhoramento genético de café robusta no Brasil. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., Lavras, 1999. p.50-65.

FONSECA, C.E.L.; ESCOBAR, J.R.; BUENO, D.M. Variabilidade de alguns caracteres físicos e químicos do fruto do cupuaçuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, p.1079-1084, 1990.

FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T.; SANTOS, P.E.T.; VALÉRIO FILHO, W.V. Variação genética em progênies de *Eucalyptus urophylla* na região de Selvíria-MS. In: IUFRO CONFERENCE. **Silviculture and improvement of eucalypt**: proceedings. Colombo: EMBRAPA, 1997. v.1, p.403-407.

GALLAIS, A. Amelioration des populations, methodes de selection et creation des varietes: III. Bases theoriques pour l'etude de la selection recurrente reciproque. **Annales de Amelioration des Plantes**, v.28, p.637-660, 1978.

GALLAIS, A. **Theorie de la selection en amelioration des plantes**. Paris: Ed. Masson, 588p. 1989.

GIANOLA, D.; FERNANDO, R.L. Bayesian methods in animal breeding theory. **Journal of Animal Science**, v.63, p.217-244, 1986.

GIANOLA, D.; FOULLEY, J.L. Variance estimation from integrated likelihood (VEIL). **Genetics, Selection, Evolution**, v.22, p.403-417, 1990.

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; SAES, L.A. Estimativas de repetibilidade na seleção de árvores de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, p.1031-1038, 1990.

HARDNER, C.; BORRALHO, N.M.G.; TIER, B.; GODDARD, M. Accounting for dominance and inbreeding in genetic evaluations using individual tree mixed models. In: IUFRO CONFERENCE. **Tree improvement for sustainable tropical forestry**. Caloundra, 1996.

HENDERSON JR., C.R. Analysis of covariance in the mixed model: higher-level, nonhomogeneous and random regression. **Biometrics**, v.38, p.633-640, 1982.

HENDERSON, C.R. Sire evaluation and genetic trends. In: ANIMAL breeding and genetics symposium in Honor of J. Lush. Champaign: American Society of Animal Science, 1973. v.3, p.10-41.

HIGA, A.R.; RESENDE, M.D.V. de. Breeding *Acacia mearnsii* in Southern Brazil. In: BROWN, A.G. (Ed.) **Australian tree species research in China**. Zhangzhou, 1992. p.158-160. (Aciar Proceedings, 48).

HIGA, A.R.; RESENDE, M.D.V. de; LAVORANTI, O.J. **Projeto melhoramento genético e conservação de *Eucalyptus***. Colombo: EMBRAPA, 1993. 700p. (Relatório não publicado).

HODGE, G.R.; VOLKER, P.W.; POTTS, B.M.; OWEN, J.V. A comparison of genetic information from open-pollinated and control: pollinated progeny tests in two eucalypt species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.53-63, 1996.

KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em uma população de *Eucalyptus grandis*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1980. 125p. Tese, Doutorado.

KAGEYAMA, P.Y.; MORA, A.L.; BARRICHELO, L.E.G.; MIGLIORINI, A.J.; SANSIGOLO, C.A. Variação genética para densidade da madeira em progênies *de Eucalyptus grandis*. **Silvicultura**, v.8, p.318-324, 1983a.

KAGEYAMA, P.Y.; PINTO JR., J.E.; MORA, A.L.; NICOLIELO, N. Half-sib progeny trial of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* from selected superior trees of Australian populations. **Silvicultura**, v.8, p.97-99, 1983b.

KIKUTI, P. Parâmetros genéticos em progênies de meios-irmãos e clonais numa população de *Eucalyptus grandis* na região de Telêmaco Borba. Piracicaba: ESALQ/USP, 1988. 119p. Dissertação, Mestrado.

LEDIG, F.T.; WHITMORE, J.L. Heritability and genetic correlations for volume, foxtails and other characteristics of caribbean pine in Puerto Rico. **Silvae Genetica**, v.30, p.88-92, 1981.

LEROY, T.; MONTAGNON, C.; CILAS, C.; CHARRIER, A.; ESKES, A.B. Reciprocal recurrent selection applied to *Coffea canephora*, 2. Estimation of genetic parameters. **Euphytica**, v.74, p.121-128, 1994.

MARTIN, B. The benefits of hybridization. How do you breed for it? In: IUFRO CONFERENCE. **Breeding tropical trees**: proceedings. Pattaya: Oxford Forestry Institute, 1989. p.79-92.

MENDES, A.N. Métodos de melhoramento aplicados na cultura do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., Lavras, 1999. p.18-35.

MEYER, K. **DFREML**: version 3.0b; user notes. Edinburgh: Institute of Animal Genetics; Armidale: Animal Genetics and Breeding Unit, University of New England, 1998. 31p.

MEYER, K.; HILL, W.G. Estimation of genetic and phenotypic covariance functions for longitudinal or repeated records by restricted maximum likelihood. **Livestock Production Science**, v.47, p.185-200, 1997.

MONTAGNON, C.; GUYOT, B.; CILAS, C.; LEROY, T. Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffe, *Coffea canephora*. **Plant Breeding**, v.117, p.576-578, 1998.

MORAES, M.L.T. Variação genética da densidade básica da madeira em progênies de *Eucalyptus grandis* e suas relações com as características de crescimento. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 115p. Dissertação, Mestrado.

MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; FERREIRA, M. Variação genética e interação progênie x locais em *Eucalyptus urophylla*. **IPEF**, v.39, p.53-63, 1988.

NOITON, D.A.M.; SHELBOURNE, C.J.A. Quantitative genetics in an apple breeding strategy. **Euphytica**, v.60, p.213-219, 1992.

ODA, S.; MENCK, A.L.M.; VENCOVSKY, R. Problemas no melhoramento clássico de eucalipto em função da alta intensidade de seleção. **IPEF**, v.41/42, p.8-17, 1989.

PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia**: estratégias e novas abordagens. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. 135p.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; CORREA, M.P.F.; FREIRE, F.C.O.; SOBRINHO, R.B.; JUCA, W. Seleção e clonagem de plantas de acerola (*Malpighia* spp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., Curitiba, 1996. **Resumos**. p.38.

PAIVA, J.R.; GONÇALVES, P.S. Eficiência do programa de melhoramento da seringueira no CNPSD. Nove anos de experiências. **Boletim de Pesquisa do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê**, v.2, p.1-41, 1989.

PAIVA, J.R.; PAIVA, W.O.; CORDEIRO, E.R.; NETO, H.S. Parâmetros genéticos em progênies de polinização livre de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.629-634, 1999.

PEREIRA, M.G.; PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R. Melhoramento do cacau. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999. p.159-188.

PINTO JR., J.E. Variabilidade genética em populações de *Eucalyptus urophylla*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1984. Dissertação, Mestrado.

RAMALHO, M.A.P.; GONÇALVES, F.M.A.; SOBRINHO, F.S. Emprego da seleção recorrente no melhoramento do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., Lavras, 1999. p.66-81.

REDDY, K.V.; ROCKWOOD, D.L. Breeding strategies for coppice production in a *Eucalyptus grandis* base population with four generation of selection. **Silvae Genetica**, v.38, p.148-151, 1989.

RESENDE, M.D.V. de; HIGA, A.R. Estratégias de melhoramento para eucalipto visando a seleção de híbridos. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.20/21, p.1-20, 1990.

RESENDE, M.D.V. de.; VENCOVSKY, R. Condução e utilização de bancos de conservação genética de espécies de eucalipto. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., Campos do Jordão, 1990. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p.434-439.

RESENDE, M.D.V. de. Correções nas expressões do progresso genético com seleção em função da amostragem finita dentro de famílias e populações e implicações no melhoramento florestal. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.22/23, p.61-77, 1991.

RESENDE, M.D.V. de; HIGA, A.R. **Cooperação técnica em melhoramento genético de *Eucalyptus grandis***. Colombo: EMBRAPA, 1992. 8p. (Convênio EMBRAPA/CENIBRA. Relatório não publicado)

RESENDE, M.D.V. de.; VENCOVSKY, R. Relative efficiency of *Eucalyptus* selection methods. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 17., Birmingham, 1993. **Abstracts**. Birmingham, 1993. p.226.

RESENDE, M.D.V. de; HIGA, A.R.; LAVORANTI, O.J. Predição de valores genéticos no melhoramento de *Eucalyptus*: melhor predição linear. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., Curitiba, 1993. **Anais**. Curitiba: SBS, 1993. p.144-147.

RESENDE, M.D.V. de; HIGA, A.R. Maximização da eficiência da seleção em testes de progênies de *Eucalyptus* através da utilização de todos os efeitos do modelo matemático. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.28/29, p.37-55, 1994.

RESENDE, M.D.V. de; MEDRADO, M.J.S. Aspéctos metodológicos no melhoramento genético de *Leucaena leucocephala*, uma espécie florestal autógama. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 1., Porto Velho, 1994. **Anais**. Colombo: EMBRAPA, CNPF,1994. v.2, p.233-248. (Documentos, 27).

RESENDE, M.D.V. DE; OLIVEIRA, .E.B. DE; MELINSKI, L.C.; GOULART, F.S.; OAIDA, G.R. **SELEGEN**: seleção genética computadorizada; manual do usuário. Curitiba: EMBRAPA, CNPF, 1994a. 31p.

RESENDE, M.D.V. de; HIGA, A.R.; LAVORANTI, O.J. Regressão geno-fenotípica multivariada e maximização do progresso genético em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.28/29, p.57-71, 1994b.

RESENDE, M.D.V. de; BERTOLUCCI, F.L.G. Maximization of genetic gain with restriction on effective population size and inbreeding in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE. **Eucalypt plantations**: improving fiber yield and quality; proceedings. Hobart, 1995. p.167-170.

RESENDE, M.D.V. de; VENCOVSKY, R.; FERNANDES, J.S.C. Selection and genetic gains in populations of *Eucalyptus* with a mixed mating system. In: IUFRO CONFERENCE. **Eucalypt plantations**: improving fiber yield and quality; proceedings. Hobart: 1995a. p.191-194.

RESENDE, M.D.V. de; STURION, J.A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1995b. 33p. (Documentos, 25).

RESENDE, M.D.V. de.; ARAÚJO, A.J.; SAMPAIO, P.T.B.; WIECHETECK, M.S.S. Acurácia seletiva, intervalos de confiança e variâncias de ganhos genéticos associados a 22 métodos de seleção de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Floresta**, v.25, p.3-16, 1995c.

RESENDE, M.D.V.; PRATES, D.F.; JESUS, A.; YAMADA, C.K. Estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e melhor predição linear não viciada (BLUP) em *Pinus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.32/33, p.3-22, 1996a.

RESENDE, M.D.V. de; MORAES, M.L.T.; PAIVA, J.R. Comparação de métodos de avaliação genética e seleção no melhoramento da seringueira. **Floresta**, v.26, p.27-48, 1996b.

RESENDE, M.D.V. de. Avanços da genética biométrica florestal. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 14., Piracicaba, 1997. **Genética biométrica vegetal**: anais: Piracicaba: USP, ESALQ, Depto. Genética, 1997. p.20-46.

RESENDE, M.D.V. de; STURION, J.A.; SIMEÃO, R.M. Estratégias para o melhoramento genético de erva-mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., Curitiba, 1997. **Anais**. Curitiba, 1997. p.243-266.

RESENDE, M.D.V. de; SIMEÃO, R.M.; FERNANDES, J.S.C.; STURION, J.A. Melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): subsídios de um século de experiências em melhoramento genético e seleção em chá-da-índia (*Camellia sinensis*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.37, p.67-80, 1998.

RESENDE, M.D.V. de. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999a. p.589-648.

RESENDE, M.D.V. de. Predição de valores genéticos, componentes de variância, delineamentos de cruzamento e estrutura de populações no melhoramento florestal. Curitiba: UFPR, 1999b. 420p. Tese, Doutorado.

RESENDE, M.D.V. de.; DIAS, L.A.S. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de parâmetros genéticos e predição de valores genéticos aditivos e genotípicos em espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, p.44-52, 2000.

REZENDE, G.D.P.S.; BERTOLUCCI, F.L.G. Uso da seleção combinada na determinação da eficiência da seleção precoce em progênies de meios irmãos de *Eucalyptus urophylla*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., Curitiba, 1993. **Anais**. Curitiba: SBS, 1993. p.158-160.

REZENDE, G.D.P.S.; RESENDE, M.D.V. Dominance effects in Eucalyptus grandis, Eucalyptus urophylla and hybrids. In: QFRI/CRC-SPF Symposium. **Hybrid breeding and genetics of forest trees**: proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p.93-100.

ROBERTSON, A. Prediction equations in quantitative genetics. **Biometrics**, v.11, p.95-98, 1955.

SAMPAIO, P.T.B. Variação genética entre procedências e progênies de *Pinus oocarpa*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e *Pinus maximinoi* e métodos de seleção para melhoramento genético. Curitiba: UFPR, 1996. 169p. Tese, Doutorado

SANTOS, P.E.T.; GARCIA, C.H.; MORI, E.S.; MORAES, M.L.T. Potencial para programas de melhoramento, estimativas de parâmetros genéticos e interação progênies x locais em populações de *Eucalyptus urophylla*. **IPEF**, v.33/44, p.11-19, 1990.

SEARLE, S.R.; CASELLA, G.; Mc CULLOCH, C.E. **Variance components**. New York: John Wiley, 1992. 528p.

SHELBOURNE, C.J.A. Interspecific hybrid breeding schemes. In: MEETING RESEARCH WORKING GROUP ON FOREST GENETICS, 12., Camberra, 1993. Camberra: ANU-ACT, 1993. p.92-93.

SHRIKHANDE, V.J. Some considerations in designing experiments on coconut trees. **Journal of the Indian Society of Agricultural Statistics**, v.9, p.82-99, 1957.

SIQUEIRA, E.R. Coeficiente da repetibilidade de produção de frutos de coqueiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.573-574, 1982.

SOH, A.C. Ranking parents by best linear unbiased prediction (BLUP) of breeding values in oil paml. **Euphytica**, v.76, p.13-21, 1994.

SORENSEN, D.A. **Gibbs sampling in quantitative genetics**. Denmark: Danish Institute of Animal Science, Department of Breeding and Genetics, 1996. (International Report, 82).

SOUZA, A.G.C.; SILVA, S.E.L.; SOUZA, N.R. Avaliação de progênies de cupuaçuzeiro *(Theobroma grandiflorum)* em Manaus-AM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.20, p.307-312, 1998.

SOUZA JR., C.L. Comparisons of intra, interpopulation and modified recurrent selection methods. **Brazilian Journal of Genetics**, v.16, p.91-105, 1993.

SOUZA JR., C.L. Recurrent selection and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. **The genetics and exploitation of heterosis in crops**. Madison: ASA, CSSA, 1999. p.247-255.

VALOIS, A.C.C.; CORREA, M.P.F.; VASCONCELLOS, M.E.C. Estudos de caracteres correlacionados com a produção de amêndoa seca no guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.14, p.175-179, 1979.

VALOIS, A.C.C.; NASCIMENTO, J.C. Estimativas de parâmetros genéticos em cacaueiros sem a utilização de testes de progênies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.965-970, 1986.

VAN VLECK, L.D.; POLLAK, E.J.; OLTENACU, E.A.B. **Genetics for the animal sciences**. New York: W.H. Freeman, 1987. 391p.

VAN WYK, G. Early growth results in a diallel progeny test of *Eucalyptus grandis*: 1. A field study. **Silvae Genetica**, v.25, p.126-132, 1976.

VAN WYK, G. Genetic improvement of timber yield and wood quality in *Eucalyptus* grandis: I. Genetic parameters of growth characteristics. **South African Forestry Journal**, v.153, p.1-11, 1990.

VASCONCELLOS, M.E.C.; GONÇALVES, P.S.; PAIVA, J.R.; VALOIS, A.C.C. Métodos de estimação do coeficiente de repetibilidade no melhoramento da seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.433-437, 1985.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486p.

VERRYN, S.; FIELD, C.; GARCIA, J.; GRIFFIN, R. A discussion on the relationship between heritabilities and genetic correlations and the standard errors of these parameters with a case study example of GEI in *E. grandis* over two sites in South Africa and one site in Uruguay. In: IUFRO CONFERENCE. **Silviculture and improvement of eucalypt**: proceedings. Colombo: EMBRAPA, 1997. v.1, p.43-49.

VIGNERON, P. Creation et amelioration de varietes hybrides d'*Eucalyptus* au Congo. In: IUFRO CONGRESS. **Intensive forestry**: the role of *Eucalyptus*. Durban: SAFRI, 1991. p.345-353.

VIGNERON, P. Creation et amelioration de varietes hybrides d'*Eucalyptus* au Congo. **Bois et Forêts des Tropiques**, v.234, p.29-42, 1992.

WEI, X.; BORRALHO, N.M.G. Genetic parameters for growth traits in four-year-old *Eucalyptus urophylla* progeny trial. In: IUFRO CONFERENCE. **Eucalypt plantations**: improving fiber yield and quality; proceedings. Hobart: CRCTHF, 1995. p.252-254.

WHITE, T.L.; HODGE, G. **Predicting breeding values with application in forest tree improvement**. London: Kluwer, 1989. 367p.

WILLIS, M.B. **Dalton's introduction to practical animal breeding**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991. 159p.

WOOLASTON, R.R.; KANOWSKI, P.J.; NIKLES, D.G. Genetic parameters estimates for *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in Coastal Queensland, Australia. **Silvae Genetica**, v.39, p.21-28, 1990.

WRIGHT, J.W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press, 1976. 463p.

15

MELHORAMENTO DE ESPÉCIES NATIVAS

CHARLES R. CLEMENT

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, C.P. 478 - CEP: 69011-970 - Manaus, AM.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos poucos países de 'mega-biodiversidade', ou seja, possui um enorme número de ecossistemas, de espécies que interagem dentro destes ecossistemas, e de alelos que diferenciam os indivíduos em cada população de cada espécie. Algumas destas espécies possuem potencial econômico, o número e potencial sendo limitado apenas pela imaginação humana, pelo número de alelos disponíveis e pelo investimento destinado a transformar uma população num recurso genético. O melhoramento genético é o principal processo que transforma um componente da biodiversidade em um recurso genético e, finalmente, em um produto com valor econômico no mercado[1] moderno. O melhoramento genético é essencial porque é raríssimo encontrar um componente da biodiversidade que pode ser usado diretamente no processo produtivo sem ser transformado para adaptar-se ao processo. Isto não é uma deficiência da biodiversidade; é um requerimento da competitividade do mercado, pois o mercado exige alta qualidade com baixo custo, uma combinação raríssima na natureza.

O processo de melhoramento genético de espécies nativas é similar ao processo para espécies exóticas ou convencionais, mas a ênfase dada a algumas das etapas preliminares é diferente. A prospecção e coleta dos recursos genéticos da espécie alvo são de fundamental importância com espécies nativas por duas razões. Primeiro, a identificação de um acesso com qualidades especiais pode viabilizar o desenvolvimento de um cultivo novo[2] (Arkcoll & Clement, 1989), enquanto que 100 acessos inferiores podem simplesmente ocupar espaço no viveiro. Segundo, não existem coleções de germoplasma em que o melhorista possa encontrar aquele acesso especial, pois até o início de seu programa esta espécie geralmente não terá recebido muita atenção da pesquisa. Mas este capítulo não será sobre prospecção e coleta de recursos genéticos porque existem livros que tratam deste assunto com mais detalhe (por exemplo Guarino *et al.*, 1995).

Neste capítulo serão abordados alguns conceitos básicos que podem orientar o melhorista e ajudar a viabilizar seu programa de desenvolvimento de um cultivo novo com base numa espécie nativa. Definições de domesticação, tanto de populações de plantas como de paisagens, podem nos orientar: a) no planejamento das expedições de prospecção e coleta; b) na decisão sobre o sistema de produção; c) no programa de melhoramento. Em seguida, esta informação será usada para avaliar a conveniência de executar um programa de melhoramento, pois estes programas são caros e de longa duração. Ainda, este capítulo oferece uma lista de espécies de fruteiras nativas com potencial econômico, principalmente da Amazônia (por ser da experiência do autor), mas também do resto do país (embora a lista seja menos completa).

[1]Usarei a palavra 'mercado' como o conceito referente tanto a um conjunto de consumidores como à cadeia de atores que liga os consumidores com os produtores.

[2]Usarei a expressão 'cultivo novo' para se referir a qualquer espécie nativa que não possui um mercado expressivo ao nível regional ou nacional, mesmo que o cultivo seja milenar e tenha sido domesticado pelos primeiros povos das Américas.

Neste capítulo o leitor notará imediatamente a ausência de leguminosas de grão, cereais, forrageiras, laticíferas, oleaginosas, essências madeireiras e muitos outros grupos de espécies nativas com potencial econômico. Muitas dessas espécies serão consideradas por outros autores como partes dos *gene pools* secundários de cultivos mais importantes. Mas as considerações desenvolvidas aqui se aplicam igualmente a qualquer um destes grupos de espécies nativas, tanto se este for tratado como *gene pool* primário quanto secundário.

2. DEFINIÇÕES DE DOMESTICAÇÃO

A domesticação é uma classe de evolução em que humanos adicionam suas ações à ação da seleção natural, às vezes em consonância com esta, às vezes em dissonância. A domesticação tem sido chamada de evolução dirigida e evolução prática (Harlan, 1992), pois a evolução natural melhora a adaptação de uma população a seu meio, mas não às necessidades humanas. Em contraste, a domesticação adapta uma população às necessidades humanas.

Existem dois tipos de domesticação que nos interessarão aqui: a de paisagens e a de plantas. Embora sejam introduzidos como conceitos distintos, estão intimamente ligados. Alguns autores, por exemplo Wiersum (1997), consideram que não existem dois tipos de domesticação, mas sim a co-domesticação de paisagens e cultivos. No entanto, aqui serão considerados, pois a distinção possui algumas conseqüências que serão úteis para nosso planejamento.

2.1 A DOMESTICAÇÃO DE PAISAGENS

Clement (1999) apresentou a seguinte definição da domesticação de paisagens: Um processo inconsciente e consciente em que a intervenção humana na paisagem resulta em mudanças na ecologia da paisagem e na demografia de suas populações de plantas e animais, resultando numa paisagem mais produtiva e 'segura' para humanos. Por ser um processo, a intensidade de intervenção pode variar e é útil definir algumas categorias de paisagens ao longo do contínuo de pristine a cultivada:

Pristine: uma paisagem na qual humanos não têm manipulado o ambiente, nem as populações de plantas ou animais;

Promovida: uma paisagem na qual plantas individuais e/ou populações de plantas úteis são favorecidas por meio de eliminação ou poda de algumas plantas competidoras ou a expansão da transição florestal;

Manejada: uma paisagem na qual a abundância e diversidade de populações de plantas úteis são favorecidas por meio de eliminação de plantas competidoras, expansão da transição florestal, transplante de mudas ou sementes individuais, uso de adubos, e outras formas de reduzir competição ou melhorar o ambiente para melhorar o crescimento e reprodução das plantas desejadas;

Cultivada: uma paisagem totalmente transformada pela eliminação do ecossistema original por meio da derrubada e queima do ecossistema original, aração localizada ou extensiva, gradeação do solo, capina ou roçagem de ervas daninhas, poda, adubação e uso de coberturas mortas ou vivas, irrigação e outras técnicas em qualquer combinação para favorecer o crescimento e reprodução das plantas semeadas;

Roça/capoeira (na linguagem da Amazônia; *swidden / fallow* em inglês): uma paisagem na qual humanos combinam o cultivo e o manejo, nesta ordem. A roça é uma paisagem cultivada, que produz bem durante alguns anos mais se torna cada vez mais difícil de cuidar conforme aumentam as ervas daninhas e diminui a fertilidade; ervas, arbustos e árvores úteis, voluntárias ou transplantadas, são manejadas com intensidade cada vez menor até uma floresta secundária se formar (a capoeira);

Monocultura: uma paisagem cultivada dominada por uma população mono-específica.

2.2 A DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS

Clement (1999) apresentou a seguinte definição da domesticação de plantas: Um processo coevolucionário em que a seleção humana, inconsciente e consciente, nos fenótipos de **populações** de plantas promovidas, manejadas ou cultivadas resulta em mudanças nos genótipos das populações que as tornam mais úteis aos humanos e melhor adaptadas às intervenções humanas no ambiente. A ênfase na palavra **populações** é importante, pois a evolução, a coevolução e a domesticação atuam ao nível de populações, antes de espécies, embora seja comum dizer que uma espécie é domesticada. Em realidade uma espécie só é domesticada se todas suas populações não domesticadas foram extintas, o que é uma situação extremamente rara. Por ser um processo evolucionário, o grau de mudança fenotípica e genotípica na população sujeita a seleção e manejo pode variar e é útil definir algumas categorias de populações ao longo do contínuo de silvestre a domesticada:

Silvestre: uma população naturalmente evoluída cujos genótipos e fenótipos não têm sido modificados pela intervenção humana;

Incidentalmente coevoluída: uma população voluntária que se adapta em ambientes perturbados por humanos, possivelmente sofrendo mudanças genéticas, mas sem seleção ou outra intervenção humana - ervas daninhas (*weeds*);

Incipientemente domesticada: uma população que tem sido modificada pela seleção e intervenção humana (no mínimo sendo promovida), cujo fenótipo médio ainda está dentro da variação encontrada na população silvestre para os caracteres sujeitos à seleção; a variância fenotípica deste médio poderá ser, ou não, menor do que o da população silvestre, mas a seleção começou a reduzir a variância genética;

Semi-domesticada: uma população que tem sido modificada de forma significante pela seleção e intervenção humana (no mínimo sendo manejada), cujo fenótipo médio provavelmente extrapola a variação encontrada na população silvestre para o(s) caráter(es) sujeito(s) à seleção; a variância fenotípica desta média pode ser maior que a da população silvestre porque a variação agora inclui tipos comuns e tipos novos; a variação genética terá sido reduzida ainda mais pela seleção; no entanto, as plantas mantêm suficiente adaptação ecológica para sobreviver no ambiente se a intervenção humana cessar;

Domesticada: uma população similar à anterior, mas cuja adaptação ecológica tem sido reduzida a tal ponto que somente poderá sobreviver em paisagens criadas por humanos, especificamente em paisagens cultivadas ou intensivamente manejadas; a variação genética terá sido reduzida ainda mais pela seleção, especialmente a variação genética responsável pela adaptação ecológica;

Raça primitiva (*landrace* em inglês): um conjunto de populações domesticadas (ou semi-domesticadas) selecionado numa paisagem cultivada numa região geográfica restrita e que apresenta alta variabilidade fenotípica e razoável variabilidade genética, geralmente pela acumulação de genes de outras populações e raças circunvizinhas;

Cultivar moderna: uma população (ou clone) altamente selecionada e modificada que é adaptada exclusivamente às monoculturas intensivas, com reduzida variabilidade fenotípica e genética.

2.3 COMPLEMENTARIEDADE

A complementariedade, ou mesmo interação, entre estes conceitos é evidente (Tabela 1), tanto que os povos tradicionais não distinguem entre domesticação da paisagem e domesticação de plantas – tudo é um processo que melhora a produção de alimentos e outros produtos de subsistência, diversão e artesanato. Como mencionado antes, Wiersum (1997) sugeriu que devemos pensar na co-domesticação de plantas e paisagens, pois as interações são numerosas e importantes. No entanto, existem exemplos de paisagens domesticadas sem plantas domesticadas – por exemplo, as dos Aborigines Australianos. Também, plantas silvestres podem ser cultivadas sem serem domesticadas (Harlan, 1992). Estes são apenas dois exemplos que sugerem que a distinção não é completamente artificial.

Mesmo assim, a complementaridade é tanta que é difícil saber qual tipo de domesticação é mais importante na expressão do fenótipo numa situação específica. A resposta fenotípica de uma planta à domesticação de sua paisagem é imediata em caracteres que apresentam muita plasticidade fenotípica (caracteres que apresentam de baixa a média herdabilidade). Se esta resposta ocorre num caráter de interesse humano, atuará para reforçar o interesse do humano na domesticação da paisagem da planta e na domesticação da população de plantas.

Tão complexa é a complementaridade que é difícil saber o que contribuiu mais para aumentar a produtividade de trigo e arroz durante a Revolução Verde: o melhoramento genético das variedades ou o melhoramento agronômico que ocorreu concomitantemente e permitiu a expressão do potencial genético criado (Simmonds, 1979). A maioria dos melhoristas reconhece que ambos os tipos de melhoramento são necessários para realmente aumentar a produtividade de qualquer cultivo.

TABELA 1. Graus de modificação ao longo do contínuo de domesticação de plantas, com os efeitos de seleção na variação fenotípica e genotípica, e as paisagens a que cada tipo de população está adaptada.

População	Variação		Adaptação
	Fenotípica	Genotípica	ecológica
Silvestre	= silvestre	= silvestre	aos ambientes onde evoluiu naturalmente
Incidentalmente coevoluída	? diferente	? diferente	às paisagens domesticadas
Incipientmente domesticada	< silvestre	< silvestre	às paisagens pristines, promovidas, manejadas e cultivadas
Semi-domesticada	> silvestre	<< silvestre	às paisagens promovidas, manejadas e cultivadas
Domesticada	>> silvestre	<<< silvestre	às paisagens muito manejadas e cultivadas

3. USOS PRÁTICOS DESTAS DEFINIÇÕES

Agora que temos estas definições está claro porque a domesticação é uma classe de evolução e porque o melhoramento genético nada mais é do que a domesticação com um nível de conhecimento e ferramentas mais avançados. Mas as definições têm usos práticos também, usos que podem melhorar a eficiência de um programa de melhoramento.

3.1 USOS NA PROSPECÇÃO E COLETA

O conhecimento do *status* de uma população de uma espécie de interesse no contínuo de domesticação permite o melhor planejamento da prospecção e coleta de seus recursos genéticos. Se as populações da espécie alvo forem silvestres, por exemplo, iniciaremos a coleta de dados biogeográficos no herbário. Em contraste, se a espécie possui populações domesticadas, precisaremos expandir a coleta de dados preliminares para incluir a literatura antropológica. É um fato curioso que a maioria dos botânicos não coletava amostras de plantas domesticadas até recentemente, assim a sua representação na maioria dos herbários é pequena, exceto se o herbário faz parte de uma instituição que considera plantas domesticadas como prioridade.

Este conhecimento também ajuda a definir uma estratégia de amostragem, pois é mais um elemento que afeta a definição desta estratégia, além dos elementos mencionados por Brown & Marshall (1995). De especial importância é a definição da população que será amostrada em um local específico. Se a espécie for silvestre, precisaremos saber mais sobre a adaptação ecológica e a biologia reprodutiva da espécie para poder definir uma população. Se a espécie inclui populações domesticadas, a população humana define a população alvo. Se a espécie inclui tanto populações silvestres como domesticadas numa determinada região, a estratégia precisa ser desenhada para amostrar ambos os tipos de populações.

Quanto maior o grau de domesticação de uma população, menor tende a ser sua variabilidade genética (Tabela 1), exceto no caso de raças primitivas que ainda mantêm uma boa parte de sua diversidade após 500 anos de erosão. Aí, a estratégia de amostragem indicada é amostrar um maior número de populações na esperança de captar mais variabilidade (Brown & Marshall, 1995). Clement *et al.* (1997), por exemplo, demonstraram que existe menos variabilidade genética (visualizada com isoenzimas) dentro de populações mais derivadas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), uma espécie com muitas raças primitivas, do que dentro de populações menos derivadas. O corolário – quanto menor o grau de domesticação, maior a variabilidade – sugere que poderá ser mais eficiente amostrar um pequeno número de populações (bem distribuídas) com mais intensidade. Buckley *et al.* (1988), por exemplo, demonstraram que existe mais variabilidade genética dentro de populações de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.), uma espécie com algumas populações de domesticação incipiente, do que entre populações. Em espécies autógamas, a variabilidade entre populações pode ser maior que dentro delas, mesmo para populações altamente derivadas, de forma que a estratégia seria coletar pouco dentro de muitas populações. Silva Filho *et al.* (1993), por exemplo, mostraram isto em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), uma fruteira herbácea domesticada na Amazônia ocidental.

Uma vez no campo, o mesmo conhecimento ajudará a orientar a coleta, pois a razão benefício/custo de procurar exemplares de populações domesticadas na mata será muito baixa, enquanto a mesma razão será alta nas roças, jardins caseiros e capoeiras manejadas de populações humanas tradicionais. Nos casos em que há interesse por populações domesticadas, é sempre importante entrevistar membros da população humana local para determinar se vale a pena também procurar exemplares de populações silvestres ou incipientemente domesticadas no mesmo local.

3.2 USOS NA DECISÃO SOBRE O SISTEMA DE PRODUÇÃO

Clement & Villachica (1994) discutiram uma conseqüência destas definições e sua complementaridade que nos interessa aqui: embora uma população incipientemente domesticada possa produzir e reproduzir em qualquer paisagem (Tabela 1), uma população domesticada só poderá produzir e reproduzir numa paisagem muito manejada ou cultivada. Esta conseqüência é importante quando desejamos melhorar uma população para um sistema agroflorestal complexo (mais ou menos manejado) ou um sistema de manejo florestal (promovido ou pouco manejado). Não poderemos simplesmente levar uma população domesticada para um sistema de manejo florestal porque esta população não possui a adaptação necessária a este meio. Isto, por sua vez, sugere que poderá haver ideotipos diferentes para diferentes sistemas de produção, como Clement (1986) demonstrou no caso da pupunha em sistemas agroflorestais *versus* em monocultivos.

O outro lado desta moeda é que a identificação de germoplasma para formar a base genética de um programa também poderá se beneficiar do conhecimento sobre as paisagens a que uma determinada população de plantas é adaptada. Uma população adaptada a paisagens promovidas será 'pré-adaptada' para sistemas de manejo florestal, por exemplo, enquanto uma adaptada a paisagens cultivadas será 'pré-adaptada' para a agricultura moderna.

3.3 USOS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO

Quanto maior o grau de domesticação de uma população, melhor a sua adaptação a um sistema de produção intensivo, típico da agricultura moderna. Portanto, o melhorista poderá se concentrar no melhoramento de outras características do ideotipo, facilitando assim o programa e aumentando o ganho genético esperado nos primeiros ciclos de seleção (assumindo que a base genética é suficientemente ampla, logicamente). No caso contrário, o melhorista precisará incluir diversos caracteres de adaptação ao meio no programa, reduzindo assim o ganho esperado, pois quanto maior o número de caracteres selecionados ao mesmo tempo, menor o ganho esperado (Simmonds, 1979).

Resolvidas as questões de adaptação agroecológica, o grau de domesticação também determina a variabilidade fenotípica disponível nos caracteres de interesse econômico para seleção. Quanto maior o grau de domesticação, maior a probabilidade de encontrar caracteres de interesse econômico pronto para uso no mercado. Em contraste, quanto menor o grau de domesticação, menor esta probabilidade, com o corolário de que a prospecção e coleta de recursos genéticos terá de ser maior para permitir a captura de genes e alelos que possam ser combinados para criar o ideotipo desejado pelo mercado.

4. VALE A PENA INICIAR UM PROGRAMA DE MELHORAMENTO?

Qualquer estudante de melhoramento genético não hesitaria em responder afirmativamente a esta pergunta. Mas, será que o afirmativo é sempre válido? Quando examinamos a complementaridade entre a domesticação da paisagem e a de populações de plantas, vemos que as plantas respondem ao manejo da paisagem antes de responderem à seleção. Vimos também que é difícil discriminar o efeito do melhoramento genético do efeito do melhoramento agronômico na agricultura moderna. Ambos contribuem para o aumento de produtividade e qualidade agrícola. Portanto, não é possível determinar *a priori* se vale a pena iniciar um programa de melhoramento.

Quando tratamos de uma espécie nativa que ainda não possui expressão econômica, esta pergunta precisa ser respondida com cuidado. A razão principal deste cuidado é que um programa de melhoramento genético, com suas coleções de germoplasma associadas, é uma atividade cara e de longa duração. Portanto, nesta seção examinaremos algumas das perguntas que precisam ser respondidas antes de decidir iniciar um programa de melhoramento genético. Palmer (1994) examinou este assunto no caso de essências florestais e algumas das perguntas são similares nos dois casos. Vale ressaltar que se as respostas são negativas, isto não quer dizer que não devemos desenvolver o cultivo novo, somente que o momento não é oportuno para justificar um programa de melhoramento genético. Por exemplo, o desenvolvimento do cultivo da pupunha para a produção de palmito está ocorrendo sem que instituições públicas ou empresas tenham criado variedades de pupunha apropriadas para as diversas regiões produtoras (Clement, 1997).

Hoje a palavra 'mercado' é ouvida em toda parte, especialmente na pesquisa agrícola, que, aliás, já está sendo tratada como pesquisa para apoiar o agronegócio. Num país como o Brasil, onde os governos gastam muito menos que deveriam na pesquisa e desenvolvimento, é fundamental usar o mercado para orientar a pesquisa (Portugal, 1998), pois esta orientação possui o potencial de aumentar a rapidez de resposta de um programa de desenvolvimento de um cultivo novo. Quanto mais rápido o retorno ao investimento, mais facil será convencer o financiador a investir mais, que, por sua vez, garantirá a continuidade do programa. No entanto, a avaliação do mercado para determinar se um programa de melhoramento genético se justifica não faz parte dos currículos escolares no Brasil, nem no mundo. Portanto, traçarei alguns dos passos que são fundamentais aqui.

4.1 AVALIANDO O MERCADO

O primeiro passo é avaliar a demanda objetiva para o produto de seu cultivo novo entre os consumidores alvos, pois se eles não concordarem em comprar, não teremos mercado. Enfatizo a palavra 'objetiva' porque não basta a opinião do melhorista, que é muitas vezes um entusiasta da espécie. Normalmente o melhorista precisará de ajuda de economistas e sociólogos para fazer isto, mas é o melhorista que dará a orientação aos cientistas sociais. No entanto, é possível fazer sua própria pesquisa de mercado (Fletcher, 1998).

Outra vez nossa definição de domesticação é útil, pois se o cultivo possui populações domesticadas isto garante que tem demanda para o produto pelo menos

nos locais onde o cultivo é tradicional. Esta situação é muito comum na Amazônia. Se o cultivo novo possui apenas populações silvestres, a demanda ainda poderá existir, mas em geral será menor e muito mais restrita geograficamente. Se o cultivo novo não possui demanda, mas possui uma característica especial, a demanda poderá ser criada. Afinal, um mercado não se cria, um mercado é criado por humanos. No entanto, para quem pretende desenvolver um mercado para um cultivo novo, o programa de melhoramento provavelmente não é o lugar para começar.

Identificada a demanda, é importante tentar quantificar este mercado, tanto em termos de valor (R$) como em termos do produto consumido local e regionalmente. Além de quantificar, é importante avaliar a história deste mercado: está em expansão ou declínio? Se está em declínio, é importante descobrir por que e tentar determinar se será possivel reverter esta situação. Se está em expansão, é igualmente importante tentar descobrir por que, pois esta resposta poderá ajudar a justificar o programa de melhoramento. Tanto a quantificação como as tendências são importantes para avaliar a razão benefício/custo de iniciar um programa de melhoramento.

4.2 AVALIANDO A CADEIA DE PRODUÇÃO

Se existe demanda, existe uma cadeia de produção que precisa ser avaliada (Portugal, 1998). A avaliação desta cadeia poderia determinar se é mais importante melhorar a genética ou o manejo do cultivo; poderia também determinar se é mais importante melhorar a transformação ou a comercialização primeiro, e neste caso não vale a pena começar um programa de melhoramento ainda.

Uma análise criteriosa da parte produtiva da cadeia permitirá determinar se o consumo é limitado pela quantidade ou pela qualidade da oferta. No primeiro caso, melhorias no manejo podem remover a limitação, embora estas melhorias finalmente serão limitadas pelo potencial produtivo do cultivo novo, que somente pode ser aumentado pelo melhoramento. No segundo caso, algum tipo de melhoramento poderá ser indicado para aumentar ou uniformizar a qualidade do produto entregue ao consumidor.

4.3 CRIANDO UM IDEOTIPO PRELIMINAR

Uma vez detectado um ponto crítico na cadeia de produção onde o melhoramento genético poderá ser útil, é importante refinar esta análise para desenvolver um ideotipo preliminar para o cultivo que resolverá a(s) limitação(ões) detectada(s). Um ideotipo é um modelo que o melhorista usa para organizar suas idéias sobre como a população melhorada será quando estiver pronta para ser colocada no mercado e inclui componentes biológicos, agronômicos, tecnológicos e comerciais (Donald, 1962; 1968). O desenho de um ideotipo factível e orientado ao mercado é um dos passos mais fundamentais na sequência de decisões e ações que antecedem um programa de melhoramento (Palmer, 1994). No entanto, quanto mais complexo o ideotipo, mas lento será o ganho genético no programa de melhoramento (Simmonds, 1979), de forma que é importante lembrar que o ideotipo é apenas um modelo – não exige que todos os componentes sejam usados como critérios de seleção.

Outra vez a informação sobre o grau de domesticação e a variabilidade disponível nas populações silvestres e domesticadas são úteis e poderão ajudar a

desenvolver o ideotipo preliminar. A variação nas populações domesticadas mostrará o que já foi feito pelos primeiros povos americanos e, portanto, o que é possível com alguma facilidade. Quando esta variação é comparada com a variação nas populações silvestres dará uma idéia das modificações já feitas na sua adaptação agroecológica também, que, por sua vez, podem indicar formas de melhorar o manejo do cultivo.

Com uma avaliação preliminar da demanda, a cadeia de produção e um ideotipo desenvolvido para orientar o programa de melhoramento, o melhorista terá uma idéia clara sobre o possível valor socioeconômico de seu programa de melhoramento, bem como o trabalho que tem pela frente. Aí vem diversos passos desenhados para avaliar os custos inerentes ao programa pretendido.

4.4 AVALIANDO O CUSTO DE PROSPECÇÃO E COLETA

O ideotipo define "o que" precisamos procurar, e nosso conhecimento sobre a biogeografia e o grau de domesticação de populações na espécie definem "onde" precisamos realizar nossa prospecção. Em geral, quanto menor o grau de domesticação das populações alvos, menor a chance de encontrar aquele acesso com qualidades especiais (Arkcoll & Clement, 1989) e, portanto, maior o esforço de prospecção e coleta necessário para encontrá-lo. Também, quanto maior o grau de domesticação e a importância do cultivo aos primeiros povos americanos, tanto maior será sua distribuição geográfica, embora poderá ser necessário coletar pouca desta variabilidade para obter amostras que representam o ideotipo. As variáveis são numerosas e precisam ser avaliadas antes de iniciar a prospecção e coleta. Veja Guarino *et al.* (1995) para detalhes sobre o planejamento de expedições de coleta, que permitem estimar seus custos.

4.5 AVALIANDO O CUSTO DE MANTER, CARACTERIZAR E AVALIAR GERMOPLASMA

Os custos envolvidos com a manutenção, caracterização e avaliação do germoplasma coletado são muito maiores que os custos de prospecção e coleta, pois são de longa duração e requerem mão-de-obra especializada durante este período. Este custo é uma das razões que uma grande parte das coleções de germoplasma do mundo inteiro seja subutilizada (Food and Agriculture Organization, 1996). Se estas ações não são feitas, as coleções não poderão ser usadas pelo melhorista.

A informação sobre o esforço de prospecção e coleta gerada na subseção anterior permite uma primeira estimação dos custos de manutenção, caracterização e avaliação. Um esforço de prospecção 'x' deverá permitir a coleta de 'y' acessos. Já que sempre ocorre um perda 'z' de acessos no viveiro, por falta de germinação ou gemas que morrem em transporte etc, a coleção de germoplasma terá 'y' - 'z' acessos. Se a espécie é uma fruteira lenhosa, alógama e sementes foram coletadas, precisará de 'n' indivíduos para representar o acesso no campo ('n' pode ser calculado com base no coeficiente de variação observado em cada população *in situ* usando a fórmula 'n' = $(0,16)CV^2$; Pound, 1931; outras referências estatísticas também apresentam fórmulas similares). Se gemas ou estacas foram coletadas, cada acesso pode ser representado por 5 indivíduos. Aí, o tamanho do banco de germoplasma será (y - z) na, onde 'n' é o número estimado segundo Pound (1931) ou 5, e 'a' é a área necessária para cada planta desenvolver e frutificar normalmente.

Os custos de manter esta coleção são facilmente estimados a partir de seu tamanho, lembrando que estes custos precisam ser multiplicados pelo número de anos de vida útil das plantas na coleção, exceto se existirem meios de conservação de sementes, tecidos, pólen etc. Se existe uma lista de descritores para esta espécie nativa, que é difícil, o custo de caracterização pode ser estimado diretamente; se não existe, que é mais comum, o custo precisa incluir o custo de desenvolver a lista de descritores a partir do ideotipo completo. Os custos de avaliação poderão ser menores que os de caracterização num determinado ano, mas precisam ser multiplicados pelo número de anos necessários para ter uma boa estimativa da produtividade anual de cada acesso e as variações temporais na qualidade de seu produto.

4.6 AVALIANDO O CUSTO DE SELEÇÃO

Em fruteiras lenhosas, a identificação de um genótipo especial poderá ser suficiente para viabilizar o desenvolvimento preliminar do cultivo novo, como mencionado por Arkcoll & Clement (1989). No entanto, o mais comum é que um número variável de acessos ou plantas dentro destes apresentarão características mais ou menos próximas ao ideotipo. Outra vez, o grau de domesticação e um conhecimento prévio sobre a variabilidade existente poderão ajudar a avaliar a probabilidade de encontrar um número 'x' de acessos ou indivíduos promissores. Aí inicia o processo de ensaio de clones, ou inicia um processo de hibridização seguido de ensaio de progênies, que permitirá selecionar os melhores clones ou progênies para multiplicação e distribuição. Ambos os processos têm custos associados que são relativamente fáceis de estimar.

4.7 AVALIANDO A RAZÃO BENEFÍCIO/CUSTO

Juntando os custos de prospecção, manutenção e seleção estimados nas subseções anteriores é possível estimar o custo do programa de melhoramento. Este custo pode ser comparado com o benefício esperado com o uso dos resultados do programa de melhoramento. O benefício esperado vem da quantificação do mercado em função do ponto crítico na cadeia de produção que o melhoramento genético pretende modificar. Logicamente, ambos precisam ser projetados para o futuro, o que faz com que esta avaliação da razão benefício/custo seja apenas uma aproximação.

Um exemplo, parcialmente histórico e parcialmente fictício, ajudará a compreensão do funcionamento desta análise. Neste exemplo, somente os custos principais são considerados, que seguramente resulta numa subestimação dos custos. Assumirei que esta subestimação é de 25%, só para tornar a estimativa mais real. Um resumo deste exemplo é apresentado na Tabela 2.

O desenvolvimento da pupunha no Brasil começou no final da década de 1970. Em 1983-84, foi executada uma prospecção e coleta em toda a bacia amazônica (Clement & Coradin, 1988), que resultou na coleta de 385 acessos, dos quais 200 foram plantados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Pupunha) em Manaus. As expedições custaram US$120.000 na época. Como resultado de outras coleções ocasionais, o banco de germoplasma apresentava 455 acessos em 1999. Podemos assumir que os outros 255 acessos custaram US$153.000 para serem colocados no banco, baseado no custo dos primeiros 200. Portanto, a fase de prospecção e coleta custou um mínimo de US$273.000.

TABELA 2. Resumo de um exemplo dos cálculos da razão benefício/custo de um programa de melhoramento genético de pupunha (*Bactris gasipaes*) para produção de palmito, incluindo (A) estimativas de custos de uma coleção de germoplasma de pupunha e do programa de melhoramento associado, (B) custos de continuidade durante a adoção da tecnologia, e (C) estimativas dos benefícios esperados após 10 anos. [em US$].

A. Componentes de custo (histórico - 1979-1999)	Valor Anual	Valor Total
Coletar germoplasma (455 acessos)		273.000
Manter o BAG-Pupunha com 11 ha (1979-1999)	7.100	142.000
Caracterizar e avaliar 455 acessos (5 anos)		35.500
Criar, manter, estudar 2 x 100 progênies (5 anos/cada)		36.400
Salário: melhorista (2.200/mês) (20 anos)	26.400	528.000
Subtotal histórico + 25% para outros custos eventuais		1.268.625
B. Componentes de custo (continuidade - 1999-2009)		
Manter o BAG - Pupunha	7.100	71.000
Criar, manter e estudar 2 x 100 progênies (5 anos/cada)		36.400
Salário: melhorista (2.200/mês) (10 anos)	26.400	264.000
Subtotal continuidade + 25% para outros custos eventuais		464.250
Total de custos		1.732.875
C. Componentes de benefício (adoção - 1999-2009)		
Incremento/ha (250 kg @ 5/kg) c/1000 ha/ano/10 anos	1.250.000	12.500.000
Razão Benefício/Custo		7,2

O banco de germoplasma contém ao redor de 3.350 plantas, ocupando uma área de 11 ha. Esta área requer três limpezas por ano, a US$215/ha/vez, ou seja US$7.100/ano, quando terceirizadas. Desde sua criação em 1979, o BAG recebe esta manutenção, o que equivale a US$142.000 ao longo do período.

A caracterização morfológica e a avaliação produtiva requer uma equipe de quatro auxiliares de campo (salário US$430/mês) e um técnico (salário US$650/mês), trabalhando 5 dias por semana durante os três meses da safra principal. A caracterização custa, só de mão-de-obra, US$7.100/ano, e leva 5 anos para ser concluída, o que equivale a US$35.500. No caso da pupunha, a avaliação é concomitante à caracterização.

Agora vem o mercado, sua demanda, e o ponto crítico da cadeia de produção em que o melhoramento intervirá para gerar um benefício. Estima-se (ABRAPALM, 1999 - Comunicação pessoal) que o Brasil consumiu ao redor de 60.000 t de palmito em 1998, com um valor de US$300 milhões (assumindo US$5.00/kg no atacado). O palmito de pupunha representa aproximadamente 10% deste, pois existem mais de 6000 ha em produção (Bovi, 1997), cada hectare produzindo uma tonelada. Acredita-se que a expansão do cultivo ocorrerá à taxa de pelo menos 1.000 ha ano^{-1} durante os próximos 10 anos e que esta taxa é limitada pela quantidade e qualidade das sementes disponíveis no mercado (Bovi, 1997). Esta demanda para sementes de boa qualidade é o ponto crítico.

As sementes disponíveis no mercado hoje são oriundas de populações cultivadas de pupunha no Peru, principalmente a população híbrida de Yurimaguas, com genes das raças primitivas Pampa Hermosa e Putumayo (Clement, 1997). Na Amazônia, este

germoplasma apresenta um potencial de produção de ±1.000 kg ha^{-1} de palmito tipo exportação. Clement (1995) estimou que a herdabilidade do peso do palmito era perto de zero, mas que a herdabilidade da taxa de crescimento relativo (um dos principais componentes da produtividade) era ao redor de 49%, permitindo um ganho de 12,3% por ciclo de seleção. Estima-se, portanto, que um programa de melhoramento poderá aumentar a produção de palmito por hectare em 25% em dois ciclos (10 anos) simplesmente via o crescimento mais rápido das plantas.

Não existe um método confiável de propagação vegetativa de pupunha, de forma que é necessário criar híbridos entre plantas selecionadas ou praticar seleção massal e instalar um ensaio de progênies, seguindo o modelo do dendê (*Elaeis guineensis*; Hartley, 1977). Em 1988, uma série de 500 hibridações foram feitas visando um ideotipo para a produção de palmito, requerendo uma equipe similar à usada na caracterização e por um tempo similar (3 meses = US$7.100). Se um ensaio de progênies tivesse sido instalado (o que não aconteceu por causa da inflação explosiva de 1989), pelo menos 100 progênies, com três replicas de 20 plantas cada, seriam plantadas a uma densidade de 5000 plantas ha^{-1}, ocupando uma área de 1,2 ha. Esta área requeriria três limpezas por ano, a US$215/ha/vez = US$775; a vida útil do ensaio seria cinco anos, equivalente a US$3.850. A caracterização morfológica e a avaliação produtiva requeriria uma equipe de dois auxiliares de campo (salário US$430/mês) e um técnico (salário US$650/mês), trabalhando 3 dias por mês durante quatro anos, equivalente a US$7.250. Portanto, a fase de seleção e avaliação de um ensaio custaria ao redor de US$18.200 e poderá ter dois ensaios no período, o que equivale a US$36.400.

O salário do melhorista precisa ser adicionado a estes custos: US$2.200/mês durante 20 anos é equivalente a US$528.000. Com isto, o custo mínimo total do projeto seria ao redor de US$1.015.000. Na realidade, uma instituição pública provavelmente pagaria o salário do melhorista, permitindo o repasse deste custo para a sociedade em geral, deixando o programa com o custo mínimo de US$487.000. Adicionando os 25% devido à subestimação, o custo total (com salário) seria ao redor de US$1.270.000.

Todos os cálculos até aqui são considerados históricos, pois o germoplasma foi coletado, mantido, caracterizado, avaliado e usado para criar dois ensaios de progênies que são os frutos do programa. Agora é necessário calcular os custos da continuidade do programa, pois o programa deverá continuar gerando resultados uma vez que seus resultados estão sendo adotados. Estes custos se referem a manutenção do BAG (US$71.000), mais dois ensaios de progênies (US$18.200/cada) e o salário do melhorista (US$264.000 ao longo dos 10 anos), o que equivale a US$371.400. Adicionado os 25% devido à subestimação, o custo total da continuidade é ao redor de US$464.000.

Agora podemos fazer a projeção da razão benefício/custo que este programa gerará a partir de 10 anos no futuro. Assumiremos que a área plantada com pupunha continuirá se expandindo a uma taxa de 1.000 ha ano^{-1}, toda plantada com pupunheiras que produzem 1.250 kg ha^{-1} em lugar de 1.000 kg ha^{-1}. Em 10 anos, teremos 10.000 ha produzindo 12.500 t, com um valor de US$62,5 milhões. A diferença entre a produção com e sem o programa de melhoramento é US$12,5

milhões naquele ano, que é o benefício que pode ser atribuido ao programa. A razão benefício/custo seria 7,2:1, ou seja, para cada dólar investido no programa de melhoramento genético de pupunha para palmito haverá um retorno de 7,2 dólares na produção nacional. Mesmo com a falta de especialização em economia de seu autor, este programa se justifica.

Mais uma dose de realismo precisa ser introduzida: hoje no Brasil existem pelo menos quatro programas de melhoramento de pupunha em andamento – INPA, IAC, Embrapa Acre e Embrapa Amapá (Clement & Bovi, 1999) e muitos grupos planejando iniciar outros. O que acontecerá com a razão benefício/custo quando incluímos estes outros programas? Logicamente baixará, pois os benefícios serão os mesmos e os custos aumentarão. Esta dose de realismo aponta um fato curioso sobre o desenvolvimento de cultivos novos no Brasil (e provavelmente no mundo): logo que um cultivo novo começa a ganhar espaço no mercado, muitos pesquisadores correm para apoiá-lo, deixando de lado outros cultivos que poderiam possuir tanto ou mais potencial! Para a sociedade, a razão B/C de cultivo 'a' baixa enquanto a oportunidade de desenvolver outros cultivos é ignorada (pelo menos temporariamente). Este fato deveria ser lembrado também quando o pesquisador está planejando desenvolver uma espécie nativa.

A razão benefício/custo é apenas parte da justificativa, especialmente por ser uma projeção sobre o futuro. Igualmente importante são as demandas da sociedade atual, a estrutura da instituição anfitriã do programa e a disponibilidade de recursos humanos e financeiros para iniciar e manter o programa até que este possa mostrar os ganhos esperados. Estes últimos dois itens são importantíssimos, pois são uma medida do compromisso institucional, sem o qual poderá haver descontinuidades no programa que o prejudicam ou mesmo o inviabilizam. Um programa de melhoramento requer muito planejamento, tanto político e econômico, como científico.

4.8 SE A RAZÃO B/C NÃO JUSTIFICA?

Com um cultivo novo é mais provável que a razão B/C seja pequena demais, pois o mercado é pequeno e o intervalo entre a coleta de germoplasma e os frutos do programa de melhoramento será grande. Assim existem duas opções válidas: a) esperar a expansão do mercado para poder justificar um programa de melhoramento genético convencional; b) partir para o melhoramento participativo, feito em parceria com produtores ou empresas, pois este tipo de programa terá custos menores. A literatura sobre o melhoramento participativo está em franca expansão, pois os benefícios são os mesmos e os custos são menores. O IPGRI tem sido ativo na divulgação deste tipo de melhoramento, p.ex. Eyzaguirre & Iwanaga (1996) e Heide *et al.* (1996).

5. FRUTEIRAS NATIVAS COM POTENCIAL ECONÔMICO

O Brasil é especialmente rico em espécies frutíferas nativas que possuem potencial para serem transformadas em fruteiras de expressão econômica. O abacaxi (*Ananas comosus*) é a fruteira nativa mais importante ao nível mundial. Nesta seção, apresentarei diversas listas de espécies frutíferas nativas e mencionarei as que estão recebendo alguma atenção de pesquisa. Por conveniência, dividirei o Brasil em quatro regiões: a Amazônia, o nordeste, os cerrados, e o sul e sudeste. Embora sejam mais

geopolíticas que naturais, permitem uma certa organização. Não tenho pretensão de ser exaustivo nestas listas, pois conheço a Amazônia um pouco e o resto do país de visitas.

5.1 AMAZÔNIA

Listas de espécies frutíferas nativas da Amazônia que apresentavam algum grau de domesticação na época do contato europeu (1500 D.C.) foram elaboradas recentemente por Clement (1999). As listas incluíram outras espécies com uso econômico também que não estão relacionadas aqui.

A lista de fruteiras domesticadas contém 13 espécies (Tabela 3). Desta lista, a graviola (*A. muricata*), urucum (*B. orellana*), pupunha (*B. gasipaes*), maracujá (*P. edulis*), guaraná (*P. cupana*) e cubiu (*S. sessiliflorum*) estão recebendo alguma atenção da pesquisa, ou seja, 54% das fruteiras domesticadas na Amazônia não estão recebendo atenção. Isto não é falta de potencial, pois todas têm mercados locais e regionais; é falta de imaginação empresarial e investimento na pesquisa e desenvolvimento.

A lista de espécies frutícolas semi-domesticadas contém 20 espécies (Tabela 4). Desta lista, bacuri (*P. insignis*), ingá cipó (*I. edulis*), araçá-boi (*E. stipitata*), e cacao (*T. cacao*) estão recebendo alguma atenção da pesquisa, ou seja, 80% destas

TABELA 3. Espécies frutíferas nativas da Amazônia ou do norte da América do Sul que provavelmente foram domesticadas na época de contato.

Espécie, Família	Espécie, Família
Annona muricata, Anonaceae	*Passiflora edulis*, Passifloraceae
Rollinia mucosa, Anonaceae	*P. quadrangularis*, Passifloraceae
Crescentia cujete, Bignoniaceae	*Genipa americana*, Rubiaceae
Bixa orellana, Bixaceae	*Paullinia cupana*, Sapindaceae
Poraqueiba paraensis, Icacinaceae	*Pouteria caimito*, Sapotaceae
P. sericea, Icacinaceae	*Solanum sessiliflorum*,Solanaceae
Bactris gasipaes, Palmae	

Fonte: Clement (1999)

TABELA 4. Espécies frutíferas nativas da Amazônia e do norte da América do Sul que provavelmente foram semi-domesticadas na época de contato.

Espécie, Família	Espécie, Família
Spondias mombin, Anacardiaceae	*Bunchosia armeniaca*, Malpighiaceae
Annona montana, Anonaceae	*Pourouma cecropiifolia*, Moraceae
Macoubea witotorum, Apocynaceae	*Eugenia stipitata*, Myrtaceae
Quararibea cordata, Bombacaceae	*Astrocaryum aculeatum*, Palmae
Couepia subcordata, Chrysobalanaceae	*Borojoa sorbilis*, Rubiaceae
Platonia insignis, Guttiferae	*Paullinia yoco*, Sapindaceae
Cassia leiandra, Leg. Caesalpinoidae	*Pouteria macrocarpa*, Saporaceae
Inga cinnamomea Leg. Mimosoidae	*P. macrophylla*, Saporaceae
I. edulis, Leg. Mimosoidae	*Theobroma bicolor*, Sterculiaceae
I. macrophylla, Leg. Mimosoidae	*T. cacao*, Sterculiaceae

Fonte: Clement (1999)

espécies frutícolas não estão recebendo atenção, embora todas têm mercados locais e até regionais na Amazônia.

A lista de espécies frutícolas incipientemente domesticadas contém 38 espécies (Tabela 5). Desta lista, castanha-do-Pará (*B. excelsa*), caiaué (*E. oleifera*), açaí-do-Pará (*E. oleracea*), patauá (*J. bataua*) e cupuaçu (*T. grandiflorum*) estão recebendo alguma atenção da pesquisa, ou seja, 87% destas espécies frutícolas não estão recebendo atenção, embora todas tenham mercados locais e até regionais na Amazônia.

A lista de espécies frutíferas silvestres é enorme e não é de meu conhecimento se existe alguém tentando enumerar todas as espécies brasileiras. As famílias Myrtaceae e Sapotaceae contêm uma abundância de espécies frutíferas que são usadas ocasionalmente pela população da Amazônia, porém, raramente ou nunca são cultivadas. A única espécie frutífera silvestre que está recebendo a atenção da pesquisa é o camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae).

5.2 NORDESTE

A lista de espécies do Nordeste é certamente maior que a lista apresentada por Giacometti (1993), mas serve para introduzir esta riqueza (Tabela 6). Desta lista, duas espécies possuem grande importância econômica, cajú (*A. occidentale*) e goiaba (*P. guajava*), e duas possuem importânica na região, cajá (*S. lutea*) e imbú (*S. tuberosa*); estas quatro espécies estão recebendo a atenção da pesquisa também.

5.3 CERRADO

A lista de espécies do Cerrado é certamente maior que a lista apresentada por Giacometti (1993), mas serve para introduzir esta riqueza também (Tabela 7). Desta

TABELA 5. Espécies frutíferas nativas da Amazônia e do norte da América do Sul que provavelmente foram incipientemente domesticadas na época de contato.

Espécie, Família	Espécie, Família
Couma utilis, Apocynaceae	*Acrocomia aculeata*, Palmae
Caryocar glabrum, Caryocaraceae	*Astrocaryum murumuru*, Palmae
C. villosum, Caryocaraceae	*Elaeis oleifera*, Palmae
Chrysobalanus icaco, Chrysobalanaceae	*Euterpe oleracea*, Palmae
Couepia bracteosa, Chrysobalanaceae	*Jessenia bataua*, Palmae
C. edulis, Chrysobalanaceae	*Mauritia flexuosa*, Palmae
C. longipendula, Chrysobalanaceae	*Maximiliana maripa*, Palmae
Caryodendron orinocense, Euphorbiaceae	*Oenocarpus bacaba*, Palmae
Rheedia brasiliensis, Guttiferae	*O. distichus*, Palmae
R. macrophylla, Guttiferae	*Alibertia edulis*, Rubiaceae
Bertholletia excelsa, Lecythidaceae	*Talisia esculenta*, Sapindaceae
Lecythis pisonis, Lecythidaceae	*Manilkara huberi*, Sapotaceae
Gries neubertii, Lecythidaceae	*Pouteria* spp., Sapotaceae
G. peruviana, Lecythidaceae	*Sterculia speciosa*, Sterculiaceae
Hymenaea courbaril, Leg. Caesalpinioidae	*Theobroma grandiflorum*, Sterculi
Campsiandra comosa, Leg. Mimosoidae	*T. speciosum*, Sterculiaceae
Inga spp. (numerous), Leg. Mimosoidae	*T. subincanum*, Sterculiaceae
Psidium acutangulum, Myrtaceae	*Erisma japura*, Vochysiacea
P. guineensis, Myrtaceae	

Fonte: Clement (1999)

lista, o abacaxi possui grande importância econômica, e quatro outras espécies estão recebendo a atenção da pesquisa, piqui (*C. brasiliense*), baru (*D. alata*), cagaita (*E. dysenterica*) e pera-do-cerrado (*E. klotzschiana*).

5.4 SUL E SUDESTE

A lista de Giacometti (1993) para o Sul e Sudeste do Brasil (Tabela 8) é certamente uma subestimação da riqueza presente. O interessante é o grande número de espécies da família Myrtaceae, uma da qual é economicamente importante, jabuticaba (*M. jabuticaba*). A goiaba serrana (*F. sellowiana*) está recebendo a atenção da pesquisa na Nova Zelândia e a araçá amarela (*P. cattleyanum*) está recebendo alguma atenção no Sul.

TABELA 6. Espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil.

Espécie, Família	Espécie, Família
Anacardium occidentale, Anacardiaceae	*Eugenia uniflora*, Myrtaceae
Spondias lutea, Anacardiaceae	*Psidium guajava*, Myrtaceae
S. tuberosa, Anacardiaceae	*P. guineensis*, Myrtaceae
Annona salzmanii, Anonaceae	*Syagrus coronata*, Palmae
Hancornia speciosa, Apocynaceae	*S. oleracea*, Palmae
Jacaratia dodecaphylla, Caricaceae	*Ziziphus joazeiro*, Ramnaceae
Caryocar coriaceum, Caryocaraceae	*Chrysophyllum rufum*, Sapotaceae
Byrsonima cydoniaefolia, Malpighiaceae	*C. ebenacea*, Sapotaceae
B. sericea, Malpighiaceae	

Fonte: Giacometti (1993)

TABELA 7. Espécies frutíferas nativas do cerrado do Brasil.

Espécie, Família	Espécie, Família
Anacardium humile, Anacardiaceae	*Dipterix alata*, Leg. Papilionoideae
A. nanum, Anacardiaceae	*Byrsonima verbascifolia*, Malpighiaceae
Annona coriacea, Anonaceae	*Eugenia dysenterica*, Myrtaceae
A. crassifolia, Anonaceae	*E. klotzschiana*, Myrtaceae
Ananas comosus, Bromeliaceae	*Acrocomia totai*, Palmae
Caryocar brasiliense, Caryocaraceae	*Alibertia humilis*, Rubiaceae
Rheedia gardneriana, Guttiferae	*Pouteria torta*, Sapotaceae

Fonte: Giacometti (1993)

TABELA 8. Espécies frutíferas nativas do Sul e Sudeste.

Espécie, Família	Espécie, Família
Campomanesia guabiroba, Myrtaceae	*Myrciaria jabuticaba*, Myrtaceae
Eugenia brasiliensis, Myrtaceae	*Psidium cattleyanum*, Myrtaceae
E. involucrata, Myrtaceae	*Butia capitata*, Palmae
E. uvalha, Myrtaceae	*Rubus brasiliensis*, Rubiaceae
Feijoa sellowiana, Myrtaceae	

Fonte: Giacometti (1993)

Embora as Tabelas 3 a 8 contenham mais de 100 espécies, é provável que existam outras tantas com potencial. É uma riqueza natural enorme que está deixando de gerar desenvolvimento agrícola para o país. Pior ainda, todas estas espécies, inclusive as mais importantes, estão sofrendo erosão genética (Clement, 1999). É comum ouvir que a utilização é uma maneira de promover a conservação (Food and Agriculture Organization, 1996), mas isto é apenas parcialmente verdadeiro, pois o mercado não paga para conservação, apenas permite que o usuário consciente justifique um preço um pouco maior por causa da conservação. Se o custo de conservação for muito alto, o mercado não aceitará pagá-lo. Isto é uma grande preocupação para o melhorista. Mesmo assim, existem muitos melhoristas que são ferrenhos defensores do sistema econômico vigente.

O desenvolvimento de cultivos novos é uma forma de utilizar esta riqueza natural antes que desapareça. Mas o melhorista não pode atuar só, precisa ter o apoio da sociedade para justificar a conservação a longo prazo. Mais importante, é preciso ter o apoio dos setores da sociedade que mais atuam no mercado, os produtores e empresários das cadeias de produção de fruteiras no Brasil. Sem que este setor exija ação das instituições e do governo, e concorde em ajudar pagar os custos destas ações, a riqueza natural continuará a erodir sem proveito para a sociedade brasileira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Hiroshi Noda pela revisão crítica do manuscrito e as sugestões oferecidas e à Sra. Rosa Clement pela correção do português. Erros de fato e interpretação são de responsibilidade do autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARKCOLL, D.B.; CLEMENT, C.R. Potential new food crops from the Amazon. In: WICKENS, G.; HAQ, N.; DAY, P. (Ed.) **New crops for food and industry**. New York: Chapman & Hall, 1989. p.150-165.

BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.183-185, 1997. Suplemento.

BROWN, A.H.D.; MARSHALL, D.R. A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. **Collecting plant genetic resources**: technical guidelines. Wallingford: CAB International, 1995. p.75-92.

BUCKLEY, D.P.; O'MALLEY, D.M.; APSIT, V.; PRANCE, G.T.; BAWA, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.): Lecythidaceae): I. Genetic variation in natural populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.923-928, 1988.

CLEMENT, C.R. The pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) as an agroforestry component. **Agroforestry Systems**, v.4, p.205-219, 1986.

CLEMENT, C.R. Growth and genetic analysis of pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) in Hawaii. Honolulu: University of Hawaii, 1995. 221p. Thesis, Ph.D.

CLEMENT, C.R. Pupunha: recursos genéticos, pesquisas realizadas e tecnologias disponíveis. In: WORKSHOP SOBRE AS CULTURAS DE CUPUAÇU E PUPUNHA NA AMAZÔNIA, 1., Manaus, 1997. **Anais**. Manaus: EMBRAPA, CPAA, 1997. p.33-49.

CLEMENT, C.R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources: I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v.53, p.188-202, 1999.

CLEMENT, C.R.; BOVI, M.L.A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. In: SEMINÁRIO DO AGRONEGÓCIO PALMITO DE PUPUNHA NA AMAZÔNIA, 1., Porto Velho, 1999. **Anais**. Porto Velho: EMBRAPA, CPAF, 1999. p.57-70. (Documentos, 41).

CLEMENT, C.R.; CORADIN, L. (Ed.) **Peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) germplasm bank; Final report**. Manaus: INPA, 1988. (U.S. Agency for International Development, Grant number DAN-5542-G-SS-2093-00).

CLEMENT, C.R.; VILLACHICA, H. Amazonian fruits and nuts: potential for domestication in various agroecosystems. In: LEAKEY, R.R.B.; NEWTON, A.C. (Ed.) **Tropical trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources**. London: HMSO, 1994. p.230-238.

CLEMENT, C.R.; ARADHYA, M.K.; MANSHARDT, R.M. Allozyme variation in spineless pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae). **Economic Botany**, v.51, p.149-157, 1997.

DONALD, C.M. In search of yield. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.10, p.171-178, 1962.

DONALD, C.M. The breeding of crop ideotypes. **Euphytica**, v.17, p.385-403, 1968.

EYZAGUIRRE, P.; IWANAGA, M. (Ed.) **Participatory plant breeding**. Rome: IPGRI, 1996. 164p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome: FAO, 1996. 75p.

FLETCHER, R. **New crops DOOR-marketing:** do our own marketing research. Brisbane: New Crops Group; University of Queensland, 1998. 253p.

GIACOMETTI, D.C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, Cruz das Almas, 1992. **Anais**. Cruz das Almas: EMBRAPA,CNPMF, 1993. p.13-28.

GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. **Collecting plant genetic resources:** technical guidelines. Wallingford: CAB International, 1995. 748p.

HARLAN, J.R. **Crops and man.** 2.ed. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, 1992. 284p.

HARTLEY, C.W.S. **The oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq.** London: Longman, 1977. 806p.

HEIDE, W.M. van der; TRIPP, R.; De BOER, W.S. **Local crop development: an annotated bibliography.** Roma: IPGRI; Wageningen: CPRO-DLO; London: ODA, 1996. 153p.

PALMER, J.R. Designing commercially promising tropical timber species. In: LEAKEY, R.R.B.; NEWTON, A.C. (Ed.) **Tropical trees:** the potential for domestication and the rebuilding of forest resources. London: HMSO, 1994. p.16-24.

PORTUGAL, A.D. A importância estratégica da prospecção tecnológica para o SNPA. In: GOMES DE CASTRO, A.M.; VALLE LIMA, S.M.; GOEDERT, W.J.; FREITAS FILHO, A.; PEREIRA VASCONCELOS, J.R. (Ed.) **Cadeias produtivas e sistemas naturais:** prospecção tecnológica. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. p.9-20.

POUND, J.E. The genetic constitution of the cocoa crop. **Annual Report on Cocoa Research**, v.1, p.10-24, 1931.

SILVA FILHO, D.F.; NODA, H.; CLEMENT, C.R. Genetic variability of economic characters in 30 accessions of cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) evaluated in Central Amazonia **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.409-417, 1993.

SIMMONDS, N.W. **Principles of crop improvement.** London: Longman, 1979. 408p.

WIERSUM, K.F. From natural forest to tree crops, co-domestication of forests and tree species, an overview. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.15, p.425-438, 1997.

16

MELHORAMENTO GENÉTICO DE FRUTEIRAS TEMPERADAS

MARIA DO C. B. RASEIRA
BONIFACIO H. NAKASU

Embrapa Clima Temperado, C.P. 403 - CEP: 96001-970 - Pelotas, RS.

1. INTRODUÇÃO

As fruteiras de clima temperado são de grande importância socioeconômica no Brasil, apesar de não apresentar condições ideais de clima para o seu cultivo. Em grande parte da região o acúmulo de horas de frio no inverno (temperaturas < 7,5° C), é insuficiente para uma brotação e floração adequadas, a umidade relativa do ar é alta no verão, e em alguns locais, ventos fortes favorecem a disseminação de patógenos, principalmente bactérias. Assim sendo, fez-se necessário que se desenvolvessem programas de melhoramento genético que visassem adaptar ou criar cultivares para às condições edafoclimáticas do Sul e Sudeste do país. A simples introdução de outros países, raramente tem fornecido cultivares com boa *performance*.

O programa mais antigo de melhoramento genético, de forma sistemática, foi iniciado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em 1950 pelo Dr. Orlando Rigitano, com o objetivo de criar cultivares de pessegueiro, *Prunus persica* L.(Batsch), adaptadas às condições do planalto paulista. Em 1953, outro programa foi iniciado pelo Dr. Sergio Sachs, na Estação Experimental Fitotécnica de Taquari, RS, o qual foi transferido em 1963 para a Estação Experimental de Pelotas, hoje Embrapa Clima Temperado (CPACT). Estes dois programas apresentaram resultados espetaculares, com lançamento de muitas cultivares com adaptações a regiões com acúmulo de frio hibernal de menos de 150 h (IAC) até 200 a 500 h (Embrapa Clima Temperado), tornando o país auto-suficiente na produção de pêssegos já na década de 1970. Cultivares de pêssego do IAC são as de mais baixo requerimento em frio no mundo e as da Embrapa Clima Temperado começam a ser cultivadas também no exterior, em regiões de inverno ameno, como México, em países da América do Sul e da África. No Brasil, hoje colhe-se pêssego de setembro a março.

Na década de 1950 o IAC iniciou também o melhoramento genético da macieira e já lançou diversas cultivares com adaptação ao clima de regiões altiplanas de São Paulo. Hoje, o maior programa de melhoramento genético da macieira encontra-se em Santa Catarina, liderado por Denardi da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Já lançou diversas cultivares, destacando-se a 'Catarina' que pode-se dizer é uma 'Fuji' melhorada e resistente à sarna. O Professor L.F. Hough colaborou de forma decisiva, desde o início, para o sucesso deste programa. A Embrapa Clima Temperado e o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) também conduzem trabalhos de melhoramento da macieira.

Em pereiras o IAC e a Embrapa Clima Temperado mantêm um programa de melhoramento genético, mas apesar do IAC já ter lançado diversas cultivares produtoras de frutas de boa qualidade, estas ainda não competem com as importadas. O IAPAR e a EPAGRI também iniciaram trabalhos de melhoramento de pêra. Até o presente cerca de 90% da pêra consumida no Brasil, ainda é importada.

A cultura da ameixeira no Brasil foi praticamente dizimada nos Estados do Sul, na década de 1970, devido a problemas com escaldadura causada por *Xylella*

fastidiosa. São Paulo manteve uma produção normal com cultivares criadas pelo IAC e por não ter sofrido a incidência da escaldadura devido, talvez, às condições de clima. O programa de melhoramento mais antigo é também do IAC que lançou diversas cultivares. A Embrapa Clima Temperado, a EPAGRI e o IAPAR também mantêm atividades de melhoramento genético. Até o presente, cerca de 50% das 50.000t de ameixa consumida no país, é importada.

Na maioria dos países que produzem frutas temperadas, em grande escala, o número de cultivares é muito reduzido. Por exemplo, no Japão, as principais cultivares de maçã são 'Fuji' e 'Tsugaru'; nos EUA, França e Itália, 'Red Delicious' e 'Golden Delicious'; no Chile, 'Red Delicious' e 'Granny Smith'; no Brasil, 'Fuji' e 'Gala', e assim por diante. A melhor e mais cultivada pêra no mundo ainda é a 'Bartlett', excelente para consumo fresco ou industrialização.

Argentina e Chile competem pelo mercado brasileiro, mas faz-se necessário buscar parceria para se conquistar o mercado dos países do Norte. A parceria tem que ser iniciada ao nível de pesquisa onde instituições como INTA, na Argentina, INIA, no Chile e Uruguai; IAC, EMBRAPA, EPAGRI, IAPAR, no Brasil, unam esforços para buscar e criar, juntos, cultivares mais adaptadas e modernas para, além de se auto-abastecerem, buscarem mercados europeu, americano e asiático.

2. MELHORAMENTO DA AMEIXEIRA

2.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A ameixeira pertence à família Rosacea, subfamília Prunoidea e ao gênero *Prunus* que compreende mais de vinte espécies, algumas das quais são abaixo relacionadas (Weinberger, 1975).

Prunus domestica L. (2n= 48) originária da Ásia Oriental, é a mais importante fonte de cultivares comerciais. *Prunus salicina* Lindl. (2n= 16) originária da China, é a espécie mais importante no Brasil. Foi introduzida nos Estados Unidos da América do Norte há mais de 100 anos e Luther Burbank intercruzou-a com *Prunus simonii* Carr. e espécies norte-americanas, desenvolvendo diversas cultivares comerciais (Okie & Ramming, 1999). *Prunus cerasifera* Ehrh. (2n= 16), originária do Leste Europeu e Sudeste da Ásia, largamente utilizada como porta-enxerto. *Prunus espinosa* L. (2n= 32), originária desde o Norte da Europa até a Sibéria, é fonte de resistência a frio. *Prunus simonii* Carr. (2n= 32), originária da China. *Prunus insititia* L. (2n= 48), originária do Leste Europeu e Oriente Próximo.

2.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

Duas espécies de ameixeiras são importantes comercialmente: *Prunus domestica* L., hexaplóide, também conhecida como ameixa européia e *Prunus salicina* Lindl., diplóide, conhecida como ameixa japonesa.

Quanto à *Prunus domestica,* originária da Ásia Oriental, Crane & Lawrence citados por Weinberger (1975) sugerem que é originária da hibridação entre *P. cerasifera* e *P. spinosa*. O triplóide que resultou poderia ter sido estéril, mas se seus cromossomos duplicaram, pode ter surgido um hexaplóide fértil.

A *P. salicina* é originária da China e já era cultivada há alguns milhares de anos (Yoshida citado por Okie & Ramming, 1999). No Japão e Coréia também já era cultivada desde a antigüidade, tanto que não é possível dizer se estes países faziam parte como centro de origem dessa espécie. Segundo Okie & Ramming (1999), plantas das cultivares melhoradas de *P. salicina* como 'Kelsey' e 'Abundance' foram introduzidas nos Estados Unidos há mais de 100 anos. Luther Burbank, famoso melhorista, intercruzou esses e outros acessos importantes com *P. simonii* e espécies norte-americanas, resultando nas cultivares 'Beauty', 'Burbank', 'Duarte', 'Eldorado', 'Formosa', 'Graviota', 'Santa Rosa', 'Satsuma', 'Shiro' e 'Wickson'. Estas cultivares formaram a base da indústria da ameixa no mundo, e algumas são largamente cultivadas até hoje. A maioria das cultivares de ameixa criadas por Burbank parece descender de *P. salicina, P. simonii* e *P. americana*. Em geral, *P. salicina* contribuiu em tamanho, sabor, cor e armazenamento, *P. simonii* contribuiu para firmeza e acidez (Gomes & Hedbetter citados por Okie & Ramming, 1999); enquanto as espécies americanas contribuíram com resistência a doenças, epiderme firme e qualidade aromática.

Na década de 1950, Weinberger iniciou o programa de melhoramento genético de ameixeira em Fresno - Califórnia, e lançou as cultivares que hoje lideram o mercado como: 'Frontier' e 'Calita' em 1968, 'Queen Rosa' em 1972, 'Blackamber' em 1989 e 'Fortune' em 1990.

No Brasil, sem dúvida alguma, foi o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), através do Dr. Orlando Rigitano e sua equipe, quem mais contribuiu para estabelecer a cultura da ameixeira.

2.3 HISTÓRIA DO MELHORAMENTO

Segundo Yoshida citado por Okie & Ramming (1999), na China, a ameixeira diplóide já era cultivada há alguns milhares de anos, mas foi inicialmente melhorada no Japão e mais tarde, com maior ênfase, nos Estados Unidos. O cultivo da ameixeira é também muito antigo no Japão e Coréia.

Sem dúvida alguma, o melhorista que mais contribuiu para o melhoramento genético da ameixeira foi Luther Burbank. Cultivares por ele lançadas em 1906 como 'Santa Rosa' continuam liderando a produção em muitos países, pela produtividade e qualidade das frutas. Pode-se dizer que até pouco tempo, cerca de 90% da área plantada com ameixeira nos Estados do Sul do Brasil era com a cultivar Santa Rosa (Nakasu *et al.*, 1981), até que devido suscetibilidade à bacteriose e principalmente à escaldadura, ela começou a ser substituída por outras cultivares.

A escaldadura, que provavelmente entrou a partir do delta Argentino, em meados da década de 1970, praticamente dizimou os pomares de ameixeiras, nos Estados do Sul do Brasil (French & Kitajima, 1978; French & Feliciano, 1982). A então UEPAE de Cascata, hoje Embrapa Clima Temperado, iniciou um trabalho intenso de limpeza através de termoterapia e cultura de meristemas, em 1980, e algumas das principais cultivares foram obtidas e indexadas. Concomitantemente em 1982, foi introduzida uma centena de cultivares do repositório de germoplasma dos Estados Unidos e, dentre elas, algumas foram indicadas para produção comercial, como é o caso de 'Reubennel' e 'Harry Pickstone' da África do Sul, 'Santa Rosa', 'Wade' etc.

Em 1985 reiniciou-se o plantio de ameixeiras nos Estados do Sul do Brasil, a partir de mudas 'limpas' fornecidas pela Embrapa Clima Temperado e, ultimamente, pela EPAGRI e pelo IAPAR. Muitas das tentativas estão tendo sucesso, mas o problema da escaldadura ainda não está resolvido, pois na região da Serra Gaúcha e algumas localidades do Planalto Catarinense bem como, no Estado do Paraná, têm-se constatado reinfestações. Só com cultivares resistentes, poder-se-á resolver o problema.

2.4 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO

No Brasil, todos os programas buscam fundamentalmente adaptação às condições de inverno ameno com acúmulo de horas de frio variando de 60 h a 500 h, dependendo da região, que demonstrem alta produtividade, boa resistência a moléstias, estresses ambientais e problemas fisiológicos.

O programa de melhoramento da ameixeira do IAC, hoje liderado por Campo Dall'Orto visa a obtenção de cultivares que produzam frutas de maturação precoce, de alto valor agronômico, adaptadas às condições edafoclimáticas do Estado de São Paulo, com acúmulo de 60 h a 120 h de frio.

O programa de melhoramento conduzido no IAPAR por Hauagge *et al.* (1991), iniciou em 1974, introduzindo e testando cultivares e, em 1980, com hibridação controlada. Os principais objetivos são a obtenção de cultivares que, entre outras características, iniciem precocemente a produção e que possuam tolerância às principais doenças no Estado do Paraná, que são a escaldadura da folha (*Xylella fastidiosa,* Wells *et al.*.), bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith) Dye) e ferrugem (*Tranzschelia pruni-spinosa*, Pers.).

O melhoramento genético da ameixeira, iniciado em Minas Gerais há poucos anos por Ramos *et al.* (1998), tem como objetivos testar germoplasma de diversas regiões visando à obtenção de clones superiores, com alta produtividade de frutas de boa qualidade, com maturação escalonada e adaptadas às condições climáticas do sul de Minas Gerais.

Em Santa Catarina, a EPAGRI iniciou em 1990 um amplo programa de melhoramento genético em Urussanga, onde os principais objetivos são a obtenção de cultivares com adaptação a regiões com acúmulo de frio de 250 horas, tolerantes à bacteriose e escaldadura.

No Rio Grande do Sul, o programa de melhoramento da ameixeira iniciado por Sergio Sachs, na atual Embrapa Clima Temperado continua tendo os objetivos de obter cultivares: a) com adaptação a regiões entre 250 a 400 horas de frio hibernal; b) resistência principalmente à bacteriose e escaldadura; c) produtoras de frutas de bom tamanho, sabor mais adocicado, polpa firme e diferentes épocas de maturação.

2.5 MELHORAMENTO GENÉTICO DA AMEIXEIRA NO BRASIL

Todos os programas de melhoramento da ameixeira no Brasil referem-se à *P. salicina* Lindl., diplóide, também conhecida por ameixa japonesa. Ao longo dos anos, têm sido lançadas cultivares com adaptação em diversas regiões de clima temperado ameno a subtropical, através de introduções, hibridações e seleções.

Todas as cultivares do IAC: 'Carmesin', 'Rosa Paulista', 'Grancuore', 'Gema de Ouro', 'Golden Talismã', 'Rosa Mineira', 'Januária' e 'Centenária', exigem menos

de 200 h de frio (Ojima *et al.*, 1992). A ferrugem causada por *Tranzschelia* sp. é um problema sério em São Paulo, mas, segundo Campo Dall'Orto *et al.* (1979) 'Gema de Ouro' e 'Golden Talismã' mostram alta resistência e 'Kelsey Paulista' e 'Rosa Paulista', moderada resistência.

O programa de melhoramento, conduzido por Roberto Hauagge no IAPAR, com hibridações a partir de 1980, já avaliou mais de 30.000 *seedlings* combinando resistência a bacteriose, escaldadura e ferrugem, e exigência em frio de 200 a 500 h. A primeira cultivar lançada 'Irati' é resultante do cruzamento entre a seleção FS-89 e 'Amarelinha' (Hauagge *et al.*, 1991).

Em Urussanga-SC, a EPAGRI, sob a liderança de Emílio Dela Bruna, iniciou em 1990, trabalhos de melhoramento genético e já conta com cerca de 11.000 *seedlings* para avaliação.

Em Minas Gerais a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), estão iniciando um trabalho de melhoramento da ameixeira, procurando utilizar a variabilidade genética já existente e introduções. Dentre as cultivares existentes, a 'Rosa de Delfim Moreira' é a mais explorada, devido a sua alta produtividade.

A Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, mantém um programa de melhoramento genético da ameixeira, iniciado em 1953 por Sérgio Sachs. Deste programa, surgiu a série 'Pluma' de 1 a 7, das quais a mais importante é a 'Pluma-7', pela alta produtividade de frutas de bom tamanho, epiderme e polpa vermelhas e firmes.

3. MELHORAMENTO DO PESSEGUEIRO

3.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O pessegueiro pertence à família Rosacea, subfamília Prunoidea, gênero *Prunus* (L.) e subgênero Amygdalus. As cultivares comerciais pertencem à espécie *Prunus persica*. De acordo com Scorza & Okie (1991) são reconhecidas cinco espécies: *Prunus davidiana* (Carr.) Franch., *P. ferganensis* (Kost & Rjab) Kov. & Kost., *P. kansuensis* Rehd., *P. mira* Koehne e *P. persica*. Em geral, quando se menciona apenas pêssego ou pessegueiro, refere-se à espécie *P. persica*.

Prunus davidiana é usada como porta-enxerto, na China, e às vezes, é utilizada como planta ornamental (Wang citado por Scorza & Okie, 1991). *P. ferganensis* é classificada, às vezes, como *P. persica*, mas difere dessa pelas nervuras alongadas e paralelas (Kravtsova *et al.* citados por Scorza & Okie, 1991). *Prunus kansuensis* é também usada como porta-enxerto, na China. *P. mira* é usada como porta-enxerto, em algumas regiões da China e distingue-se por suas flores brancas e caroço liso (Wang citado por Scorza & Okie, 1991).

3.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

O pessegueiro é nativo da China, onde se encontra a maior diversidade dessa espécie (mais de 1.000 cultivares). O nome entretanto, é originário da Pérsia, que foi inicialmente e erroneamente, tomada como seu país de origem (Sachs & Campos, 1998).

A cultura do pessegueiro data de, pelo menos, 4 mil anos (Wang citado por Scorza & Okie, 1991). Segundo De Candolle citado por Hedrick (1917), falava-se sobre pêssego, 2000 anos antes de sua introdução no mundo greco-romano. A pesquisa na literatura chinesa mostra que o pêssego era citado na mesma, centenas de anos antes da era cristã.

O pessegueiro veio para o Mediterrâneo, através da Pérsia. Aparentemente, esta espécie foi introduzida na cultura grega, 400 a 300 anos antes de Cristo, e na romana, no primeiro século D.C. (Hedrick, 1917).

Embora os mouros tenham possivelmente, introduzido esta espécie no Norte da África e na Espanha, a disseminação da mesma pelos países mediterrâneos deveu-se principalmente, aos romanos (Scorza & Sherman, 1996).

O pessegueiro foi introduzido na América continental pelos conquistadores espanhóis. Os portugueses, provavelmente introduziram esta espécie na Costa Leste da América do Sul (Scorza & Sherman, 1996).

No Brasil, o pessegueiro foi introduzido em 1532, por Martim Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas na Capitania de São Vicente, que corresponde ao atual Estado de São Paulo.

3.3 HISTÓRICO DO MELHORAMENTO DE PESSEGUEIROS

Durante a dispersão do pessegueiro pela Europa, populações adaptadas de pêssegos locais podia ser encontradas. Estas se constituíram em *landraces* selecionadas há centenas de anos por sua produtividade e resistência a estresse ambiental. Constituíram-se em uma fonte de porta-enxertos, muito importante até hoje, na Europa, apesar da popularidade que atualmente, têm os porta-enxertos clonais (Scorza & Okie, 1991).

Nas colônias americanas duas fontes principais de germoplasma básico de pessegueiro serviram para os avanços futuros, através de seleção. Foram eles *seedlings* indígenas, via México e Sudeste europeu e as cultivares ou sementes trazidas da Inglaterra. Uma terceira fonte de germoplasma que muito contribuiu para as cultivares que se tem hoje, nos Estados Unidos (várias das quais foram utilizadas também em programas de melhoramento, no Brasil) foi o 'Chinese Cling', uma introdução vinda da China, via Inglaterra.

'Chinese Cling' foi introduzido nos Estados Unidos em 1850, por Charles Fortune. Logo após a Guerra Civil, surgiram na Geórgia, as cultivares 'Belle of Georgia' e 'Elberta' provenientes de *seedlings* selecionados daquele germoplasma. 'Chinese Cling' era macho-estéril e não se tem certeza qual o progenitor masculino das duas cultivares citadas. Também foram importantes, 'Hiley' um *seedling* de 'Belle' e 'J. H. Hale', *seedling* de 'Elberta'. Algumas das cultivares plantadas ainda hoje com sucesso, têm há várias gerações anteriores, as cultivares 'J.H. Hale', 'Belle of Georgia', 'Elberta' ou 'Chinese Cling', como ascendentes (Hesse, 1975).

Muitos indivíduos contribuíram para o desenvolvimento da cultura do pessegueiro e para o surgimento das variedades comerciais. Luther Burbank nascido em Lancaster, Massachusetts, em 1849, embora mais conhecido por suas contribuições com cultivares de batata, ameixa e outras espécies, também trabalhou com milhares de novos "tipos" de pessegueiros e cruzamentos de pessegueiros e nectarineiras (Harwood, 1941).

O melhoramento institucional para pessegueiros de baixa e média necessidade de frio hibernal e portanto, adaptados às condições de inverno ameno, começou em 1907 na Universidade da Califórnia (Riverside) e foi posteriormente, estendido por Weldom, no Chaffey Junior College em Ontário, Califórnia. Estes programas lançaram a cultivar 'Babcock' extensivamente utilizada em programas subseqüentes (Byrne, 1999).

Os dois primeiros programas terminaram na época em que outros começavam nos Estados Unidos (Florida, Califórnia, Georgia, Lousiana e Texas), Brasil (Campinas, SP; Taquari e Pelotas, RS), Índia (Saharanpur, Uttar Pradesh) e África do Sul.

3.4 PÊSSEGOS PARA INDUSTRIALIZAÇÃO

O primeiro programa de melhoramento genético para condições de inverno ameno, visando criação de cultivares de média exigência em frio, produtoras de frutas tipo conserva, foi o programa de Palo Alto (CA, USDA/Stanford University).

3.5 O MELHORAMENTO NO BRASIL

O programa de melhoramento de pessegueiro, foi iniciado no Brasil, em 1950 por Orlando Rigitano, no Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo, visando à criação de cultivares adaptadas às condições daquele Estado. O material básico utilizado neste programa consistiu de cultivares introduzidas da Flórida como 'Jewel', 'Suber', 'Hall's yellow' e 'Angel' e *seedlings* introduzidos por colonizadores portugueses, a partir do século XVI.

Em 1953, foi iniciado um outro programa por Sérgio Sachs, na então Estação Fitotécnica de Taquari, da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Alguns anos depois, este programa foi transferido para Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado (Feliciano, 1979).

Na década de 1940 foi selecionada por um agricultor de sobrenome Aldrighi, em sua propriedade no município de Pelotas-RS, a cultivar 'Aldrighi', provavelmente originária de pêssegos provenientes da Argentina. Essa cultivar foi introduzida na então, Estação Experimental de Pelotas (EEP), em 1955, sob a forma de sementes (caroços) coletadas na fábrica de conservas Leal Santos. Como essa cultivar era até então, propagada por sementes, quando Sérgio Sachs iniciou o trabalho em Pelotas, foi possível selecionar mais de cem clones na zona produtora de pêssegos para indústria (Feliciano, 1979; Raseira & Nakasu, 1998). Estes clones e aproximadamente 200 cultivares introduzidas constituíram o material genético básico para o programa de melhoramento. Em 1957, milhares de sementes híbridas ou resultantes de polinizações abertas foram trazidas para a EEP, provenientes da Flórida, Geórgia, Carolina do Norte, Califórnia e principalmente, da Universidade de Rutgers, New Jersey (Feliciano, 1979).

3.6 MODO DE HERANÇA DE ALGUNS CARACTERES

Hesse (1975) fez um resumo do que se conhece sobre herança de caracteres monogênicos ou de herança qualitativa. O mesmo tipo de revisão com maior número de características é apresentado por Scorza & Sherman (1996).

Entre os caracteres apresentados nesses trabalhos, estão:

- Planta *standard* (normal) dominante sobre a planta de hábito braquítico (anã);
- Planta normal dominante sobre o tipo chorão (prostado);
- Normal dominante sobre tipo pilar;
- Planta compacta dominante sobre *standard*;
- Folhagem vermelha dominante sobre verde.
- Presença de glândulas peciolares dominante sobre a ausência (homozigoto dominante codifica para glândulas reniformes, o heterozigoto para globosa e o homozigoto recessivo para ausência de glândula);
- Pólen fértil dominante sobre pólen estéril;
- Flor companulada dominante sobre rosácea;
- Pétalas coloridas dominantes sobre rosa claro;
- Pétalas rosa escuro dominante sobre rosa claro;
- Cor rosa das pétalas dominante sobre vermelho;
- Flor simples dominante sobre a dobrada;
- Polpa branca dominante sobre amarela;
- Caroço solto dominante sobre aderente;
- Película pubescente (pêssego) dominante sobre glabra (nectarina);
- Polpa fundente dominante sobre não fundente;
- Polpa fundente macia dominante sobre polpa fundente firme;
- Polpa fundente dominante sobre *stony hard* (crocante);
- Forma achatada (tipo *peen-to*) dominante sobre não chata;
- Maturação normal dominante sobre maturação lenta (muito lento amaciamento da polpa e reduzida produção de CO_2 e C_2H_4).

Vários caracteres de importância econômica são considerados poligênicos, como por exemplo, exigência em frio, época de maturação, época de floração, resistência a algumas doenças etc. Estes são mais influenciados por fatores ambientais.

3.7 OBJETIVOS

Os principais objetivos buscados pelos melhoristas são: adaptação, resistência a doenças, época de maturação que propicie melhor escalonamento da colheita, época de floração de forma a escapar às geadas mais fortes, forma, aparência e tamanho dos frutos, firmeza da polpa, vigor, produtividade, resistência a condições de estresse e a pragas, e, no caso de países frios, resistência a danos pelo frio. Recentemente, já começou a existir uma preocupação com o teor de caroteno, de vitamina C e de antocianinas.

No Brasil, os principais programas de melhoramento genético de pessegueiro, não fogem aos objetivos gerais apontados acima. A principal diferença entre o programa do IAC e o da Embrapapa Clima Temperado é que o primeiro se dedica, principalmente, à cultivares para consumo *in natura* ou dupla finalidade e que sejam adaptadas a condições de inverno ameno (40 h a 120 h de temperatura $\leq 7{,}2°C$), condições praticamente subtropicais. Por sua vez o segundo, além de cultivares com essas finalidades, visa também à criação de cultivares cujos frutos destinam-se à industrialização. Quanto à adaptação, embora trabalhe com cultivares e seleções cuja necessidade em frio hibernal vai desde 150 h até 500 h, a concentração maior está ao redor de 300 h de frio.

3.8 PRINCIPAIS RESULTADOS E PERSPECTIVAS

No Brasil, o programa de melhoramento do IAC, criou as cultivares - Jóia, Doçura, Ouromel, Dourado, Aurora, Régis, Talismã, Biuti, Delicioso Precoce, Centenário, Tropical; nectarinas como Centenária, Josefina e Rosalina - que permitiram o cultivo dessa espécie em regiões subtropicais, até mesmo com um número de horas de temperatura hibernal ≤ 7,2°C abaixo de 50 horas (Barbosa *et al.*, 1997).

As cultivares criadas pelo programa gaúcho estão, em sua maioria, descritas em Raseira & Nakasu (1998). Embora, em geral, as cultivares lançadas pelo CPACT se adaptem a regiões com uma média de 300 h de frio hibernal, a contribuição de outras instituições permitiu a disponibilidade de germoplasma com necessidade de 150 h a 500 h de frio hibernal. São mais de 40 cultivares de pêssegos e nectarinas (Raseira *et al.*, 1992), destinadas a consumo *in natura*, processamento, ou ambos.

4. MELHORAMENTO DA MACIEIRA

4.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A macieira pertence à família Rosacea, subfamília Pomoideae e ao gênero *Malus*. De acordo com vários autores, o gênero *Malus* tem 25 a 30 espécies e diversas subespécies (Janick *et al.*, 1996).

As cultivares de macieira, economicamente mais importantes, pertencem à espécie *Malus domestica*, Borkh. Outras espécies têm também significância, como por exemplo, *Malus floribunda*, Siehold ex Von Haute, uma vez que as cultivares comerciais resistentes à sarna, têm esta espécie como um dos ancestrais. Genes para resistência a doenças também foram encontradas em *M. micromalus*, Makino, *M. atrosanguinea* (Spaeth) C. Schneider, *M. baccata jackii*, Rehder e *M. sargentii*, Rehder (Korban & Skirvin, 1984; Way *et al.*, 1990).

4.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

Segundo Beach *et al.* (1905) o país de origem da maçã não é conhecido definitivamente. O mesmo autor diz que após examinar as evidências, cuidadosamente, A. De Candolle concluiu que a espécie hoje cultivada se originou da região sul do Cáucaso. Sua existência na Europa remonta aos tempos pré-históricos, tanto no estado nativo como cultivada. De Candolle cita que a macieira era encontrada em estado silvestre nas montanhas do noroeste da Índia, mas não no Japão, Mongólia ou Sibéria.

Muitas espécies vegetais, importantes na alimentação humana, têm uma base genética muito estreita. Algumas vezes, toda a produção de determinado alimento é baseada em uma única espécie e, às vezes, em uma cultivar, como por exemplo, a cereja ácida que depende da cultivar 'Montmorency'. A produção de maçãs, até pouco tempo, era baseada, e ainda o é em grande parte, nas cultivares 'Delicious' e 'Golden Delicious'. A produção comercial fica assim, muito vulnerável a uma catástrofe acidental, como uma nova doença, por exemplo. Embora o gênero *Malus* seja geneticamente muito diverso, as variedades cultivadas de macieira, têm uma base genética muito estreita (Way *et al.*, 1990).

As reservas genéticas da maçã cultivada foram devastadas através da perda de cultivares comerciais que já foram plantadas em escala comercial. Regan citado por

Way *et al.* (1990), revisou publicações especializadas, entre 1804 e 1904, encontrando mais de 7 mil cultivares de macieira, descritas. Grande proporção destas, foi perdida no século XIX, o que continuou acontecendo no século seguinte. Em meados do século XX, os programas de melhoramento genético da macieira nos Estados Unidos, foram reduzidos e coleções de muitas estações experimentais foram eliminadas. Isto resultou em perda considerável de germoplasma (Lamb, 1974).

4.3 MELHORAMENTO GENÉTICO

Até a metade do século XX, a maioria das cultivares de macieiras tinha sido obtida por acaso, de *seedlings* selecionados por fruticultores.

O início de programas de melhoramento genético controlado é atribuído a Thomas Andrew Knight (1759-1838) que produziu as primeiras cultivares de genealogia conhecida. A mesma técnica continua a ser empregada. Entretanto, comparada a outras espécies frutíferas, parece que não foi tão bem sucedida com a macieira. Finalmente, nos últimos 25 anos, *seedlings* derivados de hibridações controladas, passaram a ter sucesso comercialmente, incluindo-se aí: 'Elstar', 'Gala', 'Mutsu', 'Pinck Lady,' 'Jonagold' e 'Empire'. As cultivares 'Empire' e 'Mutsu' descendem de 'Delicious' e as demais, de 'Golden Delicious'. A cultivar 'Braeburn', da Nova Zelândia, foi obtida por acaso de um *seedling*.

4.4 MELHORAMENTO NO BRASIL

O mais antigo programa de melhoramento de macieira no Brasil, é o do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na década de 50. Antes disso, foram feitas algumas introduções e observações, tanto no IAC, como na Estação Experimental de Pelotas-RS.

No Estado de Santa Catarina, as pesquisas com macieira, iniciaram nos anos 70. O Instituto Agronômico do Paraná iniciou a pesquisa com essa espécie em 1973, com a instalação de coleções de cultivares em Palmas e Guarapuava (IAPAR, 1988). Hoje, o maior programa de melhoramento de macieira encontra-se no Estado de Santa Catarina.

A produção nacional de maçãs é representada em grande parte, pelas cultivares 'Gala' e 'Fuji', usando como polinizadoras, 'Golden Delicious', 'Mollie's Delicious' e 'Granny Smith'. Outras cultivares como, 'Eva', 'Belgonden', 'Braeburn' etc., são plantadas em menor escala, assim como, diversas mutações de 'Gala' e 'Fuji'.

O mercado brasileiro prefere maçãs vermelhas de sabor doce-subácido, 'Gala' e 'Fuji' as cultivares mais plantadas comercialmente no país, têm estas características combinadas com uma resposta satisfatória aos tratamentos para a quebra de dormência (Denardi *et al.*, 1988).

Cultivares de maturação mais precoce do que 'Gala', como as recentemente lançadas 'Eva', 'Princesa' e 'Condessa' têm boa aceitação por parte dos produtores devido aos altos preços que alcançam.

4.4.1 OBJETIVOS

O programa de melhoramento de Santa Catarina, busca além da adaptação e extensão do período de colheita, a resistência a doenças e qualidade de fruta. O IAC, procura obter cultivares adaptadas às condições subtropicais, com invernos bem

amenos. O IAPAR, concentrou esforços na obtenção de cultivares que necessitam de 300 a 400 horas de frio. Praticamente, para esta faixa de adaptação trabalha o programa de Pelotas-RS, que enfatiza também, a precocidade e a resistência a doenças.

4.4.2 PRINCIPAIS RESULTADOS

O programa do Instituto Agronômico de Campinas, o mais antigo, criou diversas cultivares de baixa exigência em frio, (maioria entre 500 e 600 horas de acúmulo de frio necessário) incluindo-se: 'Rainha', 'Paulista', 'Bonita' e 'Culinária' (Denardi & Hough, 1987) e mais recentemente, cultivares adaptadas às regiões com 100 h a 300 h de frio hibernal.

O programa do Rio Grande do Sul foi desenvolvido ao nível estadual pela Secretaria da Agricultura do Estado, que lançou uma série de seleções avançadas, destacando-se, 'FR-8' e 'FR-10'. Já o programa mais antigo deste Estado, iniciou na Estação Experimental de Pelotas e continuou com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Na primeira fase foram realizadas 28 seleções, obtidas principalmente, de polinizações de 'Delicious' e 'Golden Delicious', 'Winter Banana' e 'York-A-Red'. Duas seleções receberam denominações varietais: 'BR-1' e 'BR-2', ambas com necessidade em frio entre 600 h e 700 h. Presentemente, o programa se concentra em resistência a doenças, especialmente resistência à sarna, baixa exigência em frio e precocidade. Em 1998, foi lançada a cultivar 'Rubiana', com necessidade em frio inferior a 250 horas.

O Instituto Agronômico do Paraná lançou as cultivares 'Eva', 'Carícia' e 'Anabela', todas adaptadas às condições de inverno ameno. A cultivar Eva de modo especial, teve grande aceitação por parte dos produtores, por aliar a essa característica, o fato de produzir bons frutos de maturação precoce.

Entre 1973 e 1982, a Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (EMPASC) concentrou esforços em estudos de herdabilidade, a fim de identificar o germoplasma mais promissor, a ser usado para objetivos específicos. Assim, 'Anna', 'Gala' e 'Golden Delicious' costumam segregar para baixa a moderada necessidade de frio, frutos de alta qualidade, alta produtividade e curto período de juvenilidade. 'Gala' e 'Golden Delicious' transmitem pequeno tamanho de frutos (Denardi & Hough, 1987). Segundo Denardi *et al.* (1988) o melhor germoplasma disponível para estender a colheita por mais de quatro meses, junto com adaptação climática, bom sabor e textura, é constituído pelas cultivares: 'Mollie's Delicious', 'Gala', 'Golden Delicious' e 'Fuji'. Cruzamentos entre estas cultivares produziram progênies com alta variabilidade e houve segregação para mais baixa necessidade em frio, do que aquela dos progenitores.

A partir de 1982, foi dada ênfase em aplicar os métodos e conhecimentos para obter cultivares adaptadas às condições das regiões produtoras de frutas, de Santa Catarina, principalmente duas delas, sendo uma com 500-600 h e outra com 700 h de frio no inverno. Outra prioridade foi obter cultivares com resistência a doenças, destacando-se a sarna (*Venturia inaequalis*), uma vez que as pulverizações representam 25% a 30% do custo de produção (Denardi & Hough, 1987).

Foram lançadas pela EPAGRI, as cultivares 'Princesa', 'Primícia', 'Lisgala', 'Fuji Suprema', 'Imperatriz', 'Catarina', 'Fred Hough', 'Condessa', 'Baronesa' e 'Daiane'. Delas, a cultivar 'Condessa' é a menos exigente em frio, em torno de 350 horas; 'Princesa', 'Fred Hough' e 'Catarina' têm resistência à sarna.

4.5 MELHORAMENTO VISANDO CARACTERES ESPECÍFICOS

4.5.1 NECESSIDADE EM FRIO

Um critério utilizado para a seleção de germoplasma visando baixa exigência em frio é a brotação precoce. A baixa necessidade em frio da cultivar 'Anna' é atribuída a um gene dominante e diversos genes de efeitos menores (Hauagge & Cummings, 1991).

Além da cultivar 'Anna, outras cultivares utilizadas como fonte de baixa necessidade em frio são: 'Dorset Golden', 'Ein Shemer', 'Slor', 'Mollie's Delicious', 'Princesa', entre outras (Janick *et al.*, 1996).

4.5.2 SABOR

A acidez e a doçura são herdadas independentemente. A herança da doçura, medida pelo teor de açúcar no suco da fruta, mostra um modelo quantitativo com distribuição normal de progênies em relação à média, a qual é muito próxima da média dos genitores (Janick *et al.*, 1996).

A herança do caráter acidez é mais complicada, envolvendo dois modelos: um controle por um gene, com média e alta acidez sendo dominantes sobre a baixa; superposto a um modelo quantitativo.

Sabendo-se a concentração de açúcar e de ácido málico, podem ser selecionados genitores que produzam progênies em que a maioria dos *seedlings* combine teor de açúcar e acidez desejáveis.

4.5.3 RESISTÊNCIA A DOENÇAS

• Sarna: O método convencional para pré-selecionar *seedlings* para resistência à *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint, é plantar as sementes, após a estratificação, em casa de vegetação, sob temperatura de 18°C a 20°C. Quando as primeiras folhas verdadeiras aparecem, as plântulas são pulverizadas com uma suspensão de esporos e são mantidas sob uma cobertura, por 48 horas, em condições de umidade próxima a 100%. Elas são inoculadas novamente, dez dias após, por segurança. Infecção satisfatória só pode ser obtida em folhas muito jovens (Brown, 1975).

O inóculo é preparado utilizando-se isolados das diferentes regiões produtoras.

A reação à doença recebe graus, de acordo com os sintomas apresentados (Janick *et al.*, 1996):

0 = sem evidência de infecção;
1 = manchas do tamanho da cabeça de alfinete, sem esporulação;
2 = lesões cloróticas ou necróticas irregulares, sem esporulação;
3 = poucas e restritas lesões esporulando;
4 = lesões extensivas e abundantes, com esporulação;
M = mistura de lesões necróticas, sem esporulação com lesões esparsas com esporulação.

Os programas modernos de melhoramento para resistência à sarna datam da descoberta do Dr. Leon F. Hough sobre imunidade à sarna em progênies oriundas de cruzamentos entre espécies, feitas no início do século XX por C.S. Crandall, na Universidade de Illinois. Foi iniciado um programa cooperativo pelo Dr. L.F. Hough,

inicialmente na Universidade de Illinois e depois, Rutgers University e Dr. J.R. Shoy da Purdue University, aos quais se uniram posteriormente, E.B. Willians, J. Janick, J.R. Crosby, de Purdue; D.F. Dayton e S.S. Korban (Illinois) e J. Gofreda (Rutgers) entre outros. Este programa auxiliou diversos outros em diferentes países (Janick *et al.*, 1996).

Foi muito utilizada a cultivar Prima, nos programas brasileiros, entretanto, foram as progênies de 'Coop 7' e 'Coop 14' que mais se destacaram, pois além de ter o gene Vf de *Malus floribunda*, segregaram para boa adaptação a invernos amenos, alta produtividade, boa coloração e tamanho de frutas e curto período de juvenilidade (Denardi *et al.*, 1988).

Em Santa Catarina, depois dessa primeira pré-seleção, as plantas permanecem por dois anos, enviveiradas. Durante este tempo, é realizada uma pré-seleção para resistência a outras doenças; além de *Malus floribunda*, também tem gene para resistência à *Venturia inaequelis, M. pumila, M. baccata, M. micromalus, M. atrosanguinea.* Até 1993, foram identificadas cinco raças virulentas deste fungo e a raça 6 foi recentemente, identificada na Alemanha. Os isolados que foram examinados da raça 6 eram agressivos.

Uma outra forma de resistência à sarna, mais segura, é a resistência poligênica encontrada na cultivar 'Antonowka Poltobutanaja', nas espécies *M. baccata, M. sargentii* e *M. sieboldii* (Janick *et al.*, 1996).

O programa catarinense de melhoramento da macieira, já lançou 'Primícia', 'Catarina' e 'Fred Hough', todas com resistência à sarna.

• **Oídio** (*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. Em condições de alta umidade, esta doença pode ser importante. Embora geralmente, não cause danos às frutas, ela debilita a planta e pode matar os *seedlings*. O fungo ataca a folhagem e brotos novos, causando um efeito negativo na qualidade e quantidade, das frutas produzidas. Algumas cultivares são muito suscetíveis, outras muito resistentes e entre estas duas categorias, têm uma grande variabilidade de diferentes níveis de resistência ou suscetibilidade. 'Delicious', 'Mc Intosch' e o porta-enxerto 'Geneva 65' têm resistência de campo, enquanto que 'Idared', 'Jonathan' e os porta-enxertos 'Malling-Merton' são extremamente suscetíveis. Há dúvidas se existe imunidade completa entre as cultivares de macieira cultivadas, mas é possível selecionar germoplasma altamente resistente (Janick *et al.*, 1996).

Brown (1959) diz que a resistência a oídio pode ser quantitativa sem evidência de dominância.

Além do tipo de resistência poligênica, alguns autores citam a imunidade, como característica monogênica encontrada em espécies como *M. robusta* e *M. zumi.*

No programa da EPAGRI é feita a pré-seleção (*screening*) ao final do primeiro ciclo vegetativo e, novamente, ao final do segundo ciclo, quando se trata de resistência poligênica. 'Starkinson' deu origem à progênie com um bom nível de resistência. O cruzamento entre as cultivares 'Fuji' e 'Starkinson' produziu alguns *seedlings* com alto nível de resistência. Entretanto, também foi introduzido germoplasma com resistência monogênica, seleções desenvolvidas por pesquisadores de East Malling Research Station, originárias de *Malus robusta* e *Malus zumi*, após três gerações de cruzamentos recorrentes e que já produziam frutas de bom tamanho e qualidade (Denardi *et al.*, 1988).

• **Podridão amarga** - *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Von Schrenk. A podridão amarga é uma doença séria em macieiras, principalmente, nas zonas mais quentes de Santa Catarina, na parte sul do Rio Grande do Sul e em regiões de alta temperatura de verão e de umidade relativa igual ou superior a 60%. Camilo citado por Janick *et al.* (1996), testou diversos clones de *Malus*, quanto à reação a isolados de *Glomerella cingulata* e todos os isolados foram patogênicos a todos os clones de *Malus*, excetuando-se apenas *M. siebaldii* 2892-22.

4.5.4 DURAÇÃO DO PERÍODO DE JUVENILIDADE

Este é um caráter quantitativo e segue o padrão usual. De acordo com Visser citado por Brown (1975), existe uma boa correlação entre a fase vegetativa de uma cultivar – isto é, o período que vai da propagação, enxertia, até a frutificação – e a contribuição desta cultivar à duração do período de juvenilidade da progênie. Assim, conhecendo-se os pais, pode-se saber se a média do período juvenil da progênie será curto, médio ou longo.

4.5.5 ÉPOCA DE MATURAÇÃO

A época de maturação, de um modo geral, segue o modelo de herança poligênica com distribuição normal, em torno da média. Entretanto, comparativamente, é fácil produzir progênies de maturação precoce e de meia estação, embora seja mais difícil produzir frutos de qualidade, nos precoces.

4.6 CARACTERES MONOGÊNICOS

Embora a maioria dos caracteres de importância econômica seja de herança poligênica, existem alguns caracteres, interessantes agronomicamente, de herança monogênica, dentre eles: hábito de crescimento colunar, albinismo, genes letais, resistência a algumas pragas e doenças. Brown (1992) fez uma revisão de diversos autores, apresentando uma tabela com alguns exemplos de herança monogênica. Assim, o gene G_b, dá suscetibilidade a *Glomerella cingulata* e é encontrado na cultivar 'Golden Delicious'; o nanismo é uma herança monogênica recessiva; o hábito de crescimento prostrado é monogênico dominante; a suscetibilidade a *Phyllosticta solitaria* é monogênica dominante etc. (Brown, 1975).

5. MELHORAMENTO DA PEREIRA

5.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A pereira pertence à família Rosaceae, subfamília Promoidae e ao gênero *Pyrus*. Compreende mais de 20 espécies, todas nativas da Europa e Ásia, segundo Rehder citado por Layne & Quamme (1975). As mais importantes espécies são *Pyrus communis* L.; *Pyrus pyrifolia* (Burm) Nak.; *Pyrus ussuriensis* Max; *P. bretschneideri* Rehd.; *P. betulaefolia* Bge.; *P. pashia* P.Don.; *P. nivalis* Jacq. e *P. clareada* Dcne.

Todas as espécies de *Pyrus*, até então examinadas são diplóides (2n=34,x=17), existindo algumas cultivares poliplóides de *P. communis* (Zielinski & Thompson citados por Layne & Quamme, 1975).

5.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

Hedrick *et al.* (1921) afirmaram que todas as espécies de pereiras foram encontradas no hemisfério Norte no Velho Mundo, não tendo sido encontradas no hemisfério Sul ou no Novo Mundo. Entre dez a doze encontradas na China, três ou quatro são nativas do Japão; pelo menos uma da Coréia; outra do Leste do Himalaia; enquanto as restantes, entre oito a dez espécies encontradas desde Leste de Turquestão, através da Pérsia e Ásia Menor até Sul e Leste europeu e Norte da África. Entretanto, três destas espécies são as mais importantes: *P. communis* L., originária da Europa e Ásia; *P. nivalis* Jacq., originária do Sul da Europa, conhecida como pêra neve devido suas frutas não serem palatáveis até após a chegada da neve e *P. serotina* Rehd., hoje *P. pyrifolia*, nativa no Centro e Oeste da China, encontrada também no Japão. Hibridações entre *P. communis e P. pyrifolia* deram origem a cultivares como 'Kieffer', 'Le Conte' e 'Garber'.

Na Europa, América do Norte, América do Sul, África e Austrália, a *P. communis* L. é a principal espécie cultivada. No Sul e Centro da China e no Japão e Coréia, a *P. pyrifolia* (Burm.) Nak. é a principal espécie.

No Brasil, até o presente, as híbridas entre a *P. communis* e a *P. pyrifolia*, são as mais cultivadas. Nos Estados do Sul, algumas cultivares de *P. communis*, como: 'Packam's Triumph', 'Bartlett' etc., de *P. pyrifolia*, como: 'Nijisseiki', 'Housui', Kousui' e 'Ya-Li', começam a adquirir importância (Ribeiro *et al.*, 1986; Nakasu & Leite, 1989; Brighenti *et al.*, 1994).

5.3 HISTÓRIA DO MELHORAMENTO

A mais antiga escrita sobre o cultivo de pereira na Europa data de 1000 anos a.C., segundo Hedrick *et al.*(1921).

Pelo século XVI e XVII, a França era a maior produtora de pêras. Em 1628, Le Lectier, tinha mais de 254 cultivares no seu jardim. Durante o século XVIII a cultura e o melhoramento da pêra na Bélgica teve o seu ponto alto com os trabalhos de Hardenpont, Van Mons e outros. Foi quando se conseguiu os maiores progressos com o lançamento de centenas de cultivares, sendo que algumas delas, como a 'Beurre Bosc', ' Beurre D'Anjou', 'Flemish Beauty' e 'Winter Nelis', são cultivadas até hoje. A cultivar William's Bon Cretien (Bartlett) foi obtida na Inglaterra ao redor de 1796 e é até hoje uma das mais importantes no mundo. Por volta deste período surgiu também, na Inglaterra, a 'Conference' ainda muito importante comercialmente (Morettini *et al.*, 1967; Layne & Quamme, 1975).

No Brasil, o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) vem desenvolvendo cultivares através de introduções e hibridações desde a década de 1960, tendo lançado diversas cultivares como: 'Seleta', 'Triunfo', 'Tenra', 'Centenária', 'Limeira' e 'Primorosa', com adaptação a regiões com menos de 200 h de frio hibernal (Ojima *et al.*, 1986; 1987). A Embrapa Clima Temperado, também, ao longo dos anos vem testando cultivares e seleções avançadas e feito algumas hibridações, tendo lançado a cultivar 'Cascatense' (Nakasu & Leite, 1992). A Estação Experimental de Caçador, da EPAGRI, está iniciando um trabalho de melhoramento genético da pereira. A pesquisa com pereiras, de uma forma mais sistemática, está recém-iniciando nos Estados do sul do Brasil.

É necessário desenvolver cultivares para consumo fresco e/ou para fins industriais, com exigência em frio hibernal entre 200 e 600 horas (temperaturas < 7,2°C) e com resistência a entomosporiose causada pelo fungo *Fabraea maculata* Atk. e sarna causada pelo fungo *Venturia pirina* Aderh. Existem cultivares de pereiras asiáticas e híbridas entre européias e asiáticas com boa adaptação e com resistência a uma ou outra doença.

Cultivares mais recentes do Japão, Estados Unidos e países europeus estão sendo introduzidas e avaliadas juntamente com seleções avançadas dos programas de melhoramento genético do IAC, IAPAR, EPAGRI e Embrapa Clima Temperado.

Deverão também ser buscados porta-enxertos adaptados às condições edafoclimáticas do Sul do Brasil, resistentes às doenças e pragas das raízes, a solos ácidos com alto teor de alumínio e que proporcionem eficiência produtiva às cultivares copa.

As espécies mais importantes, comercialmente, são a *Pyrus communis* L. (pêra européia) cujas características são: polpa macia, amanteigada e as frutas geralmente periformes (em forma de sino), e a *Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak (pêra asiática), também chamada de orientais, chinesa, japonesa ou pêra-maçã cujas frutas possuem polpa crocante, formato arredondado, achatado ou mesmo periforme (Nakasu & Leite, 1989; Souza,1999).

O cultivo da pereira dá-se em todo o mundo, sendo as regiões de maior produção a Europa e a Ásia (Faoro, 1991). Destaca-se como maior produtor mundial a China, que apresentou no período entre 1989-1993 uma produção média de 2,7 milhões de toneladas, o que representa 27,6% da produção mundial. Em seguida vem a Itália com 885 mil toneladas (8,9%) e os Estados Unidos com 843 mil toneladas (8,5%) (Maia *et al.*, 1996).

Além destes países grandes produtores, a cultura da pereira encontra-se em forte expansão em outros países como é o caso da Argentina que passou de 227 mil toneladas em 1989 para 370 mil toneladas em 1993, seguida pelo Chile e a África do Sul que também apresentaram forte incremento na produção no mesmo período. A Argentina foi apontada como o principal país exportador entre os anos de 1989 e 1993, comercializando cerca de 153,2 mil toneladas (15,0%, da exportação mundial), seguida pelos Estados Unidos com 113,7 mil (11,2%), pelo Chile com 111,9 mil (11,0%) e pela Itália com 105,7 mil toneladas (10,4%). Quanto aos países importadores os principais são: Alemanha, Itália, Grã-Bretanha, França e Países Baixos (Maia *et al.*, 1996).

O principal problema é a falta de cultivares copa e de porta-enxertos que garantam a produção de frutas de boa qualidade. As cultivares hoje existentes, apresentam problemas de adaptação ao clima, suscetibilidade a doenças, produção inconstante, abortamento de gemas florais etc.

A pêra é a terceira fruta de clima temperado mais consumida no Brasil, seguindo a maçã e o pêssego. O consumo anual é da ordem de 160.000t, produz 19.800t, importando grande parte da Argentina, Chile e Uruguai. Este consumo poderá ser dobrado facilmente se aumentar o poder aquisitivo do consumidor brasileiro ou se o produto for ofertado a preços mais acessíveis.

O Rio Grande do Sul participa com 40% da produção, seguido de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Nakasu, 1992).

Todas as regiões do Brasil, onde a macieira se expandiu nos últimos 25 anos, têm condições de explorar a pereira, aproveitando inclusive as mesmas infra-estruturas de *packing* e armazenamento a frio. Outras regiões, como as da fronteira sudoeste do Rio Grande do Sul, também têm condições privilegiadas de clima para exploração da pereira.

Cultivares européias produzem frutas de ótima qualidade, mas são muito exigentes em frio hibernal e sensíveis a doenças. Algumas cultivares asiáticas apresentam melhor adaptação climática que as européias, boa tolerância à entomosporiose e sarna, e produzem frutas de boa qualidade, mas muito sensíveis ao manuseio pós-colheita.

Trabalhos de hibridações e aumento da variabilidade genética, através de introduções de cultivares e seleções são necessários para consolidar a exploração econômica de pêras no Brasil.

O abortamento de gemas florais de pereiras ocorre em todas as áreas de plantio, sendo conhecido pela designação geral *budjump* (Kingston *et al.*, 1990). A cultivar 'Housui', parece ser a mais afetada por *budjump*. A ocorrência de abortamento de gemas florais tem sido observada por diversos autores, em pessegueiro, em pereira, e diversas causas foram especuladas, como insuficiência de frio hibernal, desequilíbrio nutricional, competição por nutrientes e ocorrência de desordens de origem genética ou patológica. Na Nova Zelândia, não há evidências de que algum fator do meio seja responsável pelo *budjump*, entretanto é possível que a combinação de fatores possa ser responsável por esse problema (Kingston *et al.*, 1990). No Brasil, Herter *et al.* (1994), Nakasu *et al.* (1995) e Arruda (1998), observaram o abortamento de gemas florais de sete cultivares de pereira nas condições de Pelotas-RS. Um dos aspectos observados foi a diferença na intensidade do problema entre as cultivares.

5.4 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO

Os programas de melhoramento genético da pereira no Brasil, buscam fundamentalmente:

- obter cultivares adaptadas às condições de inverno ameno com acúmulo de frio de 200 h a 600 h, preferencialmente resistentes a doenças e pragas, e produtoras de frutas de alta qualidade;
- obter cultivares sem problemas de abortamento de gemas florais;
- indicar ou obter porta-enxertos para pereiras, que apresentem boa compatibilidade com cultivares copa, resistentes a doenças, acidez e alto teor de alumínio do solo.

6. MÉTODOS DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS

O melhoramento de plantas frutíferas segue as etapas comumente, utilizadas em outras espécies, isto é, introdução, caracterização, hibridação e seleção. Elas têm entretanto, por serem plantas de reprodução assexuada, algumas particularidades interessantes. Normalmente, se pensa em uma progênie F_1, uniforme. Em espécies de reprodução assexuada isto não acontece. Não se costuma fazer hibridações de linhagens homozigotas, mas cruzamentos entre seleções ou cultivares geralmente, bastante heterozigotas, produzindo uma progênie F_1 com grande variabilidade.

Uma vez selecionado determinado indivíduo, ele é multiplicado por enxertia, não havendo portanto, necessidade de várias gerações de autofecundação, para a obtenção de alto grau de homozigose. De certa forma, a possibilidade de multiplicação assexuada, compensa o tempo maior, necessário ao ciclo de espécies perenes, do cruzamento à primeira avaliação da progênie.

6.1 INTRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA

Para que se possa estabelecer um bom programa de melhoramento é necessário que se tenha variabilidade no germoplasma disponível, e que as diferentes seleções e cultivares estejam bem caracterizadas quanto aos aspectos agronômicos e de produção, principalmente.

A menos que se busque características específicas – resistência a doenças – por exemplo, não se costuma introduzir espécies silvestres ou *landraces*. Em geral, se introduz predominantemente, germoplasma já melhorado e, na medida do possível, originário de locais com condições climáticas similares à região onde será introduzido.

Há casos em que é necessário recorrer a espécies afins, como fonte de determinado caráter. Foi o que ocorreu com o gene Vf, de *Malus floribunda*, para resistência à sarna, o qual foi utilizado pelo programa cooperativo das Universidades de Illinois, Rutgers e Purdue, nos Estados Unidos.

6.2 HIBRIDAÇÃO

Um aspecto importante na hibridação é a escolha dos genitores, a qual é, em geral, baseada em características complementares. O conhecimento sobre o modo de herança das características e o conhecimento do valor como genitor do germoplasma disponível na coleção do melhorista são extremamente úteis.

A hibridação envolve diversas etapas: coleta de pólen do genitor masculino, emasculação das flores e polinização da planta mãe. Nas condições do sul do Brasil, procura-se que pelo menos um dos pais tenha baixa exigência em frio hibernal.

6.3 COLETA DE PÓLEN

O pólen deve ser coletado de flores bem desenvolvidas, mas ainda não abertas. Em flores já completamente abertas, pode haver dois problemas: a) as anteras já estarem deiscentes; b) a flor já ter sido visitada por insetos, que podem trazer consigo pólen estranho, de outra planta ou cultivar que não a que se deseja usar como genitor masculino. Isto acarretaria misturas na futura progênie. Em flores do tipo campanuladas, as anteras podem estar expostas, mesmo antes de ocorrer a antese. A menos que seja evidente a presença de pólen (as anteras já estariam deiscentes), estas flores seriam adequadas para a coleta de pólen.

As flores devem ser colhidas em saquinhos de papel. Plástico condensa umidade e não é aconselhável. Se a separação das anteras não puder ser feita imediatamente, as flores deverão ser conservadas em refrigerador (2°C a 4°C).

Segundo Layne (1983) os botões florais ainda fechados e coletados em sacos de papel, devem ser conservados em refrigerador a 5°C, ou de acordo com Scorza & Sherman (1996), entre 2°C e 4°C, até que as anteras sejam removidas. Isso é feito puxando-se as pétalas pela parte distal, para expor as anteras. Os botões florais são

então, invertidos sobre uma peneira de malha fina (1,5 - 2 mm) e esfregados gentilmente, sobre a tela. As anteras atravessam a tela e caem sobre uma pequena bandeja de papel, devidamente identificada e com a data da coleta. As pequenas bandejas são deixadas no laboratório, à temperatura ambiente, aproximadamente 23°C e fora do alcance da luz solar direta. Normalmente, a deiscência das anteras ocorre 24 e 36 horas, após a coleta. A malha de 2 mm é grande demais para as anteras de ameixeira e demasiado pequena para as de macieira ou pereira. Neste caso, as anteras podem ser destacadas com o auxílio de uma pinça ou com os próprios dedos.

Após secas, as anteras e o pólen são recolhidos para pequenos frascos de vidro, tamponados com algodão, e colocados em dessecador com substância higroscópia que pode ser sílica gel ou uma solução de ácido sulfúrico. No caso dessa última, nos trabalhos do CPACT, é utilizada a proporção de 23 mL de ácido sulfúrico para 50 mL de água destilada.

De acordo com Scorza & Sherman (1996) se o pólen for usado no mesmo ciclo vegetativo em que foi colhido, ele pode ser mantido à temperatura ambiente, sem receber luz solar direta. Quando se deseja conservar o pólen para usá-lo no ano seguinte, como é o caso de cruzamentos que envolvam o genitor feminino precoce e o masculino tardio, os dessecadores devem ser colocados em congeladores a aproximadamente -18°C. No laboratório de melhoramento da Embrapa Clima Temperado, tem-se mantido pólen de pessegueiro por até 3 ou 4 anos, ainda com razoável a boa porcentagem de pólen viável. King & Hesse (1938) concluíram que é possível armazenar o pólen e mantê-lo viável por 1 ou 2 anos, com temperatura entre 0°C e 2°C e umidade de 25%. Já Parfitt & Almehdi (1984) consideram que em nitrogênio líquido, o pólen pode ser conservado indefinidamente.

Em geral, o pólen da maioria das espécies retém melhor sua viabilidade a umidade relativa de 0 a 30%. Entretanto, a umidade relativa ótima varia com a temperatura. Visser citado por Galetta (1983), dá o exemplo de pólen de macieira, mantido por 770 dias à temperatura de 2°C a 4°C e umidade relativa de 10% o qual apresentou 60% de germinação *in vivo*. O mesmo pólen, teve 60% de germinação ou mais, apenas até 63 dias de armazenamento, se armazenado com 10% de umidade relativa, à 17°C a 22°C de temperatura.

Alguns melhoristas costumam forçar ramos de algumas cultivares, antes do período de floração e, portanto, de hibridação para obter pólen antes que o mesmo seja necessário. Podem ser usados ramos de 1,0 a 1,5 m, embora ramos mais curtos possam ser utilizados. A base dos ramos deve ser cortada em bisel, com ângulo de 45°, para permitir a absorção de água. A cada três ou quatro dias, a água deve ser mudada e o corte basal dos ramos renovado. É possível manter os ramos à temperatura ambiente, em luz difusa ou no escuro. Dias ensolarados facilitarão o ressecamento dos ramos se eles estiverem em casa de vegetação (Layne, 1983).

6.4 ANÁLISE DO PÓLEN

Existem basicamente, três formas de análise de pólen: a) exame descritivo, em que os grãos de pólen são caracterizados morfologicamente, a fim de observar diferenças entre espécies de plantas, genótipos, níveis de ploidia; b) testes de viabilidade, nos quais o pólen é testado a fim de determinar se ele é capaz de germinar, crescer e

fertilizar; c) testes fisiológicos para determinar seus conteúdos, constituintes orgânicos e inorgânicos, atividades das substâncias de crescimento e a bioquímica do seu desenvolvimento. Os melhoristas estão, em geral, mais interessados nos testes de viabilidade e nos descritivos.

6.4.1 TESTES DE VIABILIDADE

Em geral, considera-se quatro diferentes métodos para verificar a viabilidade do pólen: a) germinação *in vitro*; b) exame microscópico após o uso de corantes; c) germinação *in vivo*, observada nos pistilos; d) formação de sementes após polinização normal (Galetta, 1983).

A viabilidade do pólen de ameixeira pode ser determinada utilizando-se corantes. Norton (1966) utilizou 12 corantes de sais de tetrazólio, concluindo que o melhor deles para corar grãos-de-pólen de ameixeira e determinar a sua viabilidade foi 3- (4,5 dimetil tiazólio -1,2) -2,5 brometo de difenil tetrazólio (MTT). Este autor obteve uma correlação de 0,99 entre a porcentagem de pólen corado e a porcentagem de germinação em nove genótipos de *Prunus salicina*. Entretanto, outros autores como Parfitt & Ganeshan (1989), encontraram uma correlação muito baixa entre a coloração do pólen por MTT e a germinação do pólen *in vitro*. Não raro se obtém uma idéia superestimada da viabilidade do pólen pelo uso de corantes pois, muitas vezes, pólens não viáveis, ainda possuem uma quantidade de enzima suficiente, amido etc., receptiva ao corante. A germinação *in vitro*, por sua vez, subestima a viabilidade, o que do ponto de vista, de uso em hibridações é preferível. O método mais utilizado, nos programas locais de melhoramento é o da germinação *in vitro*.

Embora hajam diferenças entre pesquisadores quanto ao meio utilizado (concentração de sacarose; se meio gelatinoso ou gota pendente etc.), as diferenças são pequenas. Na Embrapa Clima Temperado é utilizado um meio preparado com 1g de ágar e 10g de sacarose (ou açúcar cristal) para 100 mL de água destilada. Algumas espécies frutíferas, entretanto, necessitam de outras substâncias. Pólen de algumas cultivares de ameixeiras, germinam melhor quando em presença de 20 a 40 ppm de ácido bórico (Carvalho, 1989).

O meio é aquecido para dissolver completamente o ágar, sem entretanto, chegar à ebulição. Ainda quente, são colocadas 3 a 4 gotas de meio em lâmina escavada ou adaptada para testes desse tipo. Podem ser utilizadas lâminas comuns nas quais é afixado um anel de tubo de PVC de 1,5 cm de diâmetro e, aproximadamente, 0,4 cm de altura, a fim de permitir a colocação do meio no interior do anel, o qual deve ser bem regular, passando-se previamente em esmeril. O pólen a ser testado é então, polvilhado levemente sobre a superfície do meio de cultura, com auxílio de um pincel. As lâminas são cobertas com lamínulas e colocadas em placa de Petri, com papel absorvente umedecido ao fundo, para simular uma câmara úmida. As placas de Petri são então, deixadas à temperatura de aproximadamente 25°C. Três a quatro horas após, pode ser feita a contagem dos grãos de pólen germinados e não germinados. Sob microscópio ótico de rotina, são contados dois ou mais campos de 100 a 200 grãos de pólen, dependendo da precisão desejada.

A porcentagem de germinação é variável com a cultivar, com as condições em que foi realizada a coleta do pólen, condições de secagem, meio de cultura e até a qualidade do ágar utilizado. Um bom pólen terá em geral, 50 - 85% de grãos de

pólen germinados. Entretanto, nas hibridações realizadas são utilizados pólen com 30% ou mais de germinação e, em alguns casos (por exemplo, pólen recebido do exterior), até com menor porcentagem.

A sacarose pode ser substituída por açúcar de cana. Segundo Hesse (1975) o açúcar de beterraba pode reduzir ou até inibir completamente a germinação de pólen, dando um resultado errôneo.

6.4.2 GERMINAÇÃO IN VIVO

A germinação *in vivo*, pode ser observada, emasculando-se as flores e polinizando-as, a campo ou no laboratório.

O mais comum é cortar-se ramos do ano anterior, colocá-los em água e castrar e polinizar suas flores. Após determinados períodos de tempo, os pistilos são retirados e colocados em fixativo. A seguir podem ser usados dois métodos: o primeiro, descrito por Perez-Gonzalez (1984) utiliza a anilina azul como corante e faz as observações em microscópio fluorescente; o segundo, é uma adaptação do método descrito por Wilson & Brown (1957), em estudo sobre germinação de pólen de gramíneas, feita por Carvalho (1989). É utilizado um corante diferencial (Lacmoide). Nos dois métodos são utilizados fixativo constituído por formalina, ácido acético e etanol, na proporção de 1:1:8. Para amaciar os tecidos, utiliza-se uma solução 8N de Na OH, na qual se coloca os pistilos por um período aproximado de 24 horas, dependendo da espécie. Posteriormente, os pistilos são lavados e colocados em água destilada por aproximadamente 24 horas. Para clarear os tecidos e aumentar o contraste do tubo polínico com o estilete, utiliza-se solução de hipoclorito.

6.5 EMASCULAÇÃO E POLINIZAÇÃO

6.5.1 PESSEGUEIRO

Os estames das flores de pessegueiro são unidos à corola, na porção basal e podem ser removidos cortando-se o tubo floral abaixo do ponto de inserção dos estames. Isto pode ser feito com auxílio de uma pequena tesoura.

A emasculação é mais fácil se for realizada em flores próximas da antese. As anteras e mesmo o estigma podem ser vistos em botões florais (fechados) de flores campanuladas. Estes botões florais não são visitados por insetos e podem ser usados em cruzamentos (Scorza & Sherman, 1996).

Pode ser feita a emasculação e polinização em parte de uma planta ou na planta inteira. No caso de ser realizada em parte da planta, deve ser usado todo um lado da mesma ou deve-se começar o processo da parte mais alta, descendo até que se tenha o número desejável de flores. Isto evita que haja contaminação com o pólen da mesma planta mãe, por gravidade.

Nas condições de clima do Sul do Brasil, a floração de uma mesma planta pode estender-se por 10 a 15 dias. No primeiro dia em que se faz a emasculação, são retiradas todas as flores já abertas. Aquelas em estádio de balão são castradas e polinizadas. No dia seguinte ou depois de dois dias, volta-se à mesma planta repetindo-se o processo, isto é, eliminando as flores abertas, emasculando e polinizando aquelas em balão e deixando-se as que estão com estádio de desenvolvimento mais atrasado, para serem emasculadas na próxima vez, e assim sucessivamente, até que se tenha

polinizado o número de flores desejado, quando então, são retirados os botões remanescentes, não emasculados e polinizados.

A polinização é feita logo após a emasculação da flor, entretanto pode ser realizada um ou até dois dias após a mesma, dependendo das condições de temperatura e umidade. Ela pode ser realizada com o dedo, com um pequeno pincel ou com um bastão de vidro, com bastante pólen. Após cada cruzamento realizado, as mãos ou os utensílios utilizados devem ser lavados em álcool 70%, antes de trabalhar com o próximo pólen.

A necessidade de proteger as flores emasculadas e polinizadas, quando a finalidade é o melhoramento, a criação de cultivares, é discutível. O mesmo não acontece se a finalidade são estudos genéticos.

Scorza & Sherman (1996) apresentam cinco possíveis causas de autopolinização ou polinização cruzada acidental: a) visita por abelhas ou outros insetos, o que raramente ocorre em flores já emasculadas; b) cleistogamia facultativa, mais comum sob condições de baixa umidade; c) movimento de pólen pelo vento ou gravidade – o pólen de *Prunus* é relativamente pesado e a polinização por vento é limitada, exceto a distribuição do mesmo por gravidade, com vento; d) falha humana, falta de atenção; e) não lavar adequadamente as mãos ou instrumentos com álcool.

Caso se julgue necessário proteger as flores, podem ser usados sacos de papel, preferencialmente de papel encerado, sacos plásticos desde que com diversos furos para melhor aeração, ou mangas de algodão ou tela de malha muito fina (para prevenir a entrada de insetos), ou ainda 'gaiolas', cobertas de plástico ou tela anti-insetos que cubram toda a planta.

As plantas ou galhos nos quais foram realizados os cruzamentos devem ser convenientemente marcados e mapeados, para chamar a atenção na hora da colheita.

6.5.2 AMEIXEIRA

A emasculação das flores pode ser feita com auxílio de pequena tesoura (como as utilizadas por bordadeiras) ou das próprias unhas do operador, ou ainda com auxílio de uma lâmina em forma de V com as extremidades superiores dobradas e com um dente cortante (Okie & Weinberger, 1996).

Muitos melhoristas obtiveram baixas porcentagens de frutificação nas polinizações de flores emasculadas. Tal insucesso é atribuído a danos ao pistilo durante a emasculação ou por condições climáticas (Okie & Weimberger, 1996).

Se a cultivar utilizada como genitor feminino for auto-infértil, não há necessidade de emasculação. Algumas cultivares podem apresentar uma baixa porcentagem de frutificação, por autopolinização, o que, do ponto de vista de melhoramento, não causa grandes problemas. Em estudos citológicos e genéticos, entretanto, a emasculação é necessária. Caso as flores não sejam emasculadas, elas devem ser protegidas de visitas de insetos, utilizando-se sacos de papel encerado ou 'mangas' de filó ou algodão.

Uma outra forma bastante utilizada é proteger a planta toda com uma gaiola de tela antiinseto ou mesmo com plástico na parte superior e tela nas laterais. Nestas gaiolas pode-se colocar, em recipientes com água, ramos de flores de seleções ou cultivares que se deseja usar como genitor masculino. Coloca-se sob a mesma gaiola uma caixa (pequena) de abelhas e deixa-se que elas executem a polinização. As abelhas

podem precisar de uma fonte extra de alimento, como mel, enquanto trabalham em uma planta. O método é bastante simples, mas apresenta alguns problemas. Nas condições de clima do Sul do Brasil, não raro, ocorrem dias nublados e ventosos, durante a floração dificultando o trabalho das abelhas. Uma solução alternativa, é fazer a polinização manualmente, nas flores da planta protegida pela gaiola, tão logo elas abram. A polinização pode ser feita com o dedo indicador, com um pincel, um bastão de vidro, um lápis borracha ou a extremidade arredondada de uma caneta. As mãos e os instrumentos utilizados devem ser muito bem limpos com álcool 70%, após trabalhar-se com um pólen e antes de utilizar outro.

Outra dificuldade, quando se usa abelhas e buquê de flores, é a falta de coincidência entre a floração da planta mãe e aquela da qual se quer usar o pólen. Neste caso, anteriormente à floração do genitor feminino, devem ser colhidos ramos do genitor masculino, colocados em água ou preferencialmente, em água com açúcar ou solução nutritiva e mantidos em temperatura superior a 20°C, para acelerar a floração ou em câmara fria para atrasá-la.

Em situação, nas quais a pureza genética não é essencial, os melhoristas costumam colher sementes obtidas por polinização aberta. Isto pode ser feito em plantios comerciais onde duas cultivares com características desejáveis e/ou complementares se encontram intercaladas.

Alguns melhoristas plantam pequenos blocos isolados com linhagens elite. Sementes dos policruzamentos assim obtidos podem ser coletados em um tipo de seleção recorrente. Este método é interessante para se conseguir grande número de progênies onde a baixa adaptação devido à condições climáticas ou suscetibilidade a doenças, fará com que muitos *seedlings* sejam eliminados. Os genes para melhorar a adaptabilidade serão concentrados com menor esforço do que com polinizações manuais (Okie & Weimberger, 1996).

6.5.3 MACIEIRAS E PEREIRAS

Plantas de macieiras e pereiras não necessitam ser obrigatoriamente, emasculadas, uma vez que a maioria delas não é fertilizada pelo seu próprio pólen e, algumas são até macho-estéreis, como as cultivares de pereira, 'Tenn' e 'Magness'.

Entretanto, em geral, se faz a emasculação quando os botões florais estão no estádio de balão. A remoção das pétalas, no processo de emasculação serve a três propósitos: a) prevenir autopolinização (apesar de que a auto-incompatibilidade torne a autopolinização muito rara); b) expor os estigmas facilitando a polinização cruzada, realizada manualmente; c) minimizar a visita às flores, de abelhas e outros insetos polinizadores, reduzindo contaminação por pólen desconhecido (Janick *et al.*, 1996).

Geralmente, são emasculadas e polinizadas duas a três flores por cacho floral, sendo as demais removidas. Frutas originárias de flores emasculadas são facilmente reconhecidas por ocasião da colheita, pois não apresentam cálice.

Caso se faça a opção de polinizar sem previamente emascular as flores, então elas devem ser protegidas, ensacando-as para prevenir a visita de insetos. Os cachos florais deverão ser identificados, para que se possa colhê-los separadamente, uma vez que essas frutas não serão diferentes das demais frutas da planta. Outra maneira é cobrir a planta toda, com uma "gaiola" de tela e marcar os cachos florais polinizados.

Caso se faça a emasculação das flores a serem polinizadas, normalmente, não há necessidade de protegê-los.

6.6 CUIDADO COM AS SEMENTES

6.6.1 PESSEGUEIROS E AMEIXEIRAS

As frutas oriundas das flores previamente polinizadas, devem ser colhidas maduras. Com o auxílio de um tipo de "tesoura de poda" com as duas lâminas cortantes, podem ser cortados no local da sutura, a polpa e o endocarpo (caroço). Um trabalhador com prática pode cortar um grande número de frutas, sem danificar as sementes. Este é o melhor processo. Caso não se disponha de tal instrumento, aconselha-se a retirar a polpa imediatamente. Os caroços com algum resto de polpa podem ser tratados com formaldeido a 5%, durante 5 minutos. Logo após, devem ser deixados secar. Pode-se então, parti-los com auxílio de instrumento apropriado ou até mesmo de um bom alicate ou martelo, cuidadosamente, para não ferir as sementes.

Estas são removidas do endocarpo, tratadas com solução de hipoclorito de sódio ou com solução aquosa de timerosal, e colocadas em saquinhos plásticos contendo papel filtro previamente esterelizado e embebido em solução fungicida. Os saquinhos são vedados com calor (até mesmo, um ferro elétrico pode ser usado), e colocados em câmara fria para estratificação. Alguns autores, como por exemplo Scorza & Sherman (1996) recomendaram variações desse método utilizando erlenmeyers etc., mas o método aqui descrito tem funcionado muito bem, sendo o mais utilizado pelos programas de melhoramento do Sul do Brasil.

Os saquinhos são checados periodicamente, para verificar a umidade. Caso seja insuficiente, pode ser adicionada com auxílio de um aparelho de injeção. O período de estratificação varia para o germoplasma brasileiro, de 60 até mais de 90 dias, e tem relação com a exigência em frio da planta mãe, conforme foi demonstrado por Rodriguez & Sherman (1985).

As sementes deverão ser deixadas na câmara fria até que iniciem o processo de germinação, ou seja, que apresentem radículas de pelo menos 0,5 cm. Elas podem ser plantadas em caixas de sementeira, em casa de vegetação ou telado, conforme a temperatura ambiente.

Neste sistema, os *seedlings* são levados a campo, no primeiro inverno após a realização das polinizações e três anos após as mesmas, os *seedlings* podem ser avaliados pela primeira vez. Em geral, na primeira frutificação, eliminam-se as plantas indesejáveis e raras são as seleções efetuadas. É preferível esperar uma segunda avaliação, um novo ciclo, para então, selecionar os genótipos interessantes e eliminar todos os demais. Os genótipos selecionados são enxertados e colocados em coleção, para avaliação mais criteriosa.

6.6.2 MACIEIRAS E PEREIRAS

As frutas originárias de hibridações devem ser colhidas próximo à maturação. As sementes devem ser cuidadosamente removidas e muito bem lavadas. Alguns melhoristas costumam desinfestar as sementes em uma solução de 10 g de hipocloito de sódio em 140 mL de água destilada, por cinco minutos e, após lavá-las em água

destilada. Outros, costumam deixar as sementes de um dia para outro em solução saturada de fungicida. Se elas não se destinam ao plantio nas sementeiras no mesmo ano, elas podem ser conservadas secas. Caso contrário, as sementes devem ser submetidas à estratificação, colocando-as em saquinhos plásticos contendo papel filtro esterilizado e umedecido em solução fungicida. A temperatura ótima para estratificação é de 3°C a 5°C, para sementes de macieiras e o tempo pode variar de 6 a 14 semanas, dependendo do germoplasma e da temperatura. Hartman *et al.* (1990) referem-se à necessidade de estratificação das sementes de pereira por 60 a 90 dias, a temperatura entre 0°C e 7°C. Westwood & Bjornstad citados por Bell *et al.* (1996), dizem que as espécies de clima ameno necessitam um período de estratificação mais curto do que aquelas de clima frio, porque as primeiras têm uma temperatura ótima mais alta (7°C a 10°C) do que as últimas (3°C a 5°C).

6.7 EMBRIOCULTURA

Sementes de pessegueiros e ameixeiras, oriundas de cruzamentos com cultivares ou seleções de maturação precoce, não germinam em condições naturais. Frutas com curto período de desenvolvimento, têm a maturação da polpa antes que o embrião esteja completamente desenvolvido. O cultivo do embrião *in vitro*, faz-se necessário para que esses embriões maturem e permitam o desenvolvimento dos *seedlings* (Scorza & Hammerschlag, 1992). Quezada *et al.* (1998) concluíram que se as sementes tiverem peso seco inferior a 28,9% ou se o número de dias entre a floração e a maturação for inferior a 115 dias, as mesmas deverão ser submetidas à embriocultura para que se tenha uma percentagem de germinação superior a 70%.

Smith *et al.* (1969) descreveram todo o procedimento e cuidados básicos da embriocultura. Theobald & Hough (1960) usando 16 genótipos de pessegueiro, concluíram que embriões colhidos de frutas 75 a 80 dias após a plena floração têm maior chance de sobrevivência. Na Califórnia, Ramming (1990) tem obtido bons resultados utilizando o meio Smith *et al.* (1969), no cultivo de embriões com 70 a 72 dias após a floração, entretanto para embriões com 5 mm necessita-se utilizar meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com adição de sucinato de potássio e L glutamina. Há, seleções cujas frutas, amadurecem tão rápido que, por ocasião da colheita, os embriões têm apenas 1 mm. Nesse caso, deve ser usada a cultura de óvulos, com o meio de Stewart & Hsu (1977).

Na embriocultura, o meio a ser utilizado depende do desenvolvimento do embrião mas também pode dar resultados distintos, conforme o germoplasma a ser posto em cultura. Raseira (1998) testou quatro meios diferentes em embriões com 10 a 12 mm de comprimento, e obteve os melhores resultados com os meios Smith *et al.* (1969) e *Wood Planta Media* (Lloyd & McCown, 1981).

Em linhas gerais, o procedimento consiste em colher as frutas no início da mudança de cor da película, portanto, antes do ponto de maturação utilizado para colher frutos para comercialização. As frutas são desinfetadas em álcool 70%, durante 10 minutos.

O álcool pode ser substituído por uma solução de 0,25% de hiplocorito de sódio. Com o auxílio de uma tesoura (tipo tesoura de poda com as duas faces cortantes), previamente flambada, corta-se a polpa e o endocarpo, retirando-se as

sementes, com auxílio de uma pinça, também flambada. Este procedimento é realizado em câmara de fluxo laminar, com todas as condições de assepsia. Pode ser feita uma flambagem muito rápida das sementes. Cuidadosamente, é feita a retirada do tegumento e o plantio das sementes. previamente tratadas, em tubos de ensaio contendo o meio.

A grande diferença entre a embriocultura e a cultura de óvulos é que, nesta última, as sementes com os tegumentos, são colocados inicialmente, logo após a assepsia, em frascos com meio líquido Stewart & Hsu (1977) e sobre uma "ponte" de papel filtro esterilizado.

Os frascos, que podem ser erlenmeyers, são conservados à temperatura de 27°C por 16 dias. Posteriormente, é realizada a retirada do tegumento e os embriões vão para tubos de ensaio com meio, que pode ser o de Smith *et al.* (1969) e então para câmara fria. Ramming (1985) faz uma boa descrição do processo.

6.8 SELEÇÃO

A seleção dos genótipos, bem como das seleções candidatas a serem introduzidas como novas cultivares, é muito subjetiva, dependendo da experiência do melhorista, do seu conhecimento, do germoplasma disponível, dos objetivos do programa e das cultivares comerciais, já estabelecidas, e da mesma época, com as quais a nova seleção deverá competir. A rigidez na seleção depende também do estágio em que se encontra o programa de melhoramento. Se o mesmo está iniciando costuma ser menos estrita que em programas mais adiantados.

Não há uma regra para a seleção visando caracteres quantitativos, que, em geral, são aqueles economicamente mais importantes. Uma avaliação de correlações de caracteres aliado ao conhecimento sobre a herdabilidade de determinado caráter são essenciais para um planejamento racional.

Seleção para a resistência a doenças, por exemplo, que é a prioridade número um do programa de melhoramento da região Sul do Brasil, necessita de uma metodologia específica. É preciso conhecer a relação patógeno-hospedeiro, ter boas fontes de resistência à doença, estudar o modo de herança da resistência e ter um bom método de *screening* e seleção dos indivíduos resistentes. É interessante, nesse caso, que o programa tenha a estreita colaboração de um fitopatologista. Quando não se consegue preencher todos os requisitos, anteriormente expostos, costuma-se fazer a avaliação das plantas baseadas na incidência da doença, em condições de campo; o ideal entretanto, é a inoculação do patógeno em condições controladas.

6.9 ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR O PERÍODO DE JUVENILIDADE

Dentre as fruteiras de clima temperado, aqui discutidas, a pereira e a macieira apresentam os mais longos períodos de juvenilidade, seguidas pela ameixeira.

Alguns melhoristas procuram abreviar a juvenilidade, reduzindo tempo, esforços e recursos necessários até a pimeira avaliação dos *seedlings* de uma progênie. Uma das estratégias é valer-se das correlações de caracteres entre plantas jovens e adultas. Embora sejam citadas várias correlações de caracteres, apenas umas poucas têm um valor real para o melhorista. Uma das correlações, usualmente citadas é aquela entre a porcentagem de vermelho na epiderme da maçã e a pigmentação de antocianina em outras partes da macieira. Outras correlações interessantes, em

macieira, são entre brotaçãotardia com a floração tardia e entre duração de juvenilidade e a idade de frutificação dos clones propagados vegetativamente (Brown, 1975).

Outra estratégia utilizada, para atenuar o problema da demora na avaliação devido à juvenilidade, é fazer uma pré-seleção e enxertar as melhores plantas de cada cruzamento sobre porta-enxerto nanizante. Com a finalidade de antecipar a primeira frutificação, é retirado um garfo da parte superior do líder de cada planta de dois anos, pré-selecionada no viveiro, com base na sanidade e nas correlações de caracteres conhecidas. O garfo é então, enxertado em porta-enxerto nanizante, no caso de macieiras pode ser o M9, já estabelecido. Este sistema é utilizado na Estação Experimental de Caçador, EPAGRI.

O uso de reguladores de crescimento, como Alar e Etephon aumenta a diferenciação floral, o que resulta em maior quantidade de frutas para avaliação e testes de armazenamento, no primeiro ano de produção (Denardi *et al.*, 1988).

Visser citado por Denardi *et al.*, (1988) salientou que o vigor e a ausência de características juvenis (pequenas folhas e espinhos) estão fortemente correlacionadas com curto período de juvenilidade.

6.10 MUTAÇÃO COMO MÉTODO DE MELHORAMENTO

Uma mutação é uma variação de uma característica herdável que ocorre em uma célula da qual, eventualmente, pode se desenvolver uma gema; esta produz um broto e mais tarde um ramo que difere, geralmente, de um caráter, da planta da qual ele se origina.

O interesse do melhorista em induzir artificialmente, mutações, é aumentar a variabilidade. Apesar de todo o esforço já dispendido no passado, o melhoramento através de mutação não produziu genitores ou cultivares de frutas de caroço que se sobressaíssem positivamente das demais. Entretanto, pode ser uma ferramenta interessante para o melhorista. Lapins (1983) apresentou uma discussão detalhada sobre o uso de mutações no melhoramento, tecidos a serem utilizados, doses e tipos de mutagênicos etc. Segundo este autor, na escolha de um mutagênico deve ser considerado: a) a efetividade do mutagênico – freqüência de mutação por unidade de exposição do mutagênico; b) eficiência – freqüência de mutação em relação à freqüência de efeitos indesejáveis, como aberrações cromossômicas, esterilidade e letalidade; c) especificidade – indução de uma mutação específica ou quebra de cromossomo pelo mutagênico.

No que se refere a mutações induzidas, na maioria dos trabalhos em pessegueiros foi utilizada radiação com raios gama. A chance de conseguir mutantes depende de vários fatores: dosagem, tipo de tecido irradiado e sua condição fisiológica (Scorza & Sherma, 1996).

As mutações podem afetar qualquer parte da planta. Em macieira, são mais comumente observadas as mutações que afetam as frutas; sem dúvida, ocorrem muitas outras que passam despercebidas (Brown, 1975). Há dois tipos de mutações que ocorrem em macieiras: aquelas que produzem diferenças em caracteres monogênicos da fruta ou da planta e aquelas que afetam a ploidia (Brown, 1975). Dentre as mutações mas comuns nessa espécie estão aquelas que aumentam a quantidade de antocianina nas camadas externas da epiderme das frutas, ex.: 'Lisgala', lançada pela EPAGRI, é

uma mutação da cultivar 'Gala'; a cultivar 'Fuji Suprema', lançada pela mesma empresa, é uma mutação de 'Fuji', ambas om mais vermelho na epiderme das frutas.

Mutações que afetam a porcentagem de *russeting* (distúrbio fisiológico que torna áspera a epiderme do fruto, dando um aspecto semelhante à ferrugem), para mais ou menos, também, ocorrem. Outras mutações importantes são aquelas que afetam as plantas, originando as chamadas plantas tipo *spur*.

A proporção de ocorrência de mutações em um gene pode ser aumentada pelo uso de raios x, raios gama ou por bombardeamento de neutrons. Com relação às mutações no nível de ploidia, uma peculiariedade é que nem sempre elas ocorrem nas três camadas externas da célula dando origem a quimeras. A formação de tetraplóides, embora possa ocorrer espontaneamente, pode ser estimulada pela utilização de colchicina. O uso de colchicina também pode causar mutações em outras características como cor, *russeting* e época de maturação (Brown, 1975).

Gardner *et al.*, Reiner e Donini citados por Broertjers & Van Harten (1978), citam mutações espontâneas em pereiras, como por exemplo mutações em 'Bartlett' e 'Beurré Hardy'; mutações na coloração das frutas como em 'Max Red Bartlett' e 'Red Anjou' e mutantes quanto a *russeting* como 'Russet Bartlett'.

Parece difícil selecionar plantas compactas em pereiras, sendo umas das causas atribuídas ao fato de que os danos da radiação direta permanecem por mais tempo em pereira do que em macieiras, Lacey citado por Broertjers & Van Harten (1978).

6.11 BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO

6.11.1 PESSEGUEIROS E AMEIXEIRAS

Scorza & Hanmerschlag (1992) discutem sobre o uso potencial e atual da biotecnologia no melhoramento de espécies de *Prunus*. Uma das utilidades discutidas é a obtenção de plantas com resistência às doenças. Nesse sentido merecem destaque o trabalho de Hammerschlag *et al.* (1989), no qual é utilizado o *screening in vitro* de variantes somaclonais de pessegueiro, para obtenção de resistência a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

Na revisão de Scorza & Hammerschlag (1992) são citados trabalhos que reportam mudanças no hábito de crescimento, induzidos em plantas de *Prunus*, através de cultura de tecidos. Além disso é possível identificar, *in vitro*, diferentes formas de crescimento.

Outro objetivo buscado nos programas de melhoramento e onde a biotenologia pode ser útil é a resistência aos estresses ambientais. A grande variabilidade que existe em espécies de *Prunus* quanto à resistência a fatores como danos de frio, salinidade, seca ou excesso de água, apresentam oportunidades para cruzamentos interespecíficos, seguidos de resgate de embriões, produção de híbridos somáticos, ou o isolamento e transferência de genes ligados à tolerância ou resistência a estas situações adversas.

Em projeto conjunto entre a Embrapa Clima Temperado e a Universidade Federal de Pelotas, foi iniciado trabalho no sentido de induzir mutação somaclonal, utiliando embriões imaturos e, posteriormente, fazer a seleção para resistência a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, adicionando um filtrado da bactéria ao meio de

cultivo. A rimeira parte da pesquisa foi bastante positiva, entretanto não foi conseguido um protocolo eficiente para regeneração das plantas a partir da massa de células selecionadas.

Scorza & Hammerschlag (1992) apresentam um quadro com diversos protocolos para a regeneração de espécies de *Prunus*, a partir de diferentes tecidos. Segundo os mesmos autores, a transferência de genes em *Prunus*, tem uma história muito recente. Tecido de pessegueiro derivado de plantas maturas foi transformado introduzindo-se o gene da citocinina, com o uso de *Agrobacterium tumefaciens* (Hammerschlag *et al.*, 1989).

Outras ferramentas da biotecnologia como isenzimas, RFLPs, têm sido usadas, sendo as isoenzimas utilizadas principalmente, para estudar a variabilidade, identificação de híbridos interespecíficos, identificação de genótipos e os RFLPs para identificação de genótipos, mas também para mapeamento genético.

6.11.2 MACIEIRA

A grande vantagem da engenharia genética, no melhoramento de cultivares convencionais, é que ela permite que se introduza determinada característica, em uma cultivar sem que seja modificada toda a sua constituição genética.

Em *Malus*, por exemplo, uma série de características como resistência a determinadas doenças e pragas e resistência ao frio, são encontradas em espécies que produzem frutos muito pequenos e são necessárias várias gerações de cruzamentos com cultivares melhoradas para se ter frutos de bom tamanho. Isto significa que se deve ter um grande número de *seedlings* das diferentes populações para que se recupere a resistência à sarna, junto com outras características.

O uso da engenharia genética em macieira terá um papel importante na transferência eficiente de genes úteis de várias espécies de *Malus* e de outros gêneros, como por exemplo, *Pyrus* e *Cataegus*. Por sua vez, ela envolve o desenvolvimento de método de regeneração eficiente e de transferência de genes. Estas ferramentas, como a técnica de isolamento e clonagem de gene, modificação de DNA e hibridação *in vitro* de mRNA, entre outros processos, terão um papel primordial na análise da regulação de desenvolvimento da planta (Korban & Chen, 1992).

O sucesso na regeneração de plantas, a partir de uma única célula, junto com o desenvolvimento de sistemas de transferência de genes, trarão grandes oportunidades ao melhoramento. Uma vez que a macieira apresenta ocasionalmente, mutações espntâneas, elas podem ser facilmente multiplicadas, a partir da regeneração de células *in vitro*. Isto oferece um grande potencial para explorar as variações somaclonais em maçã (Korban & Chen, 1992).

A embriocultura já tem sido utilizada, também em embriões imaturos de *Malus domestica*. A cultura de embriões de sementes de 'R1-49', 'Lodi' e 'Erovan', no meio MS suplementado com 4,4 mM BA, 0,5 mM de ácido indolbutírico e 1,5 mM de ácido giberélico resultou no desenvolvimento de plantas da germinação direta ou da formação de brotações adventícias (Zhang & Lespinasse, 1988).

Diversos autores, citados por Korban & Chen (1992), referem-se ao isolamento de protoplastos de macieira. Esses avanços são muitos úteis para fazer hibridações somáticas. Por outro lado, a pré-seleção, *in vitro*, reduz consideravelmente o tempo, espaço e recursos gastos na condução de numerosas progênies a campo.

Screening in vitro para resistência a oídio, embora difícil, já foi testado com relativo sucesso por Korban & Trier citados por Korban & Chen (1992). Foram utilizadas folhas pré-infectadas para inoculação de cultura de brotos das cultivares 'Jonathan', 'McIntosch' e 'Prairiefire'. Quando os brotos foram transferidos para um meio com água, foi observado, grande número deles com sintomas de oídio, quando originários da cultivar 'Jonathan' (82%), que é suscetíel, em comparação com 'McIntosh' (38%) e 'Prairiefire' (28%), resistentes.

Inoculação de flores destacadas de cultivares *in vitro*, de várias cultivares de macieira resistentes e suscetíveis à sarna com uma suspensão de conídios de *Venturia inaequalis* permitiu o *screening* das suscetíveis e resistentes (Yepes & Aldwinkle, 1989).

Na Embrapa Clima Temperado, o Dr. Gerson de L. Fortes vem trabalhando em mutação somaclonal e *screening in vitro* de porta-enxertos de macieira resistentes a altos teores de alumínio, para que possam ser utilizados em solos com este problema.

6.11.3 PEREIRA

Segundo Crane & Lewis (1942) a maioria das cultivares de pereira é auto-estéril, devido à incompatibilidade gametofítica, mas esta barreira para a autopolinização pode ser contornada em cultivares tetraplóides. Entretanto, até hoje não houve progresso significativo no sentido de obter-se pereiras homozigotas. Isto é considerado por alguns, como uma limitação do melhoramento tradicional. Por outro lado, como no caso da macieira, também na pereira são encontradas importantes características em espécies afins mas que produzem frutos de qualidade inferior. Hibridações com estas espécies necessitam de diversas gerações de retrocruzamentos com a espécie cultivada para que se obtenham genétipos que produzam frutos de bom tamanho e qualidade.

Resistência a doenças e pragas podem ser obtidas em espécies silvestres. Se o progresso da biologia molecular tornar disponíveis genes clonados, como genes inibidores de proteinase, dando resistência a insetos e doenças bacterianas, poderia acelerar consideravelmente o melhoramento através do uso de técnicas de transformação (Chevreau & Skirvin, 1992).

A regeneração de plantas de pêra já foi conseguida tanto a partir de explantes juvenis ou maturos. Cheveau & Skirvin (1992) apresentam uma comparação entre as condições ótimas recomendadas para a regeneração de brotos a partir de cotilédones ou de explantes de folhas. De modo geral, os provenientes de folhas necessitam de maior período no escuro e têm uma taxa de regeneração maior.

Técnicas eficientes para regenerar plantas inteiras a partir de tecidos de plantas adultas estão disponíveis atualmente, para melhoristas de pereira; a simples técnica de regeneração de gemas adventícias a partir de folhas é eficiente para vários genótipos (Chevreau & Skirvin, 1992).

Mutações conduzidas or cultivo *in vitro* de pereiras envolveram principalmente, mudanças no nível de ploídia. Bell *et al.* (1996) citam que Mehra & Jaidka identificaram células triplóides, poliplóides e aneuplóides em calos derivados de tecidos de mesocarpo e cotiledonares. Outros autores observaram mudanças na forma das folhas e na variegação envolvendo deficiência de clorofila.

O uso eficiente da cultura *in vitro* para fixação de variantes somaclonais depende do desenvolvimento de um método confiável de *screening* para os caracteres de interesse.

O método de transformação ainda necessita de muitos estudos e ajustes. Não se conhece até o presente, transformação, regneração e produção de plântulas, com sucesso, usando eletroporação ou microinjeção de protoplastos ou técnicas de bombardeamento. Bell *et al.* (1996) citam que Visser realizou tentativa de transformação utilizando a bactéria *Agrobacterium*. Brotos de pereira de cultivo *in vitro* foram inoculados; os tumores foram subculturados e produziram brotações adventícias, entretanto, não houve evidência da transformação.

6.12 CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

Briggs & Knowles (1967) fazem um apanhado, ainda atual, sobre as razões para se fazer cruzamentos interespecíficos, as dificuldades e barreiras encontradas e formas de sobrepô-las. Perez-Gonzalez (1984) apresentou tese de doutorado sobre as barreiras pré-zigóticas endógenas à hibridação interespecífica em *Prunus*.

De modo geral, o objetivo em cruzamentos entre espécies domésticas e silvestres é a reconstituição da espécie doméstica, com a adição de um ou poucos genes da espécie silvestre. A técnica de melhoramento, pelo método clássico, é o retrocruzamento com a espécie cultivada, selecionando-se sempre na progênie, as plantas que tenham a característica desejável da espécie silvestre. Outra alternativa seria o uso de engenharia genética, introduzindo-se apenas um fragmento de DNA da espécie silvestre.

O cruzamento interespecífico tem sido usado em Prunoideas e Pomaceas. O chamado *plumcot* é um híbrido de ameixeira por damasqueiro.

Cruzamentos interespecíficos são geralmente, bem sucedidos se feitos entre espécies de ameixeira com o mesmo número de cromossomos. Já foram obtidos híbridos com *P. cerasifera, salicina, simonii, besseyi, ammericana, angustifolia, hortelona, munsoniana* e *nigri*. Os híbridos entre essas espécies são geralmente, férteis e produtivos. A maioria destas nove espécies já foram hibridizadas com *P. persica*, mas os híbridos obtidos eram, geralmente, estéreis (Okie & Weinberger, 1996).

Layne & Quamme (1975) citam trabalhos de Harris & Lamb, que usaram cruzamento entre *Prunus communis x P. ussuriensis* e obtiveram progênie onde 60% das plantas eram resistentes à *Psylla pyricola*, Foerster. Além disso, a resistência foi positivamente correlacionada com tamanho das frutas e não foi correlacionada com baixa qualidade e células arenosas (*stone cells*).

O exemplo mais clássico entretanto, foi o da introdução do gene Vf, para resistência á sarna da macieira, encontrado em *Malus floribunda*. O prorama para resistência à sarna, começou quase no início do século XX, em Illinois-EUA, quando foi realizado cruzamento entre *Malus floribunda* e a cultivar 'Rome Beauty'. Duas plantas irmãs deste cruzamento foram intercruzadas em 1926, produzindo uma população de 38 plantas. Estas segregaram na proporção de 1:1, plantas altamente suscetíveis e altamente resistentes. Dois desses *seedlings* formaram a base na qual um enorme programa de melhoramento para resistência à sarna, começou nos Estados Unidos (Brown, 1975) e, posteriormente, estendeu-se a diversos países do mundo, inclusive Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, J.J.P. Efeitos de desfolhamento precoce, deficiência hídrica, cultivar e local, no abortamento de gemas florais da pereira (*Pyrus* sp). Pelotas: UFPel, 1998. 43p. Dissertação, Mestrado.

BARBOSA, W.; OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; RIGITANO, O.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; CASTRO, J.L. **Melhoramento do pessegueiro para regiões de clima subtropical temperado:** realizações do Instituto Agronômico no período de 1950 a 1990. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 22p. (Documentos, 52)

BEACH, S.A.; BOOTH, N.O.; TAYLOR, O.M. **The apples of New York.** Albany: J.B. Lyon Company, 1905. v.1, 407p.

BELL, R.L.; QUAMME, H.A.; LAYNE, R.E.C.; SKIRVIN, R. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Fruit breeding:** tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.1, p.441-514.

BRIGGS, F.N.; KNOWLES, P.F. **Introduction to plant breeding.** New York: Reinhold Publishing, 1967. 426p.

BRIGHENTI, E.; RIBEIRO, P.A.; PEREIRA, A.J. **Pêra:** recomendação de cultivares para o estado de Santa Catarina. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 53p. (Boletim Técnico, 67)

BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A.M. **Aplication of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops:** an interpretative literature review. Amsterdam: Elsevier Scientfic Publishing, 1978.

BROWN, A.G. Apples. In: JANICK J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding.** West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.3-37.

BROWN, A.G. The inheritance of mildew resistance in progenies of the cultivated apple. **Euphytica,** v.8, p.81-88, 1959.

BROWN, A.G. Genetics of apple. **Plant Breeding Review,** v.9, p.333-365, 1992.

BYRNE, D.H.; BACON, T. Founding clones of low-chill fresh market peach germplasm. **Fruit Varieties Journal,** v.53, p.162-171, 1999.

CAMPO DALL'ORTO, F.A.C.; OJIMA, M.; RIBEIRO, I.J.A.; RIGITANO, O.; VEIGA, A.A. Resistência varietal da ameixeira (*Prunus salicina,* Lindl.) à ferrugem (*Transchelia* sp) nas condições de Tietê, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. **Anais.** Pelotas: SBF, 1979. p.785-796.

CARVALHO, T.C.P. Comportamento de algumas cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) quanto à polinização no Rio Grande do Sul. Pelotas: UFPel, 1989. 73p. Dissertação, Mestrado.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R.M. Pear. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.) **Biotechnology of perennial fruit crops.** Wallingford: CAB International, 1992. p.263-276.

CRANE, M.B.; LEWIS, D. Genetical studies in pears. 3. Incompatibility and sterility. **Journal of Genetics,** v.43, p.31-43, 1942.

DENARDI, F.; HOUGH, L.F. Apple breeding in Brazil. **HortScience,** v.22, p.1231-1233; 1987.

DENARDI, F.; HOUGH, L.F.; BONETTI, J.J. da S. Low chilling and disease resistence as main objetives of apple breeding in Santa Catarina, Brazil. **Acta Horticulturae,** v.232, p.15-25, 1988.

FAORO, I.D. Cultivo da pereira no mundo. **Agropecuária Catarinense,** v.4, n.2, 1991.

FELICIANO, A.J. Melhoramento genético do pessegueiro no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. **Anais.** Pelotas: SBF, 1979. v.3, p.1259-1274.

FRENCH, W.J.; FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf scald in Brazil. **Plant Disease Reporter,** v.66, p.515-517, 1982.

FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Ocurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter,** v.62, p.1035-1038, 1978.

GALETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK. J. (Ed.) **Methods in fruit breeding.** West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p.23-47.

HAMMERSCHLAG, F.A.; OWENS, L.D.; SMIGOCK, A.C. Agrobacterium: mediated transformation of peach cells derived from mature plants that were propagated in vitro. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** v.114, p.508-510, 1989.

HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant propagation:** principles and practices. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990.

HARWOOD, W.S. **New creations in plant life.** New York: Macmillan, 1941. 430p.

HAUAGGE, R.; CUMMINS, J.N. Genetics of length of dormancy period in Malus vegetative buds **Journal of the American Society for Horticultural Science,** v.116, p.121-126, 1991.

HAUAGGE, R.; TSNETA, M.; HIRANO, Z. IAPAR - 'Irati', uma nova cultivar precoce de ameixeira. **Revista Brasilleira de Fruticultura,** v.13, p.285-291, 1991.

HEDRICK, U.P. **The peaches of New York.** Albany : J.B. Lyon Company, 1917. v.2, pt.2, 541p. (Annual Report, 24)

HEDRICK, U.P.; HOWE, G.H.; TAYLOR, O.M.; FANCIS, E.H.; TUKEY, H.B. **The pears of New York.** New York: Department of Agriculture, 1921. v.2, pt.2. (Annual Report, 29)

HESSE, C.O. Peaches. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding.** West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.285-335.

IAPAR. **A cultura da macieira no Paraná.** Londrina: Fundação Instituto Agronômico do Paraná, 1988. 112p. (Circular, 50)

JANICK, J.; CUMMINS, J.N.; BROWN, S.K.; HEMMAT, H. Apples. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (ED.) **Fruit breeding:** tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.1, p.1-78.

KING, J.R.; HESSE, C.O. Pollen longevity studies with deciduous fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.36, p.310-313, 1938.

KINGSTON, C.M.; KLINAC, D.J.; VAN EPENHUIJEN, C.W. Floral bud disorders of nashi (*Pyrus serotina*) grown in New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.18, p.157-159, 1990.

KORBAN, S.S.; CHEN, H. Apple. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. p.203-228.

KORBAN, S.S.; SKIRVIN, R.M. Nomenclature of the cultivated apple. **HortScience**, v.19, p.177-180, 1984.

LAMB, R.C. Future germplasm resources of pome fruits. **Fruit Varieties Journal**, v.28, p.75-79, 1974.

LAYNE, R.E.C. Hibridizations. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.) **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p.48-65.

LAYNE, R.E.C.; QUAMME, H.A. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.38-70.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Comercially feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society**, v.30, p.421-427, 1981.

MAIA, M.L.; AMARO, A.A.; GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. Produção e mercado de pêra e pêssego no Brasil. **Informações Econômicas**, v.26, p.33-48, 1996.

MORETTINI, A.; BALDINI, E.; SCARAMUZZI, F.; MITTEMPERGHER, L. **Monografia delle principali cultivar di pero**. Firenze, 1967. 412p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NAKASU, B.H. Temperate zone fruit production in the tropic and subtropics: South America. **Acta Horticulturae**, v.296, p.231-239,1992

NAKASU, B.H.; BASSOLS, M.C.; FELICIANO, A.J. Temperate fruit breeding in Brazil. **Fruit Varieties Journal**, v.35, p.114-122, 1981.

NAKASU, B.H.; HERTER, F.G.; LEITE, D.L.; RASEIRA, M.C.B. Pear flower bud abortion in southern Brazil. **Acta Horticulturae**, n.395, p.185-192, 1995.

NAKASU, B.H.; LEITE, D.L. Indicação de porta-enxerto e cultivares de pereira para o Sul do Brasil . **HortiSul**, v.1, p.20-24, 1989.

NAKASU, B.H.; LEITE, D.L. Pirus 9-seleção de pereira para o Sul do Brasil. **HortiSul**, v.2, p.19-20, 1992.

NORTON, J.D. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.89, p.132-134, 1966.

OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; BARBOSA, W.; RIGITANO, O. **Cultivares de ameixeira para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1992. 16p. (Boletim Técnico, 144)

OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; BARBOSA, W.; MARTINS, F.P.; CASTRO, J.L.; SABINO, J.C.; RIGITANO, O. Pêras: 'Centenária' (IAC 9-47) e 'Primorosa' (IAC 9-3). **O Agronômico**, v.39, p.115-116, 1987.

OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO.; F.A.; BARBOSA, W.; RIGITANO, O. Melhoramento de frutíferas de clima temperado - novas cultivares IAC. **O Agronômico**, v.18, p.226-236, 1986.

OKIE, W.R.; RAMMING, D.W. Plum breeding worldwide. **Hort Technology**, v.9, p.162-176, 1999.

OKIE, W.R.; WEINBERGER, J.H. Plums. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Fruit breeding**: tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.1, p.1-78.

PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated Prunus species. **HortScience**, v.19, p.69-70, 1984.

PARFITT, D.E.; GANESHAN, S. Comparison of procedures for estimating viability of Prunus pollen. **HortScience**, v.24, p.354-356, 1989.

PEREZ-GONZALEZ, S. Prezygotic endogenous barriers to interespecific hybridization in Prunus. Fayetteville: University of Arkansas, 1984. 55p. Thesis, Ph.D.

QUEZADA, A.C.; RASEIRA, M. do C.B.; CITADIN, I.; BAPTISTA da SILVA, J. Parâmetros indicativos da necessidade do uso de embriocultura em cultivares precoces de pessegueiro, (*Prunus persica* L. Batsch.). **Agropecuária Clima Temperado**, v.1, p.55-59, 1998.

RAMMING, D.W. The use of embryo culture in fruit breeding programs. **HortScience**, v.25, p.393-398, 1990.

RAMMING, D.W. In ovulo embryo culture of early-maturing Prunus. **HortScience**, v.20, p.419-420, 1985.

RAMOS, J.D.; PASCOAL, M.; CALFUN, N.N.; ALVARENGA, A.A.; ABRAHÃO, E.; ANTUNES, L.E.C.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, S.P. **Obtenção de clones de ameixeiras (*Prunus* sp), para o Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFV, 1998. (Projeto de Pesquisa Integrado)

RASEIRA, M. do C.B. Meios para cultivo de embriões imaturos de pessegueiro, *Prunus persica* L. Batsch, **Agropecuária Clima Temperado**, v.1, p.47-53, 1998.

RASEIRA, M. do C.B.; NAKASU, B.H. Cultivares: descrição e recomendação. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. DO C.B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. p.29-99.

RASEIRA, M. do C.B.; NAKASU, B.H.; SANTOS, A.M.; FORTES, J.F.; MARTINS, O.M.; RASEIRA, A.; BARNARDI, J. The CNPFT/EMBRAPA fruit breeding program in Brazil. **HortScience**, v.27, p.1154-1157, 1992.

RIBEIRO, P.A.; BRIGHENTI, E.; BERNARDINI, N. **Comportamento de algumas cultivares de pereira (*Pyrus communis*, L.) e suas características nas condições do planalto catarinense**. Florianópolis: EMPASC, 1986. 53p. (Boletim Técnico, 56)

RODRIGUEZ, A.J.; SHERMAN, W.B. Relationship between parental, seed and *seedlings* chilling requirements in peach and nectarines, *Prunus persica* (L.) Batsch. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.627-630, 1985.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O pessegueiro. In: MEDEIROS, C.A.B; RASEIRA, M. DO C.B. (Ed.) **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. p.13-19.

SCORZA, R.; HAMMERSCHLAG, F.A. Stone fruits. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.) **Biotechnology of perennial fruit crop**. Wallingford: CAB International, 1992. p.277-302.

SCORZA, R.; SHERMAN, W.B. Peaches. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Fruit breeding: tree and tropical fruit**. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.1, p.325-340.

SCORZA, R.; OKIE, W.R. Peaches (*Prunus*). In: MOORE, J.N.; BALLINGTON, JR., J.R. **Genetic resources of temperate fruit and nut crops**. Wageningen: ISHS, 1991. p.175-232.

SMITH, C.A.; BAILEY, C.H.; HOUGH, L.F. **Methods for germinating seeds of some fruit species with special reference to growing *seedlings* from immature embryos**. New Brunswick: Rutgers University, 1969. (New Jersey Agricultural Experiment Station Bulletin, 823)

SOUZA, C.N. Incompatibilidade gametofítica em cultivares de pereira (*Pyrus* spp). Pelotas: UFPel, 1999. 36p. Tese, Doutorado.

STEWART, J.M.; HSU, C.L. In ovulo embryo and *seedlings* development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta**, v.137, p.113-117, 1977.

THEOBALD, W.L.; HOUGH, L.F. The relantionships between stage of peach embryo development and *seedling* growth and survival. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.75, p.163-170, 1960.

WAY, D.R.; ALDWINCKLE, H.S.; LAMB,, R.C.; REJMAN, A.; SANSAVINI, S.; SHEN, T.;WATKINS, R.; WESTWOOD, M.N.; YASHIDA, Y. Apples (Malus). In: MOORE, J.N.; BALLINGTON JR., J.R. (Ed.) **Genetic resources of temperate fruits and nut crops**. Wageningen: ISHS, 1990. v.1, p.1-62.

WAY, R.D. Hastening the fruiting of apple *seedlings*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.96, p.384-389, 1971.

WEINBERGER, J.H. Plums. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.336-347.

WILSON, J.A.; BROWN, S.O. Differential staining of pollen tubes in grass pistils. **Agronomy Journal**, v.49, p.220-222, 1957.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Use of detached leaves in vitro for selection of resistance to *Venturia inaequalies*. **Phytopathology**, v.78, p.1524, 1989.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Culture in vitro d'ovules non fecondes d'embryons preleve 8 jours apres pollinisation chez le pommier cultive (*Malus x domestica* Borkh). **Agronomie**, v.8, p.837-842, 1988.

17

MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS DE CLIMA TROPICAL

JORGE LUIZ LOYOLA DANTAS[1]
WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO[1]
JOÃO ROBERTO PEREIRA OLIVEIRA[1]
JOSÉ RENATO SANTOS CABRAL[1]
LUCIANA VEIGA BARBOSA[2]
MARIO AUGUSTO PINTO DA CUNHA[1]
ROGÉRIO RITZINGER[1]
SEBASTIÃO DE OLIVEIRA E SILVA[1]

[1]Embrapa Mandioca e Fruticultura, C.P. 007 - CEP: 44380-000 - Cruz das Almas, BA.
[2]Pós-Doutorando do Depto. Genética, USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas tem contribuído de forma significativa para uma maior disponibilidade e melhor qualidade do alimentos, tanto para o homem como para os animais. Isso tem decorrido do desenvolvimento de variedades altamente produtivas e dotadas de outras características de interesse agronômico, particularmente aquelas relacionadas à resistência/tolerância aos fatores adversos bióticos e/ou abióticos. Estima-se que metade do incremento da produtividade das principais espécies agrícolas nos últimos 50 anos seja atribuída ao melhoramento genético (Borém, 1997), o qual tem-se sustentado no trabalho multidisciplinar de pesquisadores de diversas áreas do conhecimento.

A ênfase dada ao aumento da produtividade agrícola pelo melhoramento genético é conseqüência da grande necessidade de uma fonte adequada de alimentação, capaz de satisfazer o constante crescimento da população num mundo de área limitada. Excetuando-se breves períodos de fartura, as populações humanas, bem como as populações de outros animais, têm passado fome. Cada período de abundância tem contribuído para um aumento da população, seguindo-se, depois, períodos de escassez de alimentos.

Não é apenas no presente século que o homem tem-se preocupado com o aumento da produção agrícola visando acompanhar a demanda de alimentos, já que a fome não é fato novo na história mundial. Desde épocas as mais remotas, inúmeros cientistas têm feito postulações sobre o assunto, sendo aquelas de Thomas Robert Malthus as mais conhecidas. Este previu uma fome catastrófica, em função da possibilidade do crescimento populacional suplantar a produção de alimentos, o que não ocorreu devido ao surgimento de novas fronteiras agrícolas e da inclusão de novas técnicas e insumos ao sistema produtivo. Uma agricultura moderna, mecanizada, com uso de insumos e de variedades melhoradas resultou em produtividades que Malthus não pôde antever (Allard, 1966). Todavia, embora atualmente exista excesso de produção de alimentos em diversos países, várias regiões do mundo ainda encontram-se subjugadas à fome e à desnutrição, tornando-se muito preocupante a possibilidade de que a produção de alimentos, já inadequada para nutrir 4 bilhões de pessoas em meados dos anos 70, terá de ser dobrada para alimentar uma população de 8 bilhões por volta de 2015 (Poehlman & Quick citados por Pinto *et al.*, 1997).

Nessa busca contínua pela criação de variedades superiores, o melhoramento genético envolve processos bastante dinâmicos, o que significa que não existem métodos únicos para se atingir objetivos específicos (Borém, 1997). Entretanto, independentemente dos métodos utilizados, para pleno êxito e sustentação, o melhoramento de plantas requer o uso de uma ampla variabilidade genética, a qual se encontra em forma variável na natureza, mantida por seleção natural, como produto de mutações e/ou hibridações espontâneas. Visando aproveitar essa variabilidade, a partir do início deste século têm sido criadas coleções de germoplasma para diversos

cultivos, porém somente a partir dos anos 50 os recursos genéticos passaram a ser mais valorizados, sendo parcialmente incorporados aos programas de melhoramento.

A coleta e introdução de materiais, a conservação e intercâmbio, bem como a caracterização e avaliação de germoplasma são etapas necessárias e imprescindíveis à manutenção e utilização dos recursos genéticos. A conservação oferece o suporte aos trabalhos de melhoramento genético, possibilita o intercâmbio de germoplasma e, especialmente, a preservação da variabilidade genética, enquanto a caracterização e avaliação permitem conhecer a qualidade e potencialidade do germoplasma sob vários aspectos.

A variabilidade genética presente nas coleções de espécies cultivadas, bem como aquela utilizada pelos programas de melhoramento genético, todavia, é extremamente limitada quando comparada com a efetivamente passível de utilização. As informações existentes indicam que o emprego de germoplasma em programas de melhoramento está em torno de 4% do total disponível, isso ao nível mundial. Assim, as contribuições do melhoramento genético de plantas poderão ser substancialmente ampliadas no futuro, na medida em que essa variabilidade genética for melhor aproveitada, pelo uso de genes valiosos existentes em materiais diversos, os quais adequadamente combinados podem produzir genótipos mais eficientes.

No que concerne à fruticultura, segundo a FAO (1999) o Brasil é o segundo maior produtor mundial, suplantado apenas pela China, com uma produção de 36 milhões de toneladas/ano, correspondente a 9% da produção global de frutas. Apresenta a possibilidade de cultivo de uma infinidade de espécies e variedades nativas e exóticas, tropicais, subtropicais e temperadas, permitindo um fluxo de produção ao longo de todo o ano, com um predomínio de fruteiras tropicais e subtropicais. Como conseqüência, as fruteiras representam atualmente o segmento que mais cresceu no setor agrícola nacional, constituindo-se em importante alternativa para produtores rurais e agroindústrias, contribuindo para o desenvolvimento do meio rural e ampliação da pauta de exportações. Sua importância ainda se destaca pelo alto rendimento e elevado valor nutricional como fonte de vitaminas, sais minerais, proteínas e fibras. Devido à grande extensão territorial do país e diversidade de ambientes, muitos dos problemas são de ocorrência regional e restrita a determinada(s) espécie(s), justificando a condução de programas de melhoramento genético específicos.

Os recursos genéticos de fruteiras tropicais estão sendo utilizados em programas de melhoramento genético e pesquisas correlatas, aproveitando-se do fato do Brasil ser um dos mais importantes centros de diversidade genética de várias espécies frutíferas tropicais (Ferreira, 1997). No que tange às fruteiras trabalhadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (abacaxi, acerola, banana, citros, mamão, manga e maracujá), todas dispõem de bancos ativos de germoplasma (BAGs), os quais estão diretamente relacionados aos respectivos programas de melhoramento genético.

Neste capítulo são apresentados, de maneira sucinta, os programas de melhoramento genético de fruteiras desenvolvidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, procurando destacar os recursos genéticos disponíveis, os principais resultados alcançados, bem como suas diretrizes e metas.

2. MELHORAMENTO GENÉTICO DO ABACAXIZEIRO

2.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merril) é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à ordem Bromeliales e à família Bromeliaceae (Collins, 1960). São conhecidos, aproximadamente, 50 gêneros e 2.000 espécies de Bromeliaceae (Py *et al.*, 1984). Do ponto de vista econômico, o gênero *Ananas* é o mais importante dessa família, pois nele estão incluídos o abacaxi, que tem interesse frutícola, e outras espécies que são utilizadas para produção de frutos pequenos, fibra ou para ornamentação.

Em 1753, Linnaeus designou o abacaxi de *Bromelia ananas* e *Bromelia comosa*. Em 1917, Merril estabeleceu a denominação binomial *Ananas comosus*, baseado em Linnaeus e considerando *Bromelia comosa*, sinônimo de *Bromelia ananas* (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

A taxonomia do gênero *Ananas* já foi revisada várias vezes, contudo as chaves propostas não têm sido satisfatórias. A mais recente classificação deste gênero considera sete espécies como válidas, às quais são apresentadas na Tabela 1.

A organização do gênero *Ananas* pode ser simplificada com a redução do número de espécies, visto que não existem grandes diferenças entre as espécies. *A. nanus*, por ser muito semelhante à *A. ananassoides*, pode ser considerada como uma variedade anã desta última espécie com relação à biologia da reprodução, citologia, número de cromossomos e que não há barreiras reprodutivas entre as espécies consideradas atualmente como válidas (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

TABELA 1. Espécies do gênero *Ananas*, consideradas como válidas.

Nome científico	Nome vulgar
Ananas ananassoides (Baker) L.B. Smith	Nanaí
Ananas nanus (L.B. Smith) L.B. Smith	Ananaí
Ananas parguazensis Camargo e L.B. Smith	Gravatá
Ananas lucidus Miller	Curauá
Ananas bracteatus (Lindley) Schultes f.	Ananás do mato
Ananas fritzmuelleri Camargo	Gravatá de cerca
Ananas comosus (L.) Merril	Abacaxi

Fonte: Leal & Coppens d'Eeckenbrugge (1996)

2.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

2.2.1 CENTRO DE ORIGEM

O centro de origem do gênero *Ananas* inicialmente foi considerado como sendo a região compreendida entre 15° N e 30° S de latitude e 40° L e 60° W de longitude, que inclui o Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e Nordeste da Argentina e Paraguai (Collins, 1960). Posteriormente, a região localizada entre 10° N e 10° S de latitude e 55° L e 75° W de longitude foi proposta como centro de origem do abacaxi, porque a flora dessa região é endêmica e contém o maior número de espécies do gênero *Ananas* consideradas como válidas (Leal & Antoni, 1981).

Resultados de recentes expedições de coleta de germoplasma de abacaxi realizadas na Venezuela, Brasil e Guiana Francesa revelaram a existência de uma maior variação morfológica nos tipos selvagens e cultivados no Norte da Amazônia , especialmente nas bacias dos Rios Negro e Solimões, Amapá e Guiana Francesa, do que no Sudeste do Brasil e Nordeste do Paraguai (Leal *et al.*, 1986; Duval *et al.*, 1997). Esta constatação vem confirmar a proposta de Leal & Antoni (1981) de que as regiões Sudeste do Brasil e Nordeste do Paraguai seriam prováveis centros secundários de diversificação do abacaxi.

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética do abacaxi. Além de *A. comosus*, todas as espécies do gênero *Ananas*, consideradas válidas, são encontradas nas formas silvestre ou cultivada (Ferreira & Cabral,1998).

2.2.2 EVOLUÇÃO

Os mais prováveis genitores selvagens de *A. comosus* são *A. ananassoides* e *A. parguazensis*. A hipótese da origem de *A. comosus*, espécie em que ocorre ampla variabilidade genética, a partir de *A. bracteatus* e *A. parguazensis*, é pouco provável, porque estas espécies apresentam menor variabilidade (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

2.2.3 DOMESTICAÇÃO

O cultivo do abacaxi começou provavelmente na região norte da América do Sul. *A. comosus* foi originado de uma seleção baseada na aparência do fruto (tamanho e número de olhos), qualidade (menor acidez) e baixa fertilidade, enquanto que *A. lucidus* foi originado de uma seleção para obter folhas longas e sem espinhos. *A. comosus* foi amplamente difundida pelas migrações humanas e já estava presente em toda a América do Sul na época do descobrimento (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996). Com a domesticação do abacaxi, a sensibilidade à floração natural foi reduzida, favorecendo o aumento do ciclo, e, conseqüentemente a produção de frutos maiores. A domesticação do abacaxi também estimulou a reprodução vegetativa, reforçou a auto-incompatibilidade e favoreceu tipos sem espinhos ou com poucos espinhos (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997).

2.3 RECURSOS GENÉTICOS

No Brasil, ocorrem muitas populações de *A. comosus* e diversas cultivares são plantadas em escala reduzida por pequenos agricultores para consumo e comercialização locais, notadamente na região Amazônica, no entanto, a cultivar predominante no país é a Pérola (Ferreira & Cabral, 1993). O predomínio de uma cultivar para exploração comercial e a substituição de cultivares locais por outras de importância comercial mais ampla vêm causando o desaparecimento de populações silvestres de abacaxi. Objetivando minimizar os efeitos negativos da erosão genética que está ocorrendo no gênero *Ananas*, de interesse para o melhoramento genético do abacaxizeiro a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Mandioca e Fruticultura vêm realizando expedições de coleta de germoplasma de abacaxi em regiões prioritárias do Brasil. Foram realizadas coletas nas margens do Rio Paraná (Brasil e Paraguai) e nos Estados de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí, Maranhão, Acre, Amazonas (Rio Negro e Solimões), Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Bahia e na Guiana Francesa. Estas expedições e a introdução de

germoplasma possibilitaram a formação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Abacaxi, o qual é constituído de 701 acessos e reúne ampla variabilidade genética inter e intra específica. Neste BAG estão representadas todas as espécies do gênero *Ananas* tidas como válidas, além de outros gêneros como *Pseudananas* e *Bromelia* (Cabral *et al.*, 1998). O número de acessos por espécie está relacionado na Tabela 2. Estima-se que grande parte da variabilidade genética natural dessa fruteira esteja representada no BAG Abacaxi, sendo que quase todo o território brasileiro foi explorado em missões de coleta.

O BAG de Abacaxi, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, encontra-se instalado em Cruz das Almas-BA, a 12°40'39" S e 39°06'22" W e a 226 m de altitude.

Apesar do BAG Abacaxi possuir uma ampla variabilidade genética, considera-se necessária a realização de incursões na região Nordeste do Brasil, objetivando coletar acessos com resistência à seca, além de introduzir materiais da Venezuela e Colômbia e recuperar acessos perdidos das coletas e/ou introduções já realizadas.

TABELA 2. Número de acessos por espécie do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA, 1999.

Espécie	Número de acessos
Ananas comosus	459
A. ananassoides	98
A. bracteatus	20
A. parguazensis	10
A. lucidus	10
A. nanus	01
A. fritzmuelleri	01
Ananas sp.	33
Pseudananas [illegible]*us*	18
Bromelia balansae	08
B. goeldiana	04
B. caratas	01
B. laciniosa	01
Bromelia sp.	29
Bilbergia sp.	03
Tillandsia sp.	03
Dickia sp.	02
Total	701

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO

O abacaxizeiro é uma planta pouco estudada sob o ponto de vista do melhoramento genético. Grande parte dos esforços de pesquisa nesta área foram concentrados em trabalhos de genética. Apesar de existirem muitas cultivares, estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi provêm da 'Smooth Cayenne' e que esta cultivar ao lado da 'Queen', 'Singapore Spanish', 'Española Roja' e 'Pérola', contribuam com 95% dessa produção (Leal, 1990).

Os programas de melhoramento que já foram desenvolvidos não conseguiram produzir cultivares com características superiores à 'Smotth Cayenne' e o lançamento de novas cultivares tem sido pouco freqüente (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995). Esses resultados pouco favoráveis têm levado os melhoristas de abacaxi a refletirem sobre os objetivos clássicos e adotarem novas estratégias de melhoramento genético.

O primeiro trabalho de melhoramento genético do abacaxi foi desenvolvido na Flórida (EUA), em 1905 com os objetivos de obter cultivares mais adaptadas às condições locais e melhorar a qualidade do fruto para exploração industrial (Py *et al.*, 1984). Posteriormente, programas de melhoramento semelhantes foram conduzidos no Havaí (EUA), África do Sul, França, Índia, Malásia, Austrália, Brasil, Costa do Marfim, Porto Rico, Cuba, Japão, Venezuela e Taiwan (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval,1995).

2.4.1 SISTEMA REPRODUTIVO

O abacaxizeiro é uma planta de propagação predominantemente vegetativa, contudo seu sistema reprodutivo pode ser definido pela coexistência de um sistema de reprodução sexual alógamo funcional e de um sistema de propagação vegetativa dominante e muito eficiente. A reprodução sexual tem grande importância na diversificação genética do gênero *Ananas* e a ampla variabilidade genética existente neste gênero é essencialmente de origem sexual. A contribuição das mutações somáticas pode parecer importante para um caráter econômico, mas ínfima em comparação com os efeitos da recombinação. Por outro lado, a dominância da reprodução vegetativa em abacaxi e as deficiências de reprodução sexual limitam a recombinação e a geração de novos genótipos (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.4.2 INCOMPATIBILIDADE

As cultivares de abacaxi não produzem sementes quando são plantadas sozinhas, mas podem produzir sementes se diferentes cultivares são plantadas lado a lado, como é o caso de coleção de germoplasma. A ausência de sementes em cultivares de abacaxi em regime de sistema de plantio com uma única cultivar é devido à auto-incompatibilidade do tipo gametofítica, causada pela inibição do crescimento do tubo polínico no terço superior do estilete (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

A especificidade da reação da incompatibilidade seria controlada por um gene S expressado ao nível gametofítico. Contudo é difícil estudar a causa das interferências entre esta reação e os fatores de fertilidade ao nível dos óvulos do pólen e de suas inter-relações (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.5 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO

Os programas de melhoramento genético do abacaxizeiro visam, em geral, obter cultivares produtivas, adaptadas às condições climáticas locais, que produzam frutos de boa qualidade e resistentes às mais importantes pragas e doenças (Py *et al.*, 1984).

As características que normalmente são procuradas pelos melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares de abacaxi para consumo *in natura* ou para industrialização são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3. Características favoráveis procuradas no melhoramento genético do abacaxizeiro.

Características	
Planta	**Fruto**
Crescimento rápido (vigor)	Peso médio elevado
Porte semi-ereto	Forma cilíndrica
Folhas curtas e largas, sem espinhos ou com espinhos localizados apenas nas extremidades	Casca amarelo-alaranjada
Menos de três filhotes situados a mais de 2cm da base do fruto	Olhos grandes e chatos
Rebentão precoce e bem desenvolvido localizado na base da planta	Maturação homogênea da base para o ápice
Pedúnculo curto a médio para suportar o fruto até a maturação	Cavidade floral pouco profunda
Resistência ou tolerância às principais pragas e doenças da região	Polpa amarela, firme e não fibrosa
Adaptação às condições locais de: temperatura, umidade relativa, insolação e pluviosidade	Eixo de diâmetro pequeno Teor de açúcar elevado Acidez moderada Teor de acido ascórbico elevado Sabor agradável Coroa média a pequena

Fonte: Py *et al.* (1984)

Caso a produção seja destinada especificamente para a industrialização, o fruto deve ter olhos grandes e planos, cavidade floral pouco profunda, polpa parcialmente translúcida na maturação e eixo pequeno. Se a produção se destina a exportação para consumo *in natura*, o fruto deve ter casca de cor amarelo-alaranjada e coroa média a pequena (Py *et al.*, 1984).

No critério de seleção deve-se priorizar os objetivos, pois teoricamente é muito difícil se obter uma cultivar que apresente todas as características desejáveis. Assim, os objetivos devem ser bem definidos e priorizados.

2.6 MÉTODOS DE MELHORAMENTO

Pode-se optar por técnicas de melhoramento baseadas na reprodução vegetativa ou por métodos fundamentados na reprodução sexuada.

2.6.1 INTRODUÇÃO DE PLANTAS

As introduções podem ser usadas de três formas diferentes. A introdução de variedades superiores de outros locais pode atingir os mesmos propósitos que aqueles de desenvolver variedades em programas de melhoramento. 'Smooth Cayenne' tem sido introduzida em vários países para uso direto pelos agricultores com relativo sucesso.

Outro procedimento fundamenta-se na introdução de genótipos para avaliação nas estações experimentais. O genótipo de melhor desempenho no local de avaliação é selecionado e recomendado para uso pelos agricultores.

A terceira forma consiste na introdução de genótipos para avaliação visando a indicação de genitores para programas de melhoramento genético.

2.6.2 UTILIZAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS

A caracterização e avaliação de germoplasma pode indicar genótipos de abacaxi com potencial para uso direto pelos produtores. Cultivares locais podem ser recomendadas após trabalhos de caracterização e avaliação, desde que sejam bem adaptadas às condições climáticas locais e que satisfaçam as exigências do mercado. Todavia, se o objetivo é produzir abacaxi para exportação, em condições de cultivo intensivo, são raras as cultivares locais que possuem chances de competir com 'Smooth Cayenne', 'Queen', 'Española Roja' ou 'Pérola' (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.6.3 SELEÇÃO

2.6.3.1 SELEÇÃO CLONAL

A seleção clonal geralmente objetiva explorar a variabilidade intravarietal, eliminando-se os indivíduos que não correspondem ao tipo desejado, como plantas sem vigor ou apresentando defeitos evidentes (fasciação, colar de filhote e coroa múltipla, fruto pescoço de garrafa e fruto macho). Este procedimento possibilita que se melhore as características de um clone e contribui para a manutenção dos padrões de uma cultivar.

2.6.3.2 SELEÇÃO MASSAL

Esta estratégia denominada de seleção massal ou fenotípica, semelhante àquela realizada nas plantas de propagação sexuada, consiste em examinar-se o plantio antes da colheita para selecionar plantas com características desejáveis. Nesta seleção são avaliados o vigor das plantas, o tamanho e conformação do fruto e a produção de mudas. As plantas selecionadas são marcadas e multiplicadas para produzir novo material de plantio. Este procedimento tem sido usado por muitos agricultores, mas não é recomendado como método de melhoramento em abacaxi, porque as diferenças genéticas sendo poucas e o efeito do ambiente predominante, as diferenças observadas nas plantas selecionadas são provavelmente de origem ambiental e não genética. Uma variação deste método fundamenta-se na seleção de uma só planta apresentando fenótipo excepcional, a qual é multiplicada para constituir um clone. Sua vantagem é a rapidez com que se atinge a homogeneidade genética porém, em contrapartida são altos os riscos de se multiplicar um genótipo sem interesse ou decepcionante (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.6.3.3 SELEÇÃO CLONAL NO SENTIDO RESTRITO

A primeira etapa do trabalho corresponde à seleção fenotípica de indivíduos de características vantajosas. Em seguida, cada planta selecionada é identificada e multiplicada individualmente, sendo que a avaliação se faz ao nível dos clones selecionados. Seu princípio é equivalente ao teste de progênies, usado no caso das plantas reproduzidas sexualmente, para caracteres de baixa herdabilidade. Na prática, é um método mais seguro e mais eficiente tanto para eliminar mutações indesejáveis de expressão variável (colar de filhote ou coroas múltiplas) como para melhorar a cultivar (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.6.4 HIBRIDAÇÃO (HÍBRIDOS F_1)

Os maiores programas de hibridação foram planejados com o objetivo de produzir cultivares para industrialização ou para duplo uso (consumo *in natura* e industrialização), tomando-se como ponto de referência a cultivar 'Smooth Cayenne' (Py *et al.*, 1984). Esses programas visavam, principalmente, aumentar o rendimento da cultura, reduzir o ciclo, mediante obtenção de plantas com rebentões basais em pequeno número, porém precoces, obter um fruto cilíndrico de polpa amarela, com um conteúdo de açúcar e acidez mais estáveis e com elevado teor de vitamina C, obter plantas com pedúnculo firme, sem aumentar o diâmetro do eixo do fruto e obter plantas com folhas sem espinhos. Estes objetivos correspondem ao desenvolvimento de uma cultivar para superar 'Smooth Cayenne' e não ao objetivo principal de selecionar cultivares alternativas (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

Considerando-se a heterozigose dos genitores que normalmente são usados nas hibridações e o grande número de caracteres usados na seleção, torna-se necessária a produção de populações híbridas muito grandes para aumentar a chance de sucesso na seleção (Cabot, 1989). Tem-se observado uma ampla variabilidade entre os híbridos de uma mesma geração F_1, em conseqüência da heterozigose das cultivares genitores que induz grande segregação e recombinação e explica a baixa freqüência de manifestações de heterose nas famílias produzidas (Collins, 1960).

Uma inflorescência do abacaxizeiro produz, em média, 150 flores, as quais vão se abrindo paulatinamente (cinco a dez por dia) da base para o ápice (Figura 1). As polinizações devem ser feitas imediatamente após a antese, entre seis e oito horas da manhã, diariamente, até que todas as flores se abram (Collins, 1960). Para a realização das polinizações programadas, recomenda-se a proteção das inflorescências dos genitores femininos, visando evitar contaminações com pólen de origem desconhecida. Um fruto oriundo de flores polinizadas produz de 200 a 2.000 sementes, dependendo da compatibilidade entre os genitores (Cabral & Matos, 1989).

As sementes de abacaxi são pequenas, medindo, em média, 5 mm de comprimento por 2 mm de largura (Figura 2). Geralmente, são viáveis e aparentemente não exibem dormência.



FIGURA 1. Inflorescência do abacaxizeiro.

A germinação ocorre de quatro a seis semanas em condições ideais de temperatura (22°C a 24°C) e saturação de água (Loison-Cabot, 1990), originando plântulas. Sementes em fase inicial de germinação podem ser vistas na Figura 3.

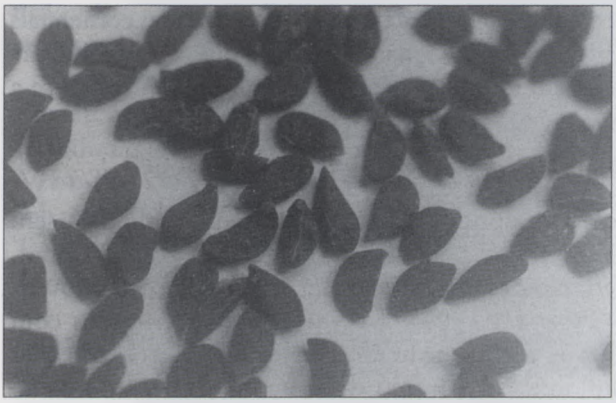


Foto: Solange N.B. Reinhardt.

FIGURA 2. Sementes de abacaxi obtidas de cruzamentos.



Foto: Solange N.B. Reinhardt.

FIGURA 3. Sementes de abacaxi em fase inicial de germinação.

2.6.5 CRUZAMENTOS COMPLEMENTARES

A eliminação de características desfavoráveis dos híbridos, bem como a recuperação de características favoráveis, podem ser conseguidas pelo cruzamento entre dois híbridos ou por retrocruzamentos. Contudo, no caso de cruzamentos entre híbridos, deve-se evitar o cruzamento de genitores relacionados, que resulte em certa consangüinidade. Para evitar este problema, pode-se usar um parental não relacionado com o híbrido, sendo necessário que se disponha de outros genitores com vários caracteres favoráveis (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995).

2.6.6 CULTURA DE TECIDOS

Os meios usados em cultura de tecidos vegetais contêm substâncias que podem induzir a formação de variantes, os quais apresentam diferenças fenotípicas em relação à planta-mãe que está sendo micropropagada (Cabot, 1987). Plantas de abacaxi da cultivar 'Smooth Cayenne', quando propagadas por cultura de tecidos, apresentaram variações na regularidade dos espinhos e coloração da folha (Wakasa, 1979).

Esta técnica pode ser utilizada em abacaxi para se obter variantes com características superiores. Caso um variante apresente alguma característica desejável, deve ser selecionado para produção de uma nova variedade. Outra possibilidade do uso da cultura de tecidos no melhoramento genético do abacaxi é na seleção *in vitro* de genótipos resistentes a doenças, mediante a incorporação de metabólitos do patógeno no meio de cultura.

A cultura de tecidos também pode ser utilizada para multiplicação rápida de genótipos selecionados em programas de melhoramento, objetivando reduzir o tempo para lançamento de novas cultivares, na conservação e intercâmbio de germoplasma.

2.6.7 MUTAGÊNESE

Substâncias mutagênicas podem ser aplicadas em diversas partes da planta para induzir mutações somáticas. Este procedimento, teoricamente, possibilita a criação de fenótipos com características especiais, que dificilmente seriam obtidos pelas técnicas de hibridação. A mutagênese tem sido pouco utilizada no melhoramento

genético do abacaxi para promover a diferenciação de clones em variedades comerciais (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995). Considerando-se que a variabilidade natural disponível é ampla e ainda não foi suficientemente explorada, justifica-se a não utilização da mutagênese em programas de melhoramento de abacaxi.

2.6.8 POLIPLÓIDES

Indivíduos triplóides podem ser obtidos pela união de óvulo diplóide – sem redução dos cromossomos na meiose – com pólen normal haplóide (Loison-Cabot, 1990). Também pode-se obter tetraplóides mediante o tratamento de coroas jovens com colchicina (0,2% a 0,4%) (Py *et al.*, 1984). Esses tetraplóides cruzados com indivíduos diplóides, possibilitam a produção de triplóides. Entretanto, as características inerentes aos poliplóides, a exemplo de crescimento lento e baixo conteúdo de açúcar no fruto, não justificam a poliploidização em abacaxi. Contudo, apesar do método demandar muito trabalho e gerar resultados incertos, Dujardin (1991) propôs o uso de tetraplóides em hibridações que permitiriam combinar em um triplóide o genoma inteiro de uma variedade comercial diplóide, com a metade do genoma de outra variedade ou de uma espécie selvagem diplóide, com características complementares, mas tal procedimento não evitaria a recombinação sexual no genoma parental tetraplóide.

2.6.9 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

As técnicas modernas de transformação genética permitem introduzir um gene ou grupos de genes em um clone, sem modificar suas principais características. Essas técnicas têm sido pouco usadas em abacaxi, mas abrem novas perspectivas para o melhoramento desta planta.

O desenvolvimento de resistência genética à murcha associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* e relacionada com a interferência de um vírus pode ser obtido transferindo-se parte do material genético desse vírus para o genoma do abacaxizeiro, mediante técnicas de transformação genética (Coppens d'Eeckenbrugge & Duval, 1995). Outras transformações também podem ser consideradas, como o bloqueio de genes responsáveis pela produção de etileno, a fim de inibir a floração natural e transferência de resistência a nematóides (Leal & Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

Para uma maior utilização dessas técnicas no melhoramento genético do abacaxizeiro tornam-se necessários trabalhos de mapeamento genético.

2.7 MELHORAMENTO VISANDO RESISTÊNCIA À FUSARIOSE

A fusariose do abacaxi, ocasionada pelo fungo *Fusarium subglutinans* é o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil, causando elevadas perdas na produção de frutos (Cabral *et al.*, 1985).

O melhoramento visando à obtenção de cultivares resistentes a doenças não difere, fundamentalmente, do melhoramento para outros caracteres. Qualquer método apropriado para a espécie em questão pode ser utilizado, desde que existam genes que confiram resistência a essa doença. Quando o parental resistente puder contribuir com outras características referentes à qualidade e produtividade, pode-se adotar os métodos genealógico ou da população, com cruzamentos simples, para se obter as populações segregantes. Quando a resistência ocorre em tipos que não podem ser

utilizados comercialmente por suas características agronômicas desfavoráveis, usam-se os métodos genealógico ou do retrocruzamento (Allard, 1966).

As cultivares de abacaxi apresentam comportamento diferenciado com relação à resistência à fusariose. Sob condições naturais de infecção, 'Perolera', 'Piña Negra', 'Rondon', 'Tapiricanga', 'Amapá', 'Amarelo-de-Uaupés', 'Cabezona', 'Turi Verde' e 'Ver-o-Peso', comportaram-se como resistentes (Giacomelli & Teófilo Sobrinho, 1984). Sob condições de inoculação artificial, as cultivares 'Ananás São Bento', 'Alto Turi', 'Huitota', 'Roxo de Tefé', 'Fernando Costa', 'Inerme CM', 'Perolera' e 'Primavera' expressaram reação de resistência à fusariose (Souto & Matos, 1978; Cabral *et al.*, 1985).

Os estudos relativos ao controle genético da fusariose encontram-se ainda em fase inicial, mas apresentam-se como alternativa promissora para a obtenção de cultivares comerciais com resistência (Ventura *et al.*, 1993). A avaliação de descendências oriundas do cruzamento 'Perolera' x 'S. Cayenne' tem possibilitado a seleção de híbridos resistentes e com potencial para se tornarem cultivares comerciais (Cabral & Matos, 1989; Cabral & Matos, 1995).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura desde 1984 vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético dirigido ao abacaxizeiro, objetivando desenvolver cultivares resistentes à fusariose com características comerciais (Cabral *et al.*,1997). As fontes de resistência 'Perolera', 'Primavera' e 'Roxo de Tefé' são cruzadas com 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' (suscetíveis) para produção de populações segregantes, nas quais são efetuadas as avaliações e seleções preliminares (Cabral & Matos, 1986).

Após a polinização controlada e fertilização, as sementes obtidas são semeadas em placas de Petri, utilizando-se como substrato o papel de filtro umedecido com água destilada. Completada a germinação, procede-se o transplante dos *seedlings* para canteiros móveis de isopor, os quais são colocados em casa de vegetação, onde permanecem por seis a oito meses, até as plantas atingirem o tamanho adequado para inoculação.

A inoculação artificial é realizada imergindo-se plantas com 10-15 cm de altura, contendo ferimentos na região do colo, numa suspensão de *F. subglutinans*, 10^4 conídios/mL, por três minutos. Decorridos 100 dias da inoculação, os genótipos suscetíveis e as plantas da cultivar testemunha usadas como referência já se encontram completamente mortos.

Os genótipos sobreviventes à inoculação e que, conseqüentemente, se comportaram como resistentes, bem como aqueles com folhas sem espinhos, são plantados em campo, para serem avaliados durante o ciclo sexual, de acordo com o critério de seleção. Além da resistência, são observados outros caracteres adicionais, como: altura da planta até a base do fruto, comprimento e diâmetro do pedúnculo, espinescência, número de mudas na colheita (filhotes e rebentões), peso do fruto sem coroa, peso e comprimento da coroa, comprimento e diâmetro do fruto, forma e coloração do fruto, cor da polpa, diâmetro do eixo do fruto, ocorrência de sementes, teores de sólidos solúveis totais e acidez titulável.

Os híbridos selecionados como promissores no ciclo sexual são submetidos a duas avaliações clonais para se observar a estabilidade das características observadas na seleção. Nesta fase são utilizadas todas as mudas produzidas pelo híbrido selecionado, sendo, portanto, variável o número de mudas por genótipo.

Os clones elites selecionados nas avaliações clonais são posteriormente avaliados em experimentos de competição de clones, implantados em diferentes ecossistemas, utilizando-se as cultivares 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' como referência.

No programa desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura foram avaliados 30.200 híbridos, o que possibilitou a seleção preliminar de 57 genótipos durante o ciclo sexual. Estes híbridos apresentaram várias características favoráveis, além de resistência à fusariose. Os genótipos que mantiverem essas características na fase de avaliação clonal poderão ser recomendados como cultivares.

Vale destacar que a utilização de cultivares resistentes à fusariose possibilitará um incremento de 30% a 40% na produtividade da cultura, reduzindo os custos de produção, visto que será eliminada a aplicação de fungicidas no controle da doença. Além disso, obtém-se um produto de melhor qualidade aliado a uma melhor proteção ambiental.

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O melhoramento do abacaxi por hibridação vem sendo praticado há mais de 100 anos. Apesar de ter gerado muito conhecimento básico sobe genética, ainda não possibilitou o desenvolvimento de uma nova cultivar superior à 'Smooth Cayenne', que continua predominando nos plantios comerciais em todo o mundo. Desse modo, supõe-se que todas as cultivares de importância comercial foram originadas de seleções feitas pelos Ameríndios, durante o período pré-colombiano.

Os programas de melhoramento genético do abacaxizeiro poderiam ser orientados para atender as demandas atuais do mercado de fruta *in natura*, obtendo cultivares de frutos de melhor qualidade, de maior vida de prateleira, mais adequado ao transporte e conservação, de polpa firme e de elevado teor de ácido ascórbico. Como em outras frutas, também deveria ser prioritário a criação de cultivares com casca de cor mais atraente.
Considerando-se os resultados pouco favoráveis obtidos pelos programas de melhoramento genético do abacaxi que já foram até então desenvolvidos em todo o mundo, na concepção de novos programas propõe-se:

a) Intensificar estudos de genética básica, tais como: citogenética, herdabilidade, heterose, combinação de genitores, efeitos da homozigose, marcadores moleculares e mapeamento genético;
b) Ampliar a base genética útil para o melhoramento. Para isso tornam-se imprescindíveis a caracterização e avaliação do germoplasma disponível, além do pré-melhoramento. A avaliação de recursos genéticos pode indicar caracteres potencialmente úteis para o melhoramento;
c) Reduzir a taxa de recombinação, produzindo híbridos a partir de genitores menos heterozigotos, obtidos por autofecundação. Deve-se estudar os efeitos da homozigose nesta linha de trabalho;
d) Refletir sobre os métodos clássicos de melhoramento e ampliar os trabalhos com técnicas de biologia molecular, engenharia genética e associar essas técnicas com o melhoramento clássico;
e) Definir objetivos específicos bem delineados visando obter cultivares específicas para consumo de fruto *in natura* e outras para indústria, abandonando o conceito de cultivar de duplo uso e promovendo uma diversificação varietal.

Adotando-se esses procedimentos espera-se que os programas de melhoramento atinjam os objetivos propostos e que o lançamento de novas cultivares ocorra freqüentemente em menor espaço de tempo.

3. MELHORAMENTO GENÉTICO DA ACEROLA

3.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A acerola, também conhecida como cereja-das-antilhas, pertence à ordem Rutales, família Malpighiaceae, gênero *Malpighia*. Segundo Joly (1976), a família Malpighiaceae compreende cerca de 63 gêneros, de ampla distribuição nas regiões tropicais, especialmente americanas.

Ao nível de espécie, a classificação botânica da acerola é bastante controvertida. Sua designação mais comum tem sido *Malpighia glabra* (L.), sendo *M. punicifolia* (L.) a principal sinonímia (Marino Netto,1986; Alves, 1993b). A esse respeito, Alves (1993b) com base em publicação realizada por Asenjo (1980), comenta que estudos conduzidos nos herbários de Linneau, entre outras fontes de informações, indicam que o nome correto para essa espécie é *M. emarginata* D.C. Amorim[1], por sua vez, entende que o termo *M. punicifolia* é mais recomendável.

3.2 ORIGEM E DISPERSÃO

A acerola teve sua origem na América Tropical, vegetando de forma natural na região banhada pelo Mar das Antilhas, a saber, Sul do México, América Central e Norte da América do Sul, sendo incerto, porém, o local exato de seu surgimento (Marino Netto, 1986; Alves & Menezes, 1995). Sua dispersão inicial deu-se muito antes do descobrimento da América, contando com a ação de pássaros e nativos, que a disseminaram de ilha em ilha na Região do Caribe (Marino Netto, 1986; Couceiro citado por Alves & Menezes, 1995).

Em 1880, a partir de Havana, Cuba, a acerola foi introduzida na Flórida, EUA, onde, já nos idos de 1887-1888, figurava em catálogos de viveiristas comerciais (Marino Netto, 1986; Couceiro citado por Alves & Menezes, 1995). Em abril de 1958, a Profª. Maria Celene Cardoso de Almeida levou-a, via sementes, de Porto Rico para a Universidade Federal Rural de Pernambuco. Sobre o assunto, Marino Netto (1986) comenta que o catálogo de plantas dos viveiros Dierberger, Limeira-SP, em 1940, já dispunha de mudas de cereja-das-antilhas. Há evidências, contudo, de que a acerola já era cultivada no Brasil desde a primeira metade do século XIX na Quinta de São Cristovão, Cidade do Rio de Janeiro, segundo indicações de Franz Niedenzu (Niedenzu, 1928).

Atualmente, além da Região do Caribe, a acerola é cultivada principalmente no Brasil e nos Estados Unidos da América do Norte (Flórida e Havaí), também sendo encontrada em outros países, a exemplo do Japão, Tailândia e Vietnã.

3.3 RECURSOS GENÉTICOS

Com a finalidade de coletar, conservar, caracterizar e avaliar a variabilidade genética disponível, foi constituído o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Acerola da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA, que conta atualmente com 154 acessos obtidos de amostragens realizadas principalmente em pomares

[1]AMORIM, A.M. de A. (Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC. Ilhéus) Comunicação pessoal, 1999.

comerciais localizados nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste do Brasil. Esse germoplasma vem sendo mantido em campo, mediante propagação por enxertia (garfagem no topo), na razão de cinco plantas por acesso, observando-se um espaçamento de 4m x 5m.

A caracterização do germoplasma considera diversos caracteres, a partir dos quais pretende-se definir uma lista de descritores mínimos (Oliveira & Soares Filho, 1994; Oliveira & Soares Filho, 1998a). Essa relação de descritores será baseada nos seguintes caracteres: a) planta (conformação da copa; altura e diâmetro da copa; diâmetro do caule; coloração, textura, dimensões e formatos foliares; pilosidade na folha e no ramo); b) inflorescência (tipo de florescimento; densidade de inflorescência; número de flores na panícula; coloração dos lóbulos da corola das flores); c) fruto (número de frutos por panícula; uniformidade de distribuição e maturação de frutos; capacidade de aderência do pedúnculo no fruto e no ramo; coloração da casca do fruto imaturo e maduro; coloração da polpa de frutos maduros; formato do fruto; textura da casca e presença de sulcos na superfície do fruto; peso, comprimento e diâmetro do fruto; aroma, consistência, oxidação e peso da polpa; relação polpa/semente; teor de sólidos solúveis totais e de acidez; relação acidez/sólidos solúveis totais; percentagem de ácido ascórbico e açúcares totais; teores totais de carotenóides, pectina e antocianina na polpa de frutos); d) sementes (número de sementes por fruto, formato, peso fresco, percentagem de germinação).

3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO

A importância econômica da acerola advém principalmente do elevado teor de vitamina C de seus frutos. Dentre os problemas com os quais a cultura se defronta um dos mais importantes é o pequeno número de variedades disponíveis no Brasil. A introdução de variedades de acerola de países como Porto Rico e Estados Unidos da América do Norte (Flórida e Havaí) constitui iniciativa de grande interesse (Oliveira & Soares Filho, 1995).

Em razão do emprego de mudas propagadas por sementes, os pomares comerciais brasileiros apresentam ampla variabilidade entre indivíduos, sendo comum a ocorrência de expressivas variações entre plantas, compreendendo diversos caracteres, como: arquitetura da copa, vigor da planta, produtividade, qualidade de frutos, entre outros (Almeida & Araújo 1992; Alves, 1989; Alves, 1993b). Essa variabilidade genética possibilita a seleção de genótipos agronomicamente promissores, os quais, mediante o emprego de técnicas já conhecidas de propagação vegetativa, como a estaquia e garfagem, podem ser clonados e assim introduzidos como novas variedades nos sistemas de produção, contribuindo com a melhoria dos níveis de produtividade e qualidade de frutos. Como exemplo de variedades atualmente usadas pelos produtores pode-se citar as variedades 'Okinawa', 'Flor Branca', 'Coopama nº 1' e 'Sertaneja' (Embrapa Semi-Árido, 1998).

A recomendação de variedades é um dos objetivos do Programa de Melhoramento Genético de Acerola da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que inicialmente vem sendo realizado através da caracterização e avaliação dos genótipos presentes em seu Banco Ativo de Germoplasma, com o uso dos descritores já mencionados. Com base nesta caracterização, cinco acessos foram preliminarmente selecionados com boas características de frutos para processamento: alto conteúdo de

vitamina C, em torno de 1500 mg de ácido ascórbico/100g de polpa em frutos maduros, teor de sólidos solúveis totais superior a 6,5º Brix, frutos de tamanho médio e polpa firme. Da mesma forma, outros genótipos que apresentam boas características de fruto para consumo *in natura* têm sido selecionados como variedade de mesa: frutos de tamanho médio a grande, de casca lisa e cor vermelho-alaranjada, polpa firme, alaranjada, com teor de vitamina C em torno de 1000 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa, alta relação polpa/semente e boa palatabilidade. Genótipos de acerola com potencial para serem utilizados como planta ornamental e/ou porta-enxerto também têm sido obtidos.

A necessidade de desenvolvimento de protocolos que permitam a multiplicação rápida de genótipos indicados como variedades através da micropropagação é uma ação de pesquisa a ser realizada concomitante com a recomendação de variedades de acerola, com o intuito de viabilizar sua adoção. Além disso, o reconhecimento de agentes bióticos (pragas, doenças, ervas daninhas) e abióticos (relacionados ao clima e solos) e seu efeito na produção deve sempre ser levado em conta na seleção das variedades mais apropriadas para cada região.

Ações de pesquisa dirigidas para a identificação de genótipos de acerola suscetíveis/resistentes a nematóides têm sido executadas, porém sem sucesso até o momento. Espécies e raças de nematóides formadores de galhas em acerola, identificadas mediante o emprego de eletroforese, permitiram reconhecer as raças 1, 2, 3 e 4 de *Meloidogyne incognita*, raça 2 de *M. arenaria* e a espécie *M. javanica* em áreas de plantio em diversos Estados brasileiros. Dos 10 genótipos de acerola testados com relação à reação a *M. javanica* e *M. arenaria* raça 2, todos mostraram-se suscetíveis com base no índice de massa de ovos (Costa *et al.*, 1999). Como estes nematóides causam perdas na produção e redução no período de vida útil das plantas, deve-se continuar buscando fontes de resistência/tolerância.

O BAG Acerola, além disso, vem sendo utilizado no levantamento de insetos associados a esta fruteira, objetivando a identificação de espécies causadoras de danos econômicos, estando previstas avaliações complementares em áreas comerciais. Dentre os insetos praga identificados em associações com acerola encontram-se o bicudo-do-botão-floral (*Anthonomus acerolae*), o percevejo-vermelho-pequeno (*Crinocerus sanctus*), o pulgão (*Aphis spiraecola*), a mosca-das-frutas (*Ceratitis capitata*), a ortézia-dos-citros (*Orthezia praelonga*), a cigarrinha (*Bolbonota tuberculata*) e o minador-da-folha (*Physocorina scabra*) (Nascimento *et al.*, 1998; 1999). Segundo informações disponíveis, dentre estas espécies o bicudo-do-botão-floral, o percevejo-vermelho-pequeno e o pulgão são prioritários como objeto de pesquisa. Observações de campo indicam a existência de diferenças quanto à suscetibilidade dos acessos do BAG no tocante ao ataque de ortézia e do bicudo-do-botão-floral, justificando a realização de pesquisas no sentido de selecionar genótipos com valor comercial e que apresentem menor preferência por parte destas e de outras pragas.

4. MELHORAMENTO GENÉTICO DA BANANA

4.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A bananeira (*Musa* spp.) apresenta um sistema radicular fasciculado, ausência de câmbio vascular e flores típicamente trímeras, sendo incluída na classe Liliopsida,

subclasse Zingiberidae e superordem Lilianae (Cronquist, 1981). A presença do perigônio colorido e ovário aderente e ínfero permite classificá-la na ordem Zingiberales (Scitamineae) (Takhtajan, 1953). Esta ordem apresenta oito famílias; Musaceae, Cannaceae, Marantaceae, Zingiberaceae, Lowiaceae, Costaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae (Belalcázar Carvajal, 1991), com diferentes números de gênero (Simmonds, 1973): Lowiaceae, um gênero (*Orchydantha*); Cannaceae, um gênero (*Canna*); Musaceae, dois gêneros (*Musa e Ensete*); Strelitziaceae, quatro gêneros (*Strelitzia, Heliconia, Ravenala* e *Phenakospermum*); Marantaceae, 25 gêneros, destacando-se o *Calathea* com diversas espécies ornamentais e Zingiberaceae, 45 gêneros, sendo *Zingiber* o mais importante comercialmente.

Embora Simmonds (1973) tenha identificado apenas dois gêneros (*Musa* e *Ensete*) na família Musaceae, sabe-se atualmente que tal família possui mais de dois gêneros pois é dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. Os gêneros *Ensete* e *Musa* pertencem à subfamília Musoideae, sendo que ao gênero *Musa* pertencem as bananeiras com frutos comestíveis. Segundo Valmayor *et al.* (1991) este gênero foi criado por Karl Linneau, provavelmente em homenagem ao romano Antonius Musa, físico do primeiro imperador de Roma, Octavio Augustus.

O gênero *Musa* está subdividido nas seções Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys e Eumusa de acordo com o número de cromossomos, de tal forma que o genoma com 11 cromossomos é característico de Eumusa e Rhodoclamys, enquanto que 10 cromossomos constitui o número básico de Callimusa e Australimusa. A seção Eumusa apresenta a maior dispersão geográfica e inclui as espécies: *Musa schyzocarpa* (Simmonds), *M. basjoo* (Siebold), *M. itinerans* (Cheesman), *M. nagensium* (Prain), *M. flaviflora* (Simmonds), *M. sikkimensis* (Kurz), *M. cheesmani* (Simmonds), *M. balbisiana* (Colla), *M. acuminata* (Colla) e *M. halabanensis* (Meijer) (Tezenas du Montcell, 1988).

O gênero *Musa* foi classificado inicialmente por Linneau em apenas duas espécies, *Musa sapientum* e *Musa paradisiaca*. À primeira espécie pertence as bananeiras cujos frutos são consumidos *in natura* ou crus, sendo classificadas como *Musa paradisiaca,* aquelas normalmente utilizadas cozidas ou fritas. Esta classificação, sem base científica, é notadamente artificial (Simmonds, 1966).

Segundo Cheesman (1948), *M. sapientum* corresponde a um clone em Trinidad conhecido como 'Silk Fig' e na Venezuela como 'Cambur Manzano', enquanto que *M. paradisiaca* é o plátano 'Dominico' da Venezuela. Portanto, conclui o autor que Linneau não teve oportunidade de conhecer as diversas espécies e variedades de *Musa*, limitando-se em sua classificação aos clones citados anteriormente.

4.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO

O centro de origem da maior parte do germoplasma de bananeira está localizado no continente asiático. Outros centros secundários ocorreram na África Oriental e em algumas ilhas do Pacífico levando ainda uma considerável variabilidade genética na África Ocidental (Champion, 1967). As cultivares encontradas nestas regiões evoluíram de espécies selvagens e apresentam três níveis cromossômicos, existindo diplóides com 22 cromossomos (2x), triplóides com 33 (3x) e tetraplóides com 44 (4x), que são múltiplos do número básico ou genoma (n=11), sendo que a

origem de triplóides a partir dos diplóides e de tetraplóides a partir dos triplóides é facilmente constatada através de cruzamentos experimentais (Shepherd, 1984).

Cruzamentos interespecíficos entre *M. acuminata Colla* e *M. balbisiana Colla* deram origem à maioria dos genótipos de bananeira atualmente em uso para alimentação, razão pela qual as plantas geradas destes cruzamentos apresentam características das duas espécies (Simmonds, 1973). Estes híbridos podem apresentar diversas ploidias, verificando-se casos com 20, 22, 33, 44, 55, 77 e 88 cromossomos, onde se encontram inclusive vários tipos de aneuploidias. A espécie *M. acuminata* é seminífera, com diversas subespécies, enquanto que a *M. balbisiana,* também seminífera, é mais vigorosa.

Um estudo desenvolvido por Cheesman (1948) explicou a participação das espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana* na origem das bananeiras com frutos comestíveis. Simmonds & Shepherd (1955) comprovaram estes resultados através de estudos taxonômicos baseados em 15 características morfológicas das duas espécies, embora não descartassem a possibilidade da contribuição, em pequena escala, de outras espécies, como a *M. schyzocarpa*, oriunda da Nova Guiné. Desta forma, nesta ilha, é possível a ocorrência de combinações como AS e ABBS. Os estudos destes autores levaram à constatação dos seguintes grupos (genômicos): diplóides-AA e AB; triplóides- AAA, AAB e ABB; tetraplóides-AAAA, AAAB, AABB e ABBB, sendo esta classificação adotada em todo o mundo. Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o uso do termo subgrupo para denominar um complexo de cultivares originárias através de mutações de uma única cultivar original (Shepherd *et al.*, 1984), como no caso do grupo AAA, subgrupo Cavendish e do grupo AAB, subgrupos Prata e Terra, no Brasil.

4.3 MÉTODOS DE MELHORAMENTO

As primeiras tentativas de pesquisas na área de melhoramento genético da bananeira ocorreram em três diferentes locais, Trinidad em1922, Jamaica em 1924 e Honduras em 1930, sendo motivadas pela murcha de *Fusarium* (mal-do-Panamá) que infestou a cultivar Gros Michel. O objetivo principal era produzir uma bananeira com todas as qualidades da 'Gros Michel', mas com resistência ao mal-do-Panamá. No início da década de 1930, foi sintetizado o primeiro tetraplóide a partir do cruzamento de 'Gros Michel', triplóide (AAA), usado como genitor feminino, com a espécie silvestre diplóide *Musa acuminata*, subespécie *malaccensis*. Foi então criado um sistema de hibridação que permitia o melhoramento de algumas cultivares triplóides de bananeira, que continua sendo universalmente usado, com resultados satisfatórios (Shepherd, 1992).

Atualmente, além do melhoramento convencional, técnicas modernas, como a hibridação somática e a engenharia genética vêm sendo utilizadas com sucesso no melhoramento da bananeira (Matsumoto & Oka, 1997a).

4.3.1 INTRODUÇÃO E SELEÇÃO DE CLONES

A aquisição de germoplasma promissor introduzido de outras regiões pode atingir os mesmos propósitos de um programa de melhoramento para obtenção de variedades superiores. Assim, a introdução é considerada como um método de

melhoramento, visto que fornece a variabilidade genética necessária para a obtenção de cultivares e/ou seleção de clones (Elliott, 1958; Allard, 1966).

As atividades de melhoramento genético da bananeira na Embrapa foram iniciadas em 1983, com a introdução de germoplasma nacional e coleta ao nível internacional (Alves, 1993a; Dantas *et al.*, 1993), formando assim o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Banana, que é constituído de 283 acessos dos quais 87% são cultivares e 13% espécies selvagens. Dentre estas últimas predominam a *Musa acuminata* e a *M. balbisiana.* Os acessos do grupo genômico AAB, cujos representantes mais importantes no Brasil são as cultivares Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore e Terra, são os que ocorrem com maior freqüência (36%). Em seguida destacam-se os acessos dos grupos AA e AAA representados, no país, respectivamente pela 'Ouro' e pelas cultivares Caru Verde, Caru Roxa, São Tomé, Nanica, Nanicão e Grande Naine. Os grupos AB, AAAB e AAAA, embora presentes, ocorrem em baixa freqüência (Silva & Shepherd, 1991). Resultados da caracterização dos acessos, estão em catálogo recentemente publicado na Embrapa (Silva *et al.*, 1999).

A avaliação do germoplasma de banana levou à identificação dos acessos diplóides (AA) promissores (espécies silvestres Calcutta, Madang e Malaccensis; cultivares Lidi, Sinwobogi, Tjau Lagada, Tuu Gia e Heva e híbridos M-48, M-53, M-61, F_2P_2 e F_3P_4) usados no programa de melhoramento, e de cultivares triplóides (AAB) que apresentam boas características agronômicas e/ou resistência/tolerância à pragas e doenças, a exemplo da 'Pacovan', 'Prata Anã', 'Caipira', 'Thap Maeo' já recomendadas aos agricultores e 'Figue Pome Naine', cultivar tipo 'Maçã', com porte baixo (Silva *et al.*,1997).

Em bananeira ocorrem variações somaclonais ao nível muito superior ao que se observa na maioria das outras culturas (provavelmente devidas à instabilidade mitótica), que não são exclusivas da cultura de tecidos, sendo também observadas em campo, porém em freqüências menores (Shepherd, 1984; Withers, 1992). Desta forma, pode ser explicado o aparecimento de dezenas de cultivares do grupo genômico (AAA), subgrupo Cavendish, e de cultivares AAB como a 'Pacovan', mutante da 'Prata'. Assim, a prática de seleção de clones superiores pode contribuir para aumentos significativos da produção e melhoria da qualidade dos frutos em bananeira. Lichtemberg (1997) destacou a importância da seleção de mutantes naturais na bananicultura de Israel, da África do Sul, da Austrália e da Espanha (Ilhas Canárias). Em Israel, empresas particulares mantêm programas de melhoramento usando a seleção de clones para obtenção de novas cultivares Cavendish (Khayat *et al.*, 1998). Mudas micropropagadas destes novos clones têm sido exportadas para todo o mundo, inclusive para as Américas Central e do Sul e, mais recentemente, para o Nordeste do Brasil.

Embora mais difícil do que obter materiais superiores em qualidade, produtividade, arquitetura e porte da planta, é possível selecionar mutantes mais resistentes a pragas e doenças (Hwang & Ko, 1990).

4.3.2 MELHORAMENTO POR HIBRIDAÇÃO

A indução de mutações, o uso da engenharia genética e a hibridação convencional são técnicas de possível aplicação em bananeira. Atualmente, entretanto, somente a hibridação tem-se mostrado eficaz no seu melhoramento.

Obviamente, face à esterilidade feminina das bananeiras comestíveis, não basta apenas existir a variabilidade genética básica. Também deve haver opções de hibridação para o aproveitamento dessa variabilidade na geração de novas cultivares com características melhoradas. No entanto, a experiência tem mostrado que a esterilidade feminina das cultivares existentes não é totalmente absoluta. A maioria delas, em todos os níveis de ploidia, é capaz de produzir sementes em polinizações controladas, com maior ou menor freqüência. Essa produção é geralmente mais evidenciada após fertilizações com pólen haplóide A, originário de formas selvagens, cultivares e híbridos de constituição AA (Dantas *et al.*, 1997).

Na formação do gameta feminino, acredita-se que a meiose seja o acontecimento predominante em todos os casos, tanto em espécies selvagens como em híbridos ou cultivares. Contudo, duas outras situações podem ocorrer proporcionando a formação de megásporos e sacos embrionários com o número cromossômico maternal ou a produção de megásporos e sacos embrionários com o número cromossômico maternal duplicado (dupla restituição). Esses dois últimos padrões são conseqüência da não redução dos cromossomos na meiose, podendo ocorrer em diplóides, mas sendo, mais freqüentes em triplóides. Todavia são pouco comuns em tetraplóides (Dantas *et al.*, 1997).

A fertilização de sacos embrionários com número cromossômico maternal duplicado pode conduzir a sementes viáveis, mas não a plantas úteis. A fertilização de sacos não reduzidos diplóides ou triplóides favorece a obtenção de resultados desejáveis em programas de hibridação, visando novos genótipos triplóides ou tetraplóides, seja diretamente ou por cruzamentos secundários posteriores. Podem ser consideradas quatro classes de hibridação, a saber (Dantas *et al.*, 1997):

a) Triplóides resultantes de cruzamentos de diplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do parental diplóide masculino. As sementes obtidas a partir de genitores femininos AA com o pólen A normalmente contêm embriões que são novamente diplóides, originando-se de células-ovo com apenas 11 dos 22 cromossomos maternais. Excepcionalmente, as células-ovo podem ser dotadas de todos os 22 cromossomos maternais ou até desse número duplicado e que após serem fertilizadas por pólen haplóide, geram embriões triplóides e pentaplóides, respectivamente. Teoricamente, existem as mesmas alternativas a partir de plantas AB, sejam cultivares existentes ou híbridos sintetizados. Foi dessa maneira que as cultivares triplóides supostamente evoluíram, sendo esta a principal opção para a produção artificial de novas cultivares triplóides.

b) Tetraplóides resultantes de cruzamentos de triplóides com diplóides, com a recombinação originária apenas do parental diplóide masculino. Uma cultivar triplóide com um pouco de fertilidade feminina pode produzir embriões e híbridos possuindo entre 22 e 33 cromossomos em função da meiose desequilibrada (sacos embrionários com 11 a 22 cromossomos mais 11 cromossomos do pólen haplóide), bem como embriões e híbridos com 44 cromossomos (33 mais 11) ou 77 cromossomos (duas vezes 33 mais 11). Na prática, entretanto, são os híbridos tetraplóides com 44 cromossomos que têm potencial para ser utilizados como cultivares comerciais e que representam a segunda opção de melhoramento por hibridação. É importante ressaltar que o pólen contribui com apenas um quarto do novo genótipo em cada fertilização

deste tipo. Portanto, é basicamente um processo de implantação de características adicionais, sem provocar outras grandes alterações. Assim, o híbrido tetraplóide sempre apresenta as características do parental feminino triplóide, inclusive aquelas relacionadas ao paladar do fruto.

c) Tetraplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides, com segregação nos dois genitores. As bananeiras tetraplóides, sejam espontâneas ou sintetizadas, possuem número par de cromossomos (44) e, teoricamente, deveriam ser mais férteis que os triplóides. O pólen diplóide dos tetraplóides, entretanto, apresenta uma potência bem reduzida, que raramente permite a autofertilização ou a fertilização de outros tetraplóides. Os tubos polínicos diplóides são em pequeno número e de crescimento muito lento, em relação aos tubos desenvolvidos por pólen haplóide. Em função disso, a produção de tetraplóides secundários é dificilmente praticável devido à baixíssima produção de sementes.

d) Triplóides resultantes de cruzamentos entre tetraplóides e diplóides, também com segregação nos dois genitores. Utilizando-se o pólen A de diplóides, é freqüentemente possível obter bons rendimentos de sementes e, consequentemente, híbridos secundários triplóides.

A seguir, são discutidos os procedimentos utilizados pelo melhoramento genético da bananeira na Embrapa, que consiste em duas etapas distintas: melhoramento ao nível diplóide e produção de tetraplóides a partir de triplóides.

4.3.2.1 MELHORAMENTO AO NÍVEL DIPLÓIDE

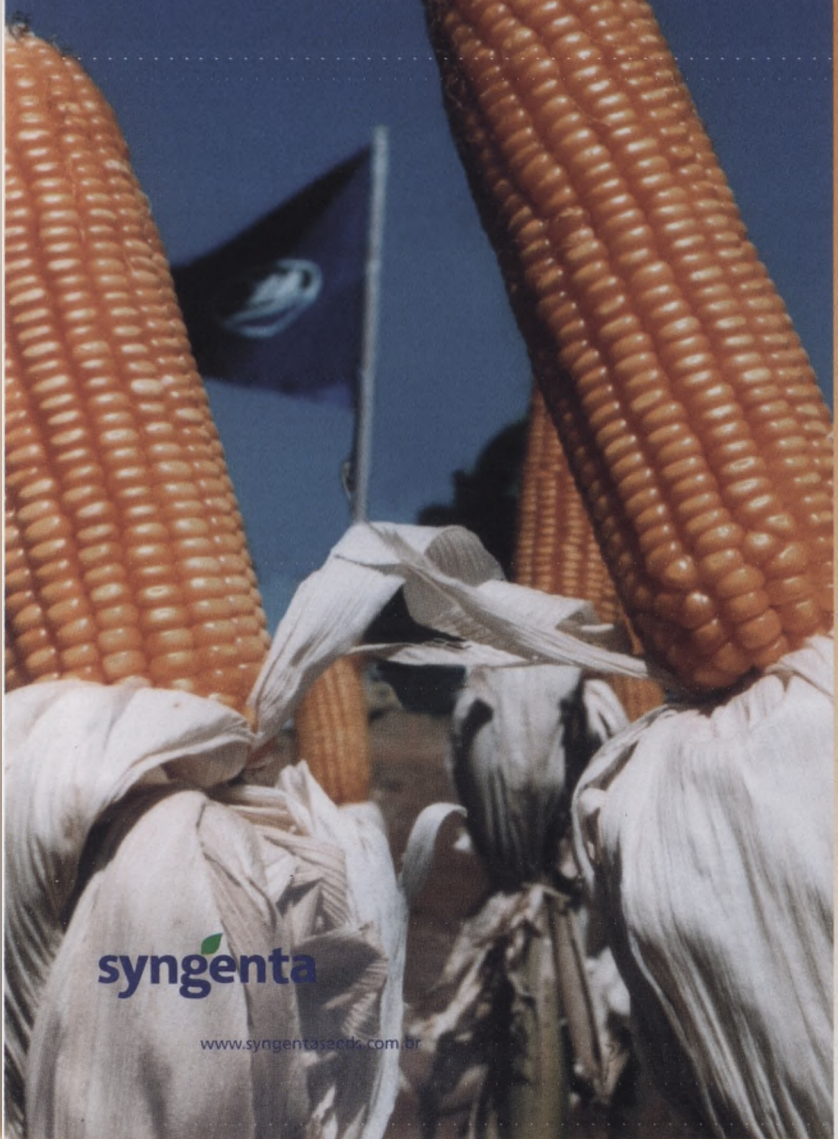
Na bananeira, a variabilidade genética importante localiza-se nas diversas formas selvagens da espécie *M. acuminata* e nas cultivares do grupo AA. Esta espécie abrange sete subespécies, algumas ainda não bem definidas e cada uma com a sua própria distribuição na Ásia e Oceania. As diferenças morfológicas são tão acentuadas que, se não fosse a facilidade de se obter híbridos férteis entre estas subespécies, seria possível classificá-las como espécies distintas. As cultivares AA também apresentam uma grande variabilidade morfológica, muitas mostrando-se estéreis ou pouco férteis (Shepherd *et al.*, 1986).

Os resultados de um programa de melhoramento de bananeira por hibridação, independentemente dos seus objetivos (produção de triplóides ou tetraplóides), dependem basicamente da qualidade dos genitores diplóides utilizados na geração dos híbridos desejáveis, pelo papel fundamental na incorporação de características de valor agronômico.

As características desejáveis de *M. acuminata*, entretanto, não se encontram juntas num mesmo indivíduo, mas distribuídas entre muitos acessos básicos diplóides. Portanto, em qualquer programa de melhoramento convencional, torna-se necessário um projeto adicional de hibridação, recombinação e seleção ao nível diplóide, envolvendo subespécies de *M. acuminata* e suas cultivares.

O objetivo do melhoramento do germoplasma AA é concentrar, em um mesmo genótipo, o maior número de características desejáveis, tais como partenocarpia, bom número de pencas, dedos compridos, cachos bem formados, porte baixo e resistência a pragas, doenças e nematóides, mediante cruzamentos de diplóides selecionados. Na polinização, as inflorescências femininas são protegidas

Produtividade, Sanidade e Qualidade de Grãos



Os altos investimentos em pesquisa tecnológica e desenvolvimento de produtos nos últimos tempos, fazem com que as sementes de milho híbrido NK tenham um padrão de qualidade superior.

Os grãos duros, alaranjados e pesados apresentam menor incidência de grãos ardidos, proporcionando uma excelente **qualidade de grãos**.

A alta tolerância às doenças foliares e do colmo, fazem com que as lavouras plantadas com sementes NK sejam destaque e referência no mercado em **sanidade de planta**.

E a ótima rentabilidade dos produtos NK você confirma na **produtividade**.

syngenta

www.syngentaseeds.com.br

NK

A PRIMEIRA EM PRODUTIVIDADE
COM QUALIDADE DE GRÃOS

com saco plástico no final de cada tarde. Nas manhãs seguintes, as flores masculinas são coletadas em estádio próximo à antese. Com uma espátula retiram-se os grãos de pólen das anteras, colocando-os em contato com os estigmas das flores femininas, que se encontram abertas. Nos dias seguintes, essas operações são repetidas até que todas as pencas sejam polinizadas. O saco plástico protetor é retirado da inflorescência dois dias após a última polinização.

Quinze híbridos sintetizados são inicialmente avaliados individualmente e, posteriormente, efetua-se a avaliação clonal ou de cinco plantas de cada genótipo. Em ambas as etapas são consideradas 23 caracteres sendo a altura da planta, o número de dedos, o comprimento dos dedos, a fertilidade masculina e feminina e a resistência à Sigatoka amarela os mais importantes na seleção de híbridos; os demais constituem-se em critérios auxiliares, desde que o genótipo tenha se enquadrado nos escores mínimos estipulados pelos descritores essenciais. A resistência ao mal-do-Panamá é avaliada segundo o método proposto por Cordeiro *et al.* (1993) e a resistência à Sigatoka amarela e à Sigatoka negra de acordo com Inibap (1994). A avaliação da fertilidade masculina e feminina é efetuada com base na presença de pólen e sementes nos genótipos, usando-se uma escala numérica de 1 a 5, sendo 1 correspondente à ausência e 5 à abundância da característica.

Aproximadamente 20.000 híbridos foram avaliadas em condições de campo, resultando na seleção individual (planta única) de 72. Na fase clonal foram selecionados os híbridos 0116-01, 0304-02, 0323-01, 0337-01, 0338-02, 1304-01, 1304-04, 1304-06, 1318-01, 1319-01, 1741-01, 2803-01, 4223-03, 4223-06, 5119-01, TH03-01, 4215-02, 4249-06, 4252-03, 4252-04, 4279-06, 4154-01, 4154-06, 4154-08, 5854-02, 5854-03 e 7341-03. Estes híbridos, juntamente com dois introduzidos da Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (SH3263 e SH3362), apresentam resistência à Sigatoka amarela e boa produtividade e constituem o campo de polinização para geração de novos diplóides e tetraplóides. Acrescenta-se ainda que os híbridos 1319-01 e TH03-01 são também resistentes ao mal-do-Panamá e o SH3263 apresenta resistência à Sigatoka negra.

Quinze híbridos diplóides selecionados para característica agronômicas estão sendo avaliados para resistência ao mal-do-Panamá e a nematóides, em Cruz das Almas-BA, e para resistência à Sigatoka negra, em Manaus-AM e Costa Rica.

Os híbridos assim gerados são posteriormente cruzados com triplóides comerciais para a formação de híbridos tetraplóides.

4.3.2.2 PRODUÇÃO DE TETRAPLÓIDES A PARTIR DE TRIPLÓIDES

Esta tem sido a metodologia básica aplicada desde o início dos trabalhos de melhoramento genético de bananeira, embora até o final da década passada tenha sido restrita à produção de híbridos tetraplóides a partir de triplóides AAA do subgrupo Gros Michel, polinizados por pólen A. A aplicação a outras cultivares ou outros subgrupos é dependente da capacidade dos genótipos em produzir sementes após polinização apropriada, do poder germinativo das sementes e da presença de tetraplóides entre os híbridos recuperados. Atualmente, a metodologia vem sendo empregada com êxito também nos triplóides AAB e ABB.

Na produção de tetraplóides a partir de triplóides (3x x 2x ⇒ 4x), pode-se atingir os seguintes objetivos por meio da utilização de determinados grãos de pólen A (Dantas *et al.*, 1997):

- Resistência à Sigatoka negra (para todas as cultivares importantes dos grupos AAA, AAB e ABB);
- Resistência ao mal-de-Sigatoka ou Sigatoka amarela (subgrupo Gros Michel, subgrupo Cavendish, subgrupo Prata e 'Prata Anã');
- Resistência à raça 2 do mal-do-Panamá (subgrupo Gros Michel, 'Maçã', subgrupo Figo e outros casos possíveis);
- Resistência a nematóides (mais relevante em relação aos subgrupos Cavendish, Terra e Figo);
- Resistência à broca (subgrupo Terra);
- Porte baixo ('Maçã', 'Mysore', subgrupos Prata e Terra);
- Curto ciclo de produção (subgrupo Gros Michel e cultivares do grupo AAB);
- Maior número de pencas ('Maçã', 'Prata Anã', e subgrupo Prata);
- Maiores frutos ('Maçã', 'Mysore', 'Prata Anã' e subgrupo Prata).

Apesar da tendência mundial dos programas de melhoramento em se chegar a um triplóide a partir do cruzamento de um tetraplóide melhorado com diplóide (4x x 2x ⇒ 3x) os híbridos até agora recomendados são tetraplóides.

Os híbridos tetraplóides (AAAB) de banana gerados na Embrapa são obtidos mediante cruzamentos de diplóides (AA) com cultivares triplóides (AAB) tipos Prata e Maçã. Para aumentar a taxa e a uniformidade de germinação das sementes tetraplóides a cultura de embriões vem sendo empregada, e desta forma recuperar um maior número de híbridos.

A avaliação dos tetraplóides é feita de forma semelhante à dos diplóides, considerando as características de sabor e qualidade dos frutos como as mais importantes.

O programa já produziu e avaliou cerca de 2.000 híbridos de constituição genômica AAAB, do tipo Prata. Deste total, resultaram 200 genótipos selecionados na fase individual, com base na produção de dois ciclos e na resistência à Sigatoka amarela. Estes híbridos foram posteriormente submetidos a avaliações clonais, nas quais foi possível distinguir um grupo composto por 50 tetraplóides com características superiores.

Com base em parâmetros agronômicos, foram selecionados os tetraplóides PV03-44, PV03-76, JV03-15, PA03-22 e PA12-03, que apresentaram, em avaliações clonais, produtividades compatíveis com seus genitores comerciais e resistência à Sigatoka amarela. Dois destes híbridos, o PV03-44 e o PA03-22, foram também resistentes ao mal-do-Panamá e à Sigatoka negra (Shepherd *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1996).

Os tetrapóides JV42-29, PV42-53, PV42-68, PV42-81, PV42-85, PV42-129, PV42-142, PV42-143, SM42-123, ST12-31 e ST42-08, selecionados na fase clonal em 1995, foram multiplicados e estão sendo avaliados em diferentes locais para resistência ao mal-do-Panamá e aos nematóides em Cruz das Almas, resistência à Sigatoka negra, em Manaus e em áreas de agricultores da Bahia e Pernambuco.

No período de 1997 a 1999 foram selecionados 17 híbridos tipo Maçã na fase de planta única. Por apresentarem cachos com mais de 50 frutos, porte com menos de

três metros, resistência à Sigatoka amarela, tolerância ao mal-do-Panamá e bom sabor de frutos, foram selecionados na fase clonal, em 1999, os híbridos YB42-03, YB42-08, YB 42-48, YB42-07, YB42-17, YB42-09, YB42-47 e YB42-21 (Silva *et al.*, 1998a).

Os híbridos selecionados no programa de melhoramento estão sendo avaliados em diferentes regiões produtoras de banana do país.

4.3.3 MELHORAMENTO POR MUTAÇÃO

A produção de cultivares melhoradas por qualquer método é um processo baseado nos princípios de geração e aproveitamento de variabilidade genética, seleção de genótipos úteis e testes comparativos para demonstrar a superioridade dos genótipos selecionados para características agronômicas específicas. Usando os métodos tradicionais estes estádios são extremamente laboriosos e demorados. Por outro lado, o uso da biotecnologia fornece várias alternativas para a rápida ampliação da variabilidade genética (Roux *et al.*,1994; Perea & Constabel, 1996). Ao nível de cultura de tecidos, a ampliação da variabilidade genética pode ser obtida com uso de agentes químicos, tais como Etilmetanosulfonato (EMS) (Jamaluddin, 1994), altos níveis de citocininas (Tujillo & Garcia,1996), 2,4 D (Beer & Visser, 1994), e radiação com cobalto 60 (Pérez Ponce & Orellana, 1994; Smith *et al.*, 1994).

A seleção *in vitro* é uma metodologia que possibilita a identificação de plantas tolerantes a vários tipos de estresse como os causados por herbicidas, baixas temperaturas, alumínio, manganês, salinidade e toxinas de patógenos (Smith & Drew, 1990).

Para selecionar mutantes de uma espécie *in vitro* é necessário que se tenha uma metodologia de micropropagação e que a característica a ser selecionada se expresse de forma semelhante *in vivo* e *in vitro* (Constantin, 1984). Entre as características já selecionadas *in vitro*, em bananeira, destacam-se a tolerância a metais pesados, a herbicidas, a salinidade, além de resistência a doenças (Tulmann-Neto *et al.*, 1990).

A seleção de variantes resistentes a doenças tem recebido grande ênfase nestes últimos anos (Shepherd, 1990). Esta técnica baseia-se no cultivo conjunto do parasita (ou sua toxina) com o explante, em condições livres de contaminantes, favorecendo o reconhecimento rápido dos genótipos tolerantes.

Com relação à seleção de plantas tolerantes a toxinas, Pegg & Langdon (1986) sugeriram que sejam realizados testes de comparação de patogenicidade, entre isolados de diferentes localidades, para escolher o mais patogênico, visto que diferenças na expressão de patogenicidade têm sido relatadas para diversos patógenos em diferentes culturas (Maas, 1985; Henz *et al.*, 1987; Balardin *et al.*,1990).

As toxinas são substâncias de peso molecular inferior a 2000, possuem capacidade de perturbar o desenvolvimento normal da planta e correspondem aos principais componentes de metabólitos produzidos pelos microrganismos. Devido a estas características, elas podem ser utilizadas com sucesso no processo de seleção, como agente seletivo (Walton & Earle, 1984). Na maioria das vezes, tem-se observado uma correlação direta entre tolerância de explantes a toxinas e a resistência da planta à doença (Toyoda *et al.*, 1989).

Um fator indesejável na micropropagação de banana tem sido o aparecimento das variações somaclonais. No entanto, para o melhoramento esta desvantagem pode

se tornar útil na geração e seleção da variabilidade genética adequada. Usando esta técnica, foi selecionado o TCI 215-1, mutante anão tipo Cavendish do GCTCV-215-1 (Tang & Hwan,1994).

Por ser um processo rápido e não exigir condições climáticas apropriadas, o melhoramento de banana por mutação tem sido usado na Áustria (IAEA), em Honduras, na Austrália, na África do Sul, na Colômbia, na Costa Rica, em Cuba, no Brasil, na Nigéria, no Sudão, no Paquistão e na Malásia (Roux *et al.*,1994).

Mediante aplicação de altos níveis de citocinina em meristemas apicais foram obtidos genótipos que apresentavam melhor resistência à Sigatoka amarela do que as cultivares iniciais (Tujillo & Garcia, 1996).

O cobalto 60, com radiação de 15 a 60 Gy, foi empregado para obtenção de clones das cultivares Grande Naine e Parecido el Rei e do híbrido SH 3436 mais resistentes à Sigatoka negra, e das cultivares Maçã e Gros Michel, com maior resistência a *Fusarium* (Pérez Ponce & Orellana,1994). Resultados preliminares obtidos por Jamaluddin (1994) com a indução de mutação *in vitro*, com o uso de raios gama em doses que variaram de 10Gy a 60 Gy e/ou etilmetanosulfonato (EMS), levaram à seleção de clones da 'Grande Naine' (Fatom-1) e de Pisang Rastali (AAB Maçã) mais precoces, com porte baixo e com maior rendimento. A mutação com raios gamas foi também empregada por Matsumoto & Yamaguchi (1991) na obtenção de mutantes da 'Nanicão' tolerantes ao alumínio. A estabilidade destas características potenciais e a verdadeira condição da resistência ao *Fusarium*, necessitam ser confirmados com um trabalho mais intensivo de seleção.

Embora Matsumoto *et al.* (1999) tenham mostrado a viabilidade da seleção *in vitro* de mutantes da 'Maçã' resistentes ao *Fusarium*, agente que causa o mal-do-Panamá, usando o mutagênico etilmetanosulfanato e apesar das tentativas que vêm sendo feitas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA-USP), na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária e na Universidade Federal de Pernambuco (IPA/UFP), buscando resistência ao mal-do-Panamá para a mesma cultivar, com uso de radiações, não foi identificado nenhum mutante de Maçã, com boas características agronômicas e resistente ao mal-do-Panamá.

Estes resultados confirmam a possibilidade de emprego da indução de mutação e cultura de tecidos, na obtenção de características agronômicas desejáveis, inclusive resistência ao mal-do-Panamá, embora poucas cultivares comerciais tenham sido originadas usando esta metodologia.

4.3.4 HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA

Um dos grandes problemas do melhoramento genético convencional da bananeira é a baixa produção de sementes, que ocorre na maioria das cultivares triplóides, ao serem cruzadas com os diplóides, na geração dos tetraplóides. Na 'Maçã' as poucas sementes produzidas não germinam e nas cultivares do subgrupo Cavendish não têm sido obtidas sementes nos cruzamentos desta natureza (Shepherd *et al.*, 1994). A hibridação somática é uma técnica muito potente e de fácil aplicação em plantas propagadas vegetativamente e naquelas que têm alta heterozigosidade (Zuba & Binding, 1989; Vardi & Galun, 1989; Sihachakr & Ducreux, 1993). A

técnica permite a introdução de resistência poligênica a doenças originárias de plantas selvagens de outras espécies ou gêneros, em plantas comerciais (Zuba & Binding, 1989).

Os primeiros trabalhos com protoplastos foram realizados na década de 70, e seu uso em programas de melhoramento genético de plantas tem sido intensificado atualmente. Aplicando-se a técnica de protoplastos é possível obter plantas originadas de uma única célula, incorporar genes exóticos por eletroporação e criar híbridos somáticos por fusão celular (Panis *et al.*, 1995).

Em bananeira têm sido realizados alguns trabalhos de embriogênese somática de células em suspensão (Novak *et al.*, 1989; Dhed'a *et al.*, 1991) e sobre cultura de protoplastos (Megia *et al.*, 1992; Megia *et al.*, 1993; Panis *et al.*, 1995). A regeneração da planta a partir de cultura de plotoplasto foi inicialmente conseguida com sucesso na cultivar Bluggoe (ABB) (Sadi *et al.*, 1994). Posteriormente a técnica foi aplicada em genótipos AAA. Mais recentemente, Matsumoto & Oka (1997b) regeneraram protoplastos da cultivar triplóide Maçã (AAB).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de técnicas de regeneração de plantas a partir de células ou calos das cultivares Maçã (AAB) (Matsumoto & Hirao, 1995) e Nanicão (AAA) (Conceição *et al.*, 1998), de protoplastos da cultivar Maçã (Matsumoto & Oka, 1997a) e de híbridos somáticos da 'Maçã' (AAB) com a 'Lidi' (AA) (Matsumoto *et al.*,1999)

Mediante o emprego de hibridação somática por eletrofusão, foram obtidos híbridos da cultivar Maçã (AAB) com o diplóide (AA) Lidi (Matsumoto *et al.*, 1999). Os resultados embora promissores são ainda preliminares com relação ao desenvolvimento de cultivares.

4.3.5 ENGENHARIA GENÉTICA

A transformação genética pode ser usada para obter plantas com melhor resistência a pragas, doenças e vírus, tolerância a herbicidas e características agronômicas. Existem duas categorias de sistemas de transformação. A primeira compreende a transformação indireta através da mediação da *Agrobacterium tumefaciens* e a outra, técnica direta de transferência do gene, em que se usam partícula de bombardeamento e eletroporação protoplástica (Panis *et al.*, 1995). Esta tecnologia poderá produzir banana transgênica com resistência a viroses, pragas e doenças (Frutos, 1993).

A disponibilidade de um bom sistema *in vitro* é essencial para a transformação genética. A principal característica de tal sistema é que uma planta normal possa ser regenerada em alta freqüência a partir de um explante. Os meristemas, suspensão de células embriogênicas, embriões somáticos e as culturas de protoplastos são considerados adequados à transformação genética.

A transformação genética em bananeira foi relatada pela primeira vez por Sadi *et al.* (1994), usando a técnica de eletroporação em protoplastos, que, contudo, não conseguiram formar plantas a partir das células transformantes. No ano seguinte, o mesmo grupo conseguiu obter plantas transformadas usando técnicas de biolística em células embriogênicas (Sadi *et al.*, 1995). À mesma época, outros pesquisadores (May *et al.*, 1995) obtiveram transformantes usando *Agrobacterium* após a realização de ferimentos leves por biolísticas de ouro em meristemas apicais. Estes trabalhos

pioneiros mostram a grande possibilidade de obtenção de novas variedades resistentes a doenças por transformação genética. Entretanto, a técnica ainda necessita ser adaptada para aplicação no melhoramento de bananeiras.

A transformação genética em banana vem sendo utilizada em Costa Rica (Grande Naine), na França (Grande Naine-AAA, French Sombre-AAB e em *Musa acuminata* ssp. malaccensis-AA), na Bélgica (Bluggoe-AABB, Three Hand Planty-AAB, Williams, *M. balbisiana*-BB, Tani, Monthan-ABB, Cardaba-ABB), na Austrália (Bluggoe-ABB, Grande Naine-AAA) e nos Estados Unidos (Grande Naine-AAA), usando diferentes tecidos originais e sistemas de transformação. Em todos os locais foi possível fazer a seleção após a transformação, mas somente na Bélgica, usando escalpos de 'Bluggoe' como tecido original e partícula de bombardeamento, e, nos Estados Unidos, usando meristema da 'Grande Naine', foi possível obter plantas transgênicas (Panis *et al.*, 1995). Apesar da engenharia genética ser considerada a ferramenta mais adequada ao melhoramento de bananeira para múltipla resistência a doença, no futuro (Dale, 1999), até hoje nenhuma variedade comercial foi gerada por esta tecnologia.

4.3.6 AVALIAÇÃO DE CULTIVARES E HÍBRIDOS

Desde o início do programa de melhoramento de banana, os genótipos selecionados na Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA, têm sido enviados a diversas regiões do Brasil para avaliações dos caracteres agronômicos e de qualidade dos frutos. Mais recentemente uma série de avaliações vem sendo conduzida em 22 localidades. Além da produção de cachos os genótipos têm sido avaliados para outros caracteres agronômicos, como teores de macro e micronutrientes e de vitamina C na polpa dos frutos e características de pós colheita (Silva *et al.*,1998b; Silva *et al.*, 1998c; Medina *et al.*, 1998). Resultados destas avaliações permitiram recomendar os híbridos PA12-03 (Pioneira) e as variedades Caipira e Thap Maeo, resistentes á Sigatoka negra (Silva *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1998a). Durante este ano (2000) serão também recomendados dois híbridos de Prata Anã (SH3640 e FHIA 18) resistentes à Sigatoka negra.

4.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

a) A esterilidade feminina das cultivares existentes normalmente não é absoluta e a maioria, em todos os níveis de ploidia, é capaz de produzir sementes em polinizações controladas. A fertilização dos sacos embrionários não reduzidos diplóides ou triplóides, com pólen haplóide A, fornece uma base prática para programas de hibridação visando novos genótipos triplóides ou tetraplóides.

b) Na produção de novas cultivares triplóides ou tetraplóides de bananeiras, as metodologias baseadas em cruzamentos oferecem melhores perspectivas do que a busca de mutações espontâneas ou induzidas.

c) Dentre as metodologias de hibridação, a produção de híbridos tetraplóides a partir de cultivares triplóides, é o método mais rápido para a obtenção de novas cultivares com resistência às principais doenças e pragas, produtivas e aceitáveis nos mercados consumidores.

d) De modo geral, independentemente da metodologia de hibridação adotada na geração de poliplóides, é fundamental o melhoramento do germoplasma diplóide AA.

e) A aplicação da biotecnologia associada ou não à hibridação será de grande valia para os trabalhos de melhoramento genético da bananeira, facilitando a produção de híbridos a partir de plantas parcial ou completamente estéreis.

f) O melhoramento de diplóides (AA) de banana para produtividade e resistência a doenças é uma realidade, haja vista as dezenas de genótipos desta natureza gerados pela Embrapa (Brasil), Fhia (Honduras) e Cirad-Flhor (França).

g) O melhoramento por hibridação tem gerado híbridos tetraplóides dos tipos 'Prata' (AAAB), 'Gros Michel' (AAAA), 'Plátano'(AAAB) e 'Bluggoe' (AABB), com boas características agronômicas e resistentes a doenças, em condições de serem usados comercialmente.

h) O melhoramento por hibridação de banana do tipo Maçã para resistência ao mal-do-Panamá é uma prática viável.

i) O melhoramento não convencional, usando mutação, hibridação somática e engenharia genética, embora muito usado atualmente, não se tem mostrado eficiente na produção de variedades com boas caraterísticas agronômicas.

5. MELHORAMENTO GENÉTICO DOS CITROS

5.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O gênero *Citrus* L. pertence à divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales (Cronquist, 1988), subordem Geraninae, família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrineae, sendo estreitamente relacionado aos demais gêneros de sua subtribo, a saber: *Severinia* Ten., *Pleiospermium* (Engl.) Swing., *Burkillanthus* Swing., *Limnocitrus* Swing. e *Hesperethusa* Roem., que são mais primitivos; *Citropsis* (Engl.) Swing. e *Atalantia* Corrêa, mais evoluídos que os anteriores; *Poncirus* Raf., *Fortunella* Swing., *Microcitrus* Swing., *Eremocitrus* Swing. e *Clymenia* Swing., constituindo estes últimos, juntamente com *Citrus*, o grupo dos cítricos verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (Swingle, 1967; Ortiz Marcide, 1985).

A classificação das espécies de *Citrus* é muito controvertida. Dentre os sistemas taxonômicos utilizados dois destacam-se como principais, o de Walter Tennyson Swingle, publicado em 1943, e o de Tyôzaburô Tanaka, editado em 1954 e ampliado em 1969 e em 1977. O primeiro considera 16 espécies, enquanto que o último propõe um total de 162 (Giacometti, 1973; Soost & Roose, 1996). O sistema de Swingle constitui uma tentativa de classificação voltada para o conceito biológico de espécies, fundamentando-se na análise de inúmeras variações observadas em híbridos, o que levou o autor à rejeição de diversas espécies estabelecidas antes de seu sistema, por considerá-las como híbridos. A classificação apresentada por Tanaka, a seu turno,

baseia-se em características morfológicas, com ênfase naquelas relativas ao cálice, vesículas da polpa, sementes e células da casca das frutas (Giacometti, 1973). Reece (1969) defende a posição de Swingle, afirmando que a existência de formas distintas, ou de fácil reconhecimento, não deve ser entendida como uma razão adequada na indicação de espécies, lembrando que a situação encontrada em *Citrus* é, de certo modo, semelhante ao que se verifica com o cão (*Canis domesticus*), reportando-se a comentários feitos por Dobzanski, que diz que quanto maior o período de domesticação de uma espécie mais numerosas e diversificadas serão suas formas ou raças. Hodgson (1961), por sua vez, propôs um sistema de classificação taxonômica intermediário, no qual aceita as 16 espécies admitidas por Swingle, acrescidas de 20 espécies dentre as consideradas por Tanaka. Cabe acrescentar que estudos taxonômicos realizados entre meados da década de 70 e meados da década de 80 indicam como espécies biológicas básicas *C. medica* L., *C. reticulata* Blanco e *C. grandis* Osb. (Soost & Roose, 1996).

Stebbins (1969) cita que a possibilidade de produção de híbridos, parcial ou totalmente férteis, entre populações com notáveis diferenças quanto à sua aparência externa, a exemplo do que se observa com os gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, bem como a habilidade apresentada por certas espécies e por muitos híbridos estéreis de se propagarem assexuadamente por sementes (embrionia nucelar), dificultam sobremodo a classificação das espécies de *Citrus*. Além disso, esse gênero apresenta um espectro de relações ecológicas e espaciais visto somente entre os mais antigos e difundidos grupos de plantas cultivadas, pela existência simultânea de formas selvagens, indivíduos semicultivados e de clones que sofreram um intenso processo de seleção. No Sudeste da Ásia, região em que o *Citrus* é nativo, séculos de cultivo implicaram, provavelmente, na completa destruição dos habitats ocupados por determinadas espécies ancestrais, determinando somente a sobrevivência de genótipos adaptados a habitats fortemente modificados. Fica evidente, portanto, que a avaliação dos efeitos combinados da hibridação, reprodução assexual, cultivo e perturbações de habitats exigem um grande esforço no tocante à compreensão do padrão de variação evolutivo, genético e morfológico do gênero *Citrus*.

5.2 ORIGEM E DOMESTICAÇÃO

Os gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* destacam-se como aqueles de maior importância comercial, principalmente o primeiro, ao qual se relacionam as laranjas doces *C. sinensis* (L.) Osb., tangerinas (diversas espécies), laranjas azedas *C. aurantium* L., pomelos *C. paradisi* Macf., toranjas *C. grandis*, limas ácidas *C. aurantifolia* Swing., limas doces *C. limettioides* Tan., limões verdadeiros *C. limon* Burm., cidras *C. medica* e outros tipos, incluindo híbridos naturais (Chapot, 1975).

O gênero *Citrus* encontra-se no patamar mais elevado de um longo período evolutivo, cujo início remonta a mais de 20 milhões de anos, na Austrália, quando esta ainda tinha conexões com a Ásia e Nova Guiné, antes da separação das placas continentais (Swingle, 1967). Sua origem, entretanto, é atribuída ao Sudeste da Ásia, particularmente ao Leste da Índia, Norte de Myanmar, antiga Birmânia, e Sudoeste da China, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e mesmo África (Soost & Cameron, 1975; Soost & Roose,1996).

Após exaustivos estudos sobre o gênero *Citrus*, no Oriente, o botânico japonês Tyôzaburô Tanaka propôs uma linha de demarcação no Sudeste da Ásia, a Linha de Tanaka, que delimita áreas de provável desenvolvimento e dispersão de certas espécies do referido gênero. Essa linha estende-se, em direção sudeste, desde a extremidade nordeste da Índia, passando por Myanmar e pela província chinesa de Yunnan, até um ponto ao sul da Ilha de Hainan, situada no Mar da China Meridional. Espécies como o limão verdadeiro, lima ácida, cidra e toranja, bem como formas primitivas de laranjas doces e azedas, parecem ter surgido no continente, ao sul dessa linha. Quanto ao extenso grupo das tangerinas, há indícios de que sua origem relaciona-se a uma área muito mais ampla, podendo-se esboçar uma progressão em cadeia, a nordeste da Linha de Tanaka, ao longo da costa oriental da China, passando por Formosa e deslocando-se até o Japão. Acredita-se que a 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc.), entre outros tipos de tangerinas, tenha surgido nessa região. *Poncirus* e *Fortunella*, gêneros estreitamente relacionados ao *Citrus*, são encontrados em uma terceira linha de progressão, que cruza o sul do Centro da China, em direção leste-oeste (Soost & Cameron, 1975; Soost & Roose, 1996). Reportando-se a outros gêneros filogeneticamente também próximos de *Citrus*, tem-se que *Eremocitrus* e *Microcitrus* são encontrados sob forma selvagem quase que exclusivamente na Austrália, enquanto que *Clymenia* ocorre no Norte de Nova Irlanda, Arquipélago de Bismark, Nordeste de Nova Guiné, representado por uma única espécie conhecida como 'Namatanai' [*Clymenia polyandra* (Tan.) Swing.], conforme Swingle (1967).

A respeito desse assunto, Chapot (1975) comenta que a tangerina (*C. reticulata* Blanco) é considerada nativa da Indochina e do Sul da China, de onde foi introduzida no leste da Índia; a lima ácida é provavelmente nativa do arquipélago das Índias Orientais, tendo posteriormente alcançado a Índia, situação esta semelhante à da toranja; presume-se que a cidra tenha se originado no Sul da China e na Índia, havendo discordâncias, no tocante a esta última, em relação à área exata de seu aparecimento, se no Norte (Sikkim) ou no Sudeste; a laranja doce surgiu possivelmente na Indochina e no Sul da China; supõe-se que a laranja azeda seja nativa da região Sudeste da Ásia, presumivelmente da Índia; o limão verdadeiro tem sua origem indefinida, pelo menos em relação à forma conhecida como limão italiano, sendo digno de atenção o fato de seus frutos serem muito semelhantes aos da cidra – diversas variedades intermediárias entre a cidra e o limão são encontradas na Índia, a exemplo do tipo denominado Bajouras (*C. limonimedica* Lush.). Alguns especialistas, porém, acreditam que o limão tenha aparecido na costa do Golfo de Oman ou na Itália.

Estudos relativamente recentes, realizados por Gmitter Jr. & Hu (1990), apontam a província chinesa de Yunnan e áreas adjacentes do Sul da China e Norte da Indochina, como parte do centro de origem de diversas espécies de *Citrus*, incluindo *C. grandis*, *C. medica*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. limonia* Osb., *C. sunki* Hort. ex Tan., *C. ichangensis* Swing., *C. hystrix* DC., *C. junos* Sieb. ex Tan., *C. honghoensis* Y.L.D.L., bem como uma nova espécie de *Poncirus*, denominada *P. polyandra*, em acréscimo a até então considerada única *P. trifoliata* (L.) Raf. Os referidos autores destacam que Yunnan é reconhecida por compreender mais da metade do número de espécies de plantas superiores nativas da China, sendo privilegiada pela presença de numerosos rios, que devem ter atuado como importantes mecanismos naturais de dispersão de plantas cultivadas.

A mais antiga região de cultivo dos citros é compreendida pelo Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanmar, havendo evidências de sua exploração no Sul da China há mais de 4.000 anos, daí dispersando-se em direção ao sudeste, pelas Filipinas e numerosos grupos de ilhas do Pacífico (Spurling, 1969). Muitas das mais remotas citações feitas às frutas cítricas são encontradas em velhos manuscritos chineses, entre outros documentos, estando a mais antiga referência conhecida contida no livro "Yu Kung", alusivo ao imperador Ta Yu, que reinou entre 2205 e 2197 a.C. (Webber *et al.*, 1967).

5.3 MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS

As mutações espontâneas tiveram um papel muito importante no processo evolutivo das plantas de propagação vegetativa (Nybom & Koch, 1965). Práticas como a enxertia e a estaquia, comumente utilizadas em árvores frutíferas, facilitaram a conservação e acumulação de mutações, particularmente aquelas associadas à esterilidade, que seriam eliminadas em caso de reprodução sexual. Além disso, a embrionia nucelar, de ocorrência comum em *Citrus* e gêneros afins, como *Poncirus* e *Fortunella*, possibilitou, devido ao desenvolvimento de embriões apogâmicos, a preservação de muitas mutações espontâneas de surgimento anterior às técnicas de propagação vegetativa hoje empregadas pelo homem (Nishiura, 1965).

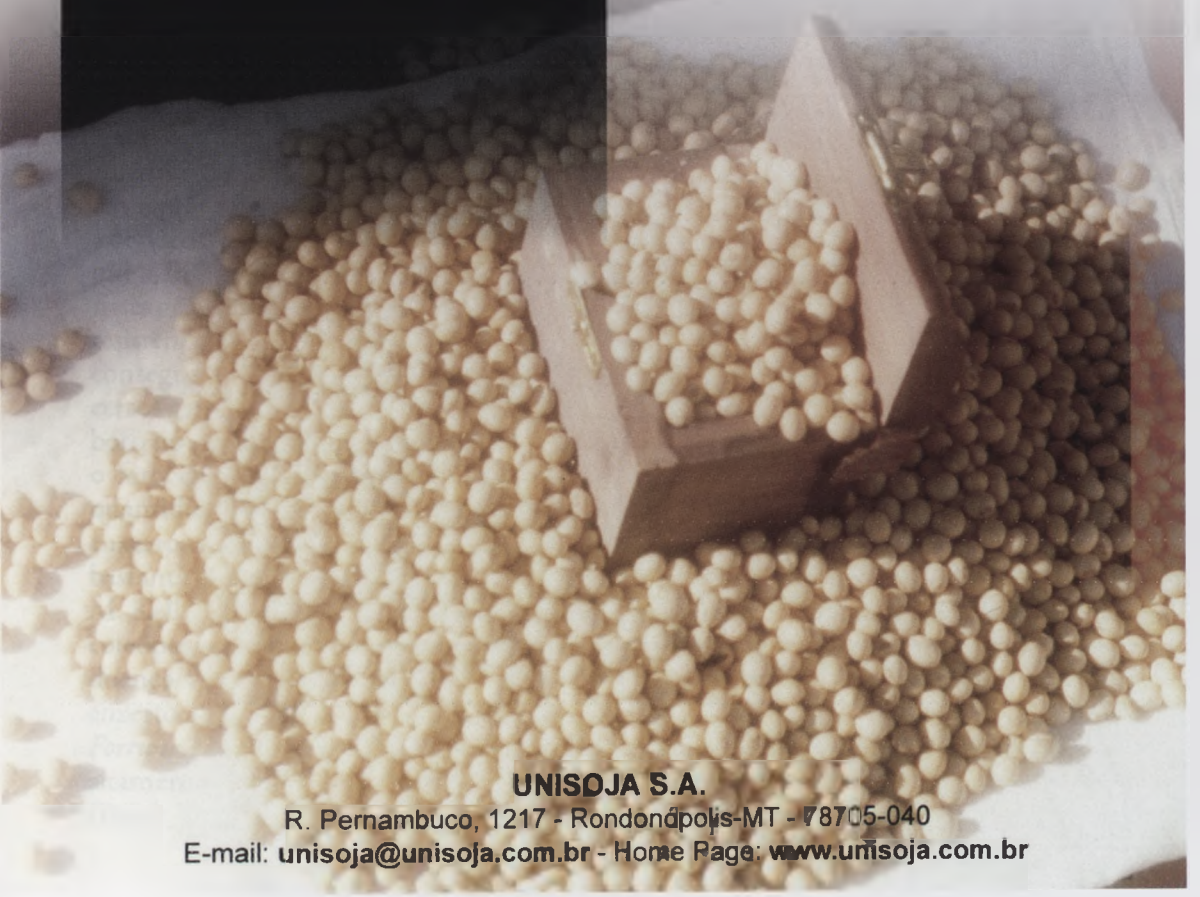
Mutações espontâneas, constatadas por mudanças repentinas em caracteres herdáveis, são freqüentes em citros, sendo observadas sob a forma de variações em ramos ou setores em frutos, podendo também ser ocasionalmente detectadas em *seedlings* nucelares, situação esta em que toda a planta é afetada. Apesar das variações somáticas identificadas em pomares comerciais serem geralmente desfavoráveis, apresentando baixa produtividade de frutos, caracteres foliares atípicos, ou frutos anormais, muitas mutações espontâneas de elevado valor têm sido verificadas (Soost & Cameron, 1975), haja vista que a maioria das variedades cítricas comerciais surgiu como decorrência de algum tipo de mutação natural. Diversas laranjas doces originaram-se dessa forma em regiões da China, Mediterrâneo e Américas (Nishiura, 1965; Soost & Cameron, 1975; Soost & Roose, 1996). A laranja 'Shamouti', por exemplo, de grande importância em Israel, é provavelmente uma mutação de gema da laranja 'Beladi'. Laranjas sangüíneas, como a 'Maltese', que se caracterizam por possuir antocianina na casca, septos e vesículas de suco, surgiram na região Mediterrânea. A laranja 'Bahia' (de umbigo) foi encontrada no Bairro do Cabula, cidade de Salvador, Bahia, Brasil, como variação de ramo da laranja 'Seleta', cabendo destacar que, no grupo das laranjas de umbigo e 'Valência', muitas variedades têm sido selecionadas a partir de mutações somáticas em gemas ou ramos (Nishiura, 1965). As laranjas 'Salustiana', da Espanha, e 'Marrs', do Texas, por sua vez, são variações somáticas de maturação precoce nas áreas em que foram descobertas (Soost & Cameron, 1975). Outros exemplos incluem diversos tipos de tangerinas originados na China, Japão e Sudeste da Ásia, limões verdadeiros e pomelos, esta espécie um provável híbrido natural de toranja com laranja doce, ou um mutante espontâneo de toranja, identificado na Ilha de Barbados em princípios do século XVIII. Relativamente aos pomelos, pode-se dizer que todas as variedades conhecidas originaram-se, direta ou indiretamente, da cultivar Duncan, a exemplo do pomelo 'Marsh seedless', tipo

Junto de um Programa de Melhoramento Genético de sucesso sempre há uma grande unidade de negócios e produção.
Ligar o produtor e a pesquisa, através das sementes é a missão da Unisoja.

Unisoja o elo da ligação entre a Fundação MT e os produtores do Brasil.

UNISOJA

A evolução natural



UNISOJA S.A.
R. Pernambuco, 1217 - Rondonópolis-MT - 78705-040
E-mail: **unisoja@unisoja.com.br** - Home Page: **www.unisoja.com.br**

com poucas sementes, que surgiu como um *seedling* dessa cultivar (Nishiura, 1965). O pomelo 'Thompson', mutação de ramo do 'Marsh seedless', caracteriza-se por sua polpa rosada, tendo, a seu turno, dado origem a diversos variantes de polpa vermelha, como o 'Redblush' (Soost & Cameron, 1975). No Japão, a maioria dos clones comerciais de tangerina 'Satsuma' proveio de mutações somáticas espontâneas (Nishiura, 1965; Soost & Cameron, 1975; Kukimura *et al.*, 1976). No tocante aos limões verdadeiros, pode-se citar como exemplos de mutações naturais as variedades Eureka e Lisboa (Nishiura, 1965).

Frost & Krug (1942) chamam a atenção para o fato de que a enorme diversidade observada em *Citrus*, a par de sua elevada heterozigose, sugere a ocorrência de freqüências relativamente altas de mutações gênicas, podendo ser essa uma das prováveis causas das variações de gema verificadas nesse gênero. Raghuvanshi (1969), a seu turno, comenta que células somáticas apresentando divisão desigual, restabelecimento do núcleo resultando em células poliplóides, pontes somáticas e atraso dos cromossomos na anáfase, parecem não ser incomuns em citros, enfatizando que tais aberrações na cariocinese poderiam facilmente induzir o aparecimento de células somáticas com genótipo modificado em regiões de crescimento, determinando, com as divisões celulares posteriores, o surgimento de ramos modificados ou de variações em gemas.

5.4 VARIABILIDADE GENÉTICA E HIBRIDAÇÃO

A expressiva variabilidade genética presente em *Citrus* e gêneros afins é de grande utilidade particularmente em programas de melhoramento genético dirigidos à obtenção de novos porta-enxertos. Nesse sentido, tem-se que *Microcitrus* e *Eremocitrus* são encontrados sob a forma selvagem quase que exclusivamente na Austrália, sendo este último pronunciadamente xerofítico, capaz de se desenvolver em regiões semi-áridas, em solos com pouco ou nenhum nitrogênio, além de resistir a concentrações relativamente elevadas de sais presentes na solução do solo, enquanto que *Microcitrus* é semi-xerofítico, podendo suportar períodos de seca prolongados. Esses gêneros, assim como *Poncirus* e *Fortunella*, também se destacam por sua notável resistência ao frio, apresentando adaptação a habitats onde nenhuma espécie de *Citrus* consegue sobreviver. Gêneros mais primitivos, como *Severinia*, igualmente mostram certos graus de afinidade com *Citrus*, verificando-se que o primeiro suporta teores de boro no solo suficientemente elevados para eliminar este último, sendo surpreendente o fato de que sob tais condições as raízes de *Severinia* absorvem e translocam quantidades muito baixas desse elemento, a ponto de permitir o estabelecimento de enxertos sadios de variedades comerciais de *Citrus*, mesmo em se tratando de copas bastante sensíveis ao boro, como as de limão verdadeiro. *Citropsis gilletiana* Swing & M. Kell., parente selvagem nativo da República do Congo, é imune ao ataque de um coleóptero cujas larvas escavam o colo de plantas de *Citrus*, além de ser resistente à doença fúngica gomose de *Phytophthora*, sendo essa espécie utilizada como porta-enxerto na referida região (Swingle, 1967). Adicionalmente, tem-se que *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia*, a exemplo do gênero *Citropsis*, são altamente resistentes à gomose de *Phytophthora*. Espécies como *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten., à semelhança de *Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing., têm mostrado

tolerância à salinidade. *Citropsis gilletiana* demonstra possuir resistência ao nematóide cavernícola *Radopholus similis*. *Poncirus trifoliata* e *Severinia buxifolia* são consideradas resistentes aos complexos comuns do vírus da tristeza dos citros. *Eremocitrus glauca* pode ser utilizada em programas de melhoramento dirigidos à obtenção de porta-enxertos adaptados a solos arenosos e as espécies *Microcitrus australis* (Planch.) Swing. e *M. australasica* (F. Muell.) Swing. são adaptadas a áreas sujeitas a chuvas pesadas e a solos com baixa fertilidade (Hearn *et al.*, 1974). *Severinia buxifolia*, bem como várias seleções de *Poncirus trifoliata*, mostram-se resistentes ao nematóide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* (Hutchison & O'Bannon, 1972). *Poncirus trifoliata* distingue-se como fonte de tolerância relativamente alta a solos encharcados (Yelenosky *et al.*, 1974). *Citropsis*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* e *Clymenia* têm demonstrado a possibilidade de utilização em programas de melhoramento visando a seleção de porta-enxertos que reduzem o porte das plantas, de forma a permitir um maior adensamento de plantio (Castle, 1979).

Diante do exposto, depreende-se que a variabilidade genética existente em *Citrus* e gêneros afins é capaz de permitir a criação de porta-enxertos adaptados às mais diversas condições ambientais. Apesar das hibridações entre espécies de *Citrus* e entre este e gêneros afins serem em muitas circunstâncias passíveis de realização, deve-se atentar para a ocorrência de barreiras reprodutivas que dificultam ou mesmo impedem determinados cruzamentos. A esse respeito, tem-se que o conjunto ou *pool* de genes associado a uma determinada cultura, incluindo todas as cultivares, parentes silvestres e espécies selvagens afins, pode ser dividido em três níveis (Hoyt, 1988, 1992; FAO/PNUMA, 1991; Giacometti, 1991):

- *Pool* de genes primário (PG-1): contém as formas domesticadas e formas selvagens da cultura, sendo seus indivíduos interférteis; a transferência de genes é simples.
- *Pool* de genes secundário (PG-2): seus indivíduos podem ser cruzados com os de PG-1, porém muitos dos híbridos resultantes são estéreis; a transferência de genes para formas cultivadas é possível, contudo pode haver dificuldades.
- *Pool* de genes terciário (PG-3): constitui o limite extremo de alcance do potencial genético, sendo a transferência de genes para PG-1 possível somente mediante o emprego de técnicas não convencionais de melhoramento genético, como as de cultivo *in vitro* de embriões, fusão de protoplastos, duplicação do número cromossômico e utilização de "espécies-ponte"; os híbridos obtidos com PG-1 são estéreis.

Relativamente a algumas espécies e gêneros afins ao *Citrus*, Giacometti (1991), com base em estudos realizados por diversos autores, sugeriu os seguintes *pools* gênicos:

- PG-1: *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C.* grandis, *C. jambhiri*, *C. limettioides*, *C. limon*, *C. limonia*, *C.* madurensis, *C. medica*, *C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sinensis*, *Fortunella* spp., *Poncirus*.
- PG-2: *C. combara* Raf., *C. hystrix*, *C. ichangensis* Swing., *C. latipes* (Swing.) Tan., *C. macroptera* Montr., *Microcitrus* spp.
- PG-3: *Atalantia* spp., *Citropsis* spp., *Clymenia* spp., *Eremocitrus* spp.

Certamente, a relação de espécies e gêneros identificados por Giacometti (1991) dentro de cada *pool* gênico está incompleta, porém indica situações nas quais os cruzamentos deverão ser realizados com um maior ou menor grau de dificuldade. A partir dessas informações pode-se concluir, por exemplo, que hibridações entre *Citrus* (PG-1) e *Microcitrus* (PG-2) poderão apresentar algumas restrições e que aquelas entre *Citrus* e *Eremocitrus* (PG-3) deverão ser viáveis somente mediante o emprego de técnicas não convencionais, como a de fusão de protoplastos.

5.5 POLIPLOIDIA

A poliploidia diz respeito a um aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas, sendo coletivamente denominadas como poliplóides aquelas plantas com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. Pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. Os autopoliplóides originam-se pela multiplicação do número de genomas de uma mesma espécie, geralmente são parecidos com as respectivas espécies diplóides, podendo ser maiores. Alopoliplóides, por sua vez, são indivíduos que possuem dois ou mais genomas distintos, provenientes de diferentes espécies (Mettler & Gregg, 1973; Wright, 1976). Por essa razão, os alopoliplóides geralmente exibem combinações das características dos genitores, podendo os graus de semelhança estarem voltados para um ou outro dos pais, caso ocorra dominância, sendo difícil determinar em que nível de extensão as diferenças quantitativas e qualitativas observadas são um reflexo de mecanismos genéticos ou da poliploidia em si, cujos efeitos são melhor avaliados em autotetraplóides (Swanson, 1957).

A obtenção intencional de poliplóides em programas de melhoramento genético tem na hibridação somática via fusão de protoplastos uma importante ferramenta de trabalho, aplicando-se, em citros, tanto no melhoramento de copas como, principalmente, de porta-enxertos. Espera-se que os híbridos (alotetraplóides) obtidos por esse processo apresentem características complementares provenientes das variedades doadoras de protoplastos, variedades estas muitas vezes relacionadas a espécies pertencentes a diferentes *pools* gênicos, entre as quais a troca de genes mediante hibridação convencional pode ser impedida por barreiras reprodutivas. Nesse contexto, cabe destacar que a fusão de protoplastos de variedades comerciais de *Citrus* com aqueles de espécies pertencentes a gêneros afins a este, como *Microcitrus* e *Eremocitrus*, de reconhecido valor adaptativo a ambientes sujeitos a estresses, apresenta grandes perspectivas sob o ponto de vista do melhoramento genético dos citros, particularmente no tocante à obtenção de novos porta-enxertos.

Vários autores têm conseguido híbridos somáticos interespecíficos (Kobayashi *et al.*, 1988; Ohgawara *et al.*, 1989; Grosser *et al.*, 1989, 1991; Tusa *et al.*, 1990), híbridos somáticos intergenéricos de espécies sexualmente compatíveis (Grosser *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1991) e de espécies incompatíveis (Grosser *et al.*, 1990, 1991).

5.6 RECURSOS GENÉTICOS

Visando a apresentação de um exemplo prático de condução de um programa de melhoramento genético, as informações que se seguem dizem respeito a ações de pesquisa conduzidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. A base desse programa, à semelhança do que se verifica no melhoramento genético de qualquer espécie cultivada, está na existência de variabilidade genética disponível. Neste sentido, a

referida instituição de pesquisa dispõe do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros, situado em região tropical (Recôncavo Baiano), no qual procura-se dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis a ambientes relacionados, principalmente, ao Norte e Nordeste brasileiros.

Contando atualmente com 643 acessos, conservados sob condições de campo, na razão de três a 12 plantas por acesso, o BAG Citros reúne diversos gêneros e espécies, compreendendo: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata*, *Fortunella* spp., *Microcitrus* spp., *Eremocitrus* glauca, Severinia *buxifolia*, *Atalantia monophylla* DC., *Merrillia caloxylon* (Ridl.) Swing., *Feroniella oblata* Swing., *Feronia limonia* (L.) Swing., *Micromelum tephrocarpa* , *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wils. As plantas são propagadas por enxertia de borbulha, empregando-se diferentes porta-enxertos, e plantadas em campo observando-se diferentes espaçamentos, em função do vigor dos distintos acessos.

Apesar da grande variabilidade genética presente no BAG Citros, um dos mais diversificados ao nível de Brasil e mundial, deve-se atentar para a necessidade de enriquecimento do mesmo, tanto a partir de coleções presentes em instituições nacionais como internacionais, bem como mediante coletas em centros de origem e/ ou dispersão dos citros. Tendo-se em vista a grande dimensão do território brasileiro, compreendendo ambientes ecológicos bastante distintos, é recomendável a constituição de bancos ativos regionais, cada um responsabilizando-se pela conservação de acessos adaptados, o melhor possível, aos seus ambientes específicos.

A caracterização do germoplasma vem sendo efetuada mediante o emprego de descritores mínimos definidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e pelo *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), além do uso de marcadores moleculares e de análises cromossômicas.

Os trabalhos de avaliação têm permitido a identificação de cultivares promissoras sob o ponto de vista comercial, a exemplo das laranjas doces 'Kona', 'Parson Brown', 'Biondo', 'Gardner', 'Pineapple', 'Salustiana' e 'Torregrosa', que se caracterizam pela produção de safras precoces a início de meia-estação (Passos *et al.*, 1997, Cunha Sobrinho *et al.*, 1999). Quanto a tangerinas e híbridos, cabe mencionar clones de 'Clementina' (*C. clementina* Hort. ex Tan.), as tangerinas-tangelos 'Lee', 'Nova' e 'Page' [tangerina 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (pomelo 'Duncan' x tangerina 'Dancy' *C. tangerina* Hort. ex Tan.)], 'Clementina' x tangor 'Murcott' (híbrido natural entre laranja doce e tangerina, de origem desconhecida), dentre outros. Deve-se destacar também a identificação de um clone de limão 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan.)(CNPMF 2000) com boa tolerância, ao nível de campo, à gomose de *Phytophthora* (Cunha Sobrinho *et al.*, 1999). No tocante a variedades porta-enxerto, tem-se a identificação de um clone de tangerina 'Sunki' (CNPMF 02), igualmente com boa tolerância, ao nível de campo, à gomose de *Phytophthora* (Cunha Sobrinho *et al.*, 1999), além de um clone de limão 'Cravo' (Santa Cruz), que se distingue por apresentar um número médio de sementes por fruto mais elevado que o comum na variedade (Cunha Sobrinho *et al.*, 1999; Soares Filho *et al.*, 1999).

Com base nessas observações, o BAG Citros tem-se prestado como fonte de introdução de variedades promissoras, copas e porta-enxertos, em diversas regiões do país, contribuindo, assim, para a diversificação do pomar citrícola nacional, hoje altamente concentrado na combinação laranja 'Pêra' (*C. sinensis*) / limão 'Cravo'.

Nessa atividade, várias instituições têm sido envolvidas, públicas e privadas, além de associações e produtores.

5.7 MELHORAMENTO GENÉTICO

No que concerne à criação de novas variedades cítricas melhor adaptadas aos trópicos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciou, em setembro de 1988, um programa de hibridações, tendo como objetivos imediatos a seleção de genótipos, particularmente porta-enxertos, tolerantes à seca e ao alumínio, tolerantes/resistentes à gomose de *Phytophthora* e à tristeza dos citros, além de adaptados a altas densidades populacionais (ananicantes). Visando a identificação de genitores promissores, os trabalhos de caracterização de acessos presentes no BAG Citros têm-se concentrado em caracteres de interesse agronômico relacionados ao atingimento desses objetivos.

Esta iniciativa teve como estímulo o período de vida útil relativamente baixo dos pomares brasileiros, em torno de 15 a 18 anos nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo, que responde por mais de 80% da produção citrícola nacional, e de 12 a 15 anos no Norte e Nordeste do país.

Contando com o apoio de uma equipe multidisciplinar, diversas ações de pesquisa encontram-se em curso, conforme exposição realizada a seguir:

5.7.1 HIBRIDAÇÕES

Os genitores empregados nos trabalhos de hibridação compreendem espécies e híbridos interespecíficos de *Citrus*, bem como gêneros afins e híbridos intergenéricos, presentes no BAG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Como critério de escolha dos genitores a serem hibridados procura-se, em princípio, aqueles possuidores de comprovado valor agronômico e/ou adaptativo às condições ambientais adversas, como tolerância à seca e ao alumínio, resistência/tolerância a doenças, conforme já mencionado. Dentre os gêneros afins ao *Citrus*, são de especial interesse *Poncirus*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, por seu potencial relativo à obtenção de novos porta-enxertos ananicantes (Castle, 1979) e resistentes à gomose de *Phytophthora* (Hearn *et al.*, 1974), doença fúngica que tem causado sérios prejuízos aos pomares brasileiros. Os gêneros *Microcitrus* e *Eremocitrus*, além disso, podem permitir a criação de porta-enxertos adaptados a ambientes sujeitos a períodos prolongados de estresse hídrico (Swingle, 1967).

Com relação à escolha dos genitores para cruzamentos, resultados preliminares, baseados no caráter pegamento de frutos obtidos de polinizações controladas, indicam que os limões 'Cravo' e 'Volkameriano' apresentam bom comportamento tanto como genitores femininos como masculinos, cabendo destacar também seu grau moderado de poliembrionia, reforçando, neste caso, sua importância como genitores femininos. A tangerina-tangelo 'Robinson' (tangerina 'Clementina' x tangelo 'Orlando'), tangerina 'Sunki' e tangor 'Dweet' (laranja 'Mediterrânea' *C. sinensis* x tangerina 'Dancy'), devido à taxa de pegamento de frutos relativamente alta que apresentam em cruzamentos, a par de sua poliembrionia respectivamente nula, baixa e moderada, são indicados, *a priori*, como bons genitores femininos (Soares Filho *et al.*, 1995a, b).

Como resultado dos cruzamentos realizados pelo Programa de Melhoramento Genético (PMG) de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, até o momento,

foram plantados em campo cerca de 2.000 *seedlings* híbridos obtidos de cruzamentos envolvendo principalmente limões, laranjas, tangerinas, *P. trifoliata* e híbridos desta espécie. Esses híbridos, em sua maioria, serão avaliados como porta-enxertos.

5.7.1.1 CULTIVO DE EMBRIÕES / EMBRIOGÊNESE *IN VITRO*

Em se tratando de genitores femininos cujas sementes apresentam elevado grau de poliembrionia, o cultivo de embriões oriundos de frutos obtidos a partir de polinizações controladas é realizado sob condições assépticas, *in vitro*, de modo a possibilitar a germinação da maioria dos embriões, garantindo a sobrevivência dos eventuais *seedlings* híbridos. Nessas variedades, todavia, é comum a ocorrência de embriões imaturos (< 3,0 mm) que não germinam no meio MT (Murashige & Tucker, 1969), recomendado para citros, implicando na necessidade de ajustes do mesmo. Neste sentido, estudos realizados com tangerina 'Cleópatra', que possui cerca de 10 embriões por semente, definiram diversas modificações no meio MT de modo a permitir a germinação de embriões tanto imaturos como maduros (> 6,0 mm), a saber: manutenção das concentrações originais de micronutrientes e vitaminas, redução pela metade da concentração de macronutrientes, redução da concentração de sacarose para 40 g L^{-1} e adição de 0,08 mg L^{-1} de BAP (benzilaminopurina), 0,01 mg L^{-1} de ANA (ácido naftalenoacético) e 20 mg L^{-1} de adenina (Morais, 1997). Os resultados dessas pesquisas servirão de base para a definição de metodologia capaz de completar a embriogênese *in vitro* do(s) primeiro(s) embrião(ões) a se formar(em) após a fertilização, no intuito de evitar ou restringir a manifestação da poliembrionia, particularmente em variedades altamente poliembriônicas.

Quanto aos genitores femininos monoembriônicos, ou com grau de poliembrionia entre baixo a moderado, o cultivo de embriões *in vitro*, devido a seus custos relativamente elevados, pode ser evitado, sem prejuízos evidentes no tocante à sobrevivência dos *seedlings* híbridos, conforme constatações obtidas por Soares Filho *et al.* (1995c) e por Medrado (1998). Este comportamento deve-se ao fato de que em tais variedades, nas situações em que as sementes são poliembriônicas, os embriões zigóticos tendem a estar entre aqueles de maior tamanho, o que facilita sua germinação e conseqüente desenvolvimento em *seedling*, sendo esta tendência tanto mais evidente quanto menor for o grau de poliembrionia (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho *et al.*, 1994; Moreira, 1996).

5.7.1.2 IDENTIFICAÇÃO DE EMBRIÕES / *SEEDLINGS* HÍBRIDOS

5.7.1.2.1 ANÁLISES DE CARACTERES MORFOLÓGICOS

Os caracteres cor de cotilédones e tamanho de embrião têm sido empregados como ferramentas auxiliares na identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros. O primeiro em razão da existência de influências do polinizador sobre sua formação (efeito de metaxenia), conforme De Lange & Vincent (1977), Ueno & Hirai (1983), Vásquez Araujo (1991) e Vásquez Araujo *et al.* (1994). O segundo devido a evidências, mencionadas anteriormente, de que o embrião zigótico tende a estar entre aqueles de maior tamanho (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho *et al.*, 1994; Moreira, 1996). Observações relativas à posição do embrião na semente

É na hora da colheita que a qualidade Pioneer mais aparece



® Marcas registradas pertencentes ou licenciadas pela Pioneer Hi-Bred International, Inc.



As sementes de soja Pioneer são a exata combinação da melhor genética tropical com a tecnologia mundial da PIONEER - a empresa líder no mercado de soja nos Estados Unidos. A Pioneer tem um conjunto de variedades que se encaixa perfeitamente nas suas necessidades, produzindo mais, melhor e com menor risco safra após safra. Pode confiar!



Sementes de soja fiscalizadas com a qualidade da marca Pioneer, têm maior rendimento com menor risco.

www.pioneer.com/brasil

SEMENTES • MARCA
PIONEER.

DM 118/DM 247/DM Vitória/DM Nobre/DM 339/DM 309

TECNOLOGIA QUE RENDE.

0606/ GRAPHIK

mostraram que tanto os embriões zigóticos como os nucelares apresentam forte tendência de localizarem-se na região micropilar, indicando que esse caráter não favorece o reconhecimento dos embriões de origem híbrida (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho *et al.*, 1994; Moreira, 1996).

Quanto à identificação de *seedlings* híbridos a partir de estádios jovens de desenvolvimento, tem-se utilizado, principalmente, a característica morfológica trifoliada, dominante, presente em *P. trifoliata* e híbridos desta espécie.

5.7.1.2.2 ANÁLISES DE ISOENZIMAS

Análises de isoenzimas vêm sendo empregadas na identificação de *seedlings* híbridos. Devido aos seus custos relativamente baixos, o sistema glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT) foi bastante utilizado (Souza Jr. *et al.*, 1993). Em razão das limitações desse sistema, relativamente à sua impossibilidade de identificar *seedlings* zigóticos em muitos cruzamentos de interesse, outros sistemas isoenzimáticos estão sendo avaliados, a exemplo da leucina-amino-peptidase (LEP), fosfoglucose-isomerase (PGI) e peroxidase (PRX).

5.7.1.2.3 ANÁLISES DE SEGMENTOS POLIMÓRFICOS DE DNA

Análises de segmentos polimórficos de DNA encontram-se em andamento, destacando-se a de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) por ajustar-se melhor a atividades de rotina e por ser menos exigente em equipamentos. Entre as virtudes desta técnica estão a rapidez, o número teoricamente ilimitado de marcadores existentes, a possibilidade de automação, a não interferência de fatores ambientais, entre outras, o que a torna excelente para trabalhos que envolvem um grande número de análises. As análises de segmentos polimórficos de DNA, além disso, têm a vantagem, em relação àquelas baseadas em marcadores isoenzimáticos, de permitir a identificação de *seedlings* zigóticos mesmo em hibridações intra-específicas. A utilização de isoenzimas, porém, será considerada sempre que possível, em razão de sua maior simplicidade de aplicação, conciliando custos relativamente menores e rapidez de resultados.

5.7.1.2.4 ANÁLISES CROMOSSÔMICAS

Análises de bandeamento cromossômico realizadas com três espécies de tangerina – *C. reshni*, *C. reticulata* e *C. nobilis* Loureiro – mediante o emprego dos fluorocromos CMA/DAPI, mostraram a existência de heteromorfismo para um ou mais pares cromossômicos (Santos *et al.*, 1993). Esses resultados indicam a possibilidade de se utilizar cromossomos marcadores como auxiliares na identificação de *seedlings* zigóticos, em cruzamentos envolvendo genitores com padrões de bandas cromossômicas diferentes entre si. Além disso, análises cromossômicas de 51 acessos do BAG Citros, compreendendo 20 espécies de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* e sete híbridos interespecíficos, mostraram que a característica cariotípica mais claramente variável foi o número e posição das constrições secundárias (SECs), indicando que as mesmas também têm potencial de uso na identificação de híbridos oriundos de cruzamentos controlados (Guerra *et al.*, 1997).

5.7.2 HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA VIA FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Pretende-se com essa ação de pesquisa obter híbridos somáticos entre espécies de *Citrus*, bem como entre este e outros gêneros afins, particularmente *Poncirus*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, reconhecidos por seu valor adaptativo a ambientes sujeitos a estresses (Swingle, 1967; Hearn *et al.*, 1974). Além destes gêneros, outras fontes doadoras de protoplastos compreendem diversas variedades porta-enxerto portadoras de características de interesse agronômico, tais como: limões 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso', tangerinas 'Cleópatra' e 'Sunki', laranjas 'Azeda' e 'Hamlin' (*C. sinensis*), *C. macrophylla*, *C. ichangensis*, citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) 'Troyer', 'Carrizo' e C-35, citrumelo 'Swingle'. Os protoplastos serão extraídos de células em suspensão, oriundas de calos provenientes de nucelos e óvulos dessas variedades, como também de folhas de *seedlings* nucelares obtidos a partir de germinação de sementes *in vitro*, sob condições assépticas. Pode-se, visualmente, identificar o sucesso inicial das fusões realizadas, utilizando-se combinações de protoplastos com cores distintas, uma vez que aqueles provenientes de nucelos e óvulos são brancos, enquanto que os obtidos de folhas são verdes.

5.7.3 SELEÇÃO DE HÍBRIDOS TOLERANTES À SECA E AO ALUMÍNIO

A citricultura brasileira é praticada em sua quase totalidade sem irrigação, não obstante a freqüente ocorrência de estresses hídricos na maioria das regiões produtoras. Esta situação é particularmente preocupante no Nordeste do país, onde, além das dificuldades climáticas, o nível tecnológico do citricultor é bastante limitado, segundo se depreende pelas baixas produtividade e longevidade de seus pomares. Soma-se a isto a ocorrência de expressiva extensão de áreas geográficas com solos ácidos e com teores elevados de alumínio trocável (Oliveira, 1991), aumentando os prejuízos causados ao crescimento das plantas, devido aos efeitos sinérgicos negativos que o estresse hídrico e a toxicidade de alumínio apresentam (Foy, 1967; Klimov *et al.* citados por Foy, 1988; Krizek & Foy, 1988; Goldman *et al.*, 1989).

Diante disto, decidiu-se que os híbridos gerados pelo PMG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura seriam selecionados inicialmente para tolerância à seca e ao alumínio. No momento, encontram-se em andamento estudos dirigidos à definição de metodologias que permitam a seleção de *seedlings* híbridos promissores a partir de estádios jovens de desenvolvimento. Para tanto, diferentes variedades e espécies do BAG Citros, cuidadosamente escolhidas pela variabilidade genética que apresentam, vêm sendo utilizadas na condução dessas pesquisas.

Sob condições ambientais controladas, os estudos compreendem *seedlings* uniformes (nucelares), submetidos a cultivo em solução nutritiva de Furlani & Hanna (1984) com modificações (Pinto, 1999), logo após sua germinação em canteiros móveis de isopor, tendo como substrato uma mistura de solo autoclavado e areia lavada, apresentando os *seedlings*, nessa fase, o primeiro par de folhas verdadeiras. Os estresses de alumínio e hídrico vêm sendo aplicados mediante o emprego de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e polietileno glicol (PEG), respectivamente, realizando-se as avaliações dos efeitos de estresse 30 dias após o início do cultivo em solução hidropônica. Essa metodologia, além de possibilitar um melhor controle das condições experimentais, permitirá a obtenção de resultados com maior rapidez.

Estão sendo enfatizadas observações dirigidas ao sistema radicular das plantas, buscando-se a identificação de parâmetros que melhor expliquem a tolerância à seca e ao alumínio, de modo a compor um índice de seleção capaz de permitir o reconhecimento de genótipos promissores em estádios iniciais de desenvolvimento de *seedling*.

Dentre os resultados obtidos, ainda restritos aos estudos com alumínio, avaliações efetuadas com os limões 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso da Flórida', tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Azeda' indicam que estas últimas são mais tolerantes, verificando-se que a partir da concentração de 10 mg L^{-1} de cloreto de alumínio houve uma redução do crescimento dos porta-enxertos mais sensíveis, sendo esta mais evidente no sistema radicular (Pinto, 1999).

5.7.4 SELEÇÃO PRECOCE DE GENÓTIPOS RESISTENTES / TOLERANTES À GOMOSE DE *Phytophthora*

As estratégias de controle da gomose de *Phytophthora* baseiam-se na aplicação de fungicidas, adoção de práticas culturais que minimizam a incidência da doença e na resistência do porta-enxerto ao ataque do patógeno. A exemplo do que ocorre na Flórida, EUA, onde já existe um programa de avaliação de híbridos que permite a identificação de genótipos tolerantes ou resistentes à doença, busca-se nesta ação de pesquisa a caracterização de híbridos e acessos do BAG Citros (*seedlings* jovens) quanto ao grau de resistência aos fungos *P. parasitica* e *P. citrophthora*.

A metodologia, em desenvolvimento, baseia-se no cultivo de *seedlings* em casa de vegetação, inoculando-os com isolados de *Phytophthora* (suspensão de zoosporos e solo infestado com clamidosporos) obtidos nos campos experimentais da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os referidos *seedlings* compreendem tanto variedades presentes no BAG Citros, selecionadas com base no prévio conhecimento de sua reação ao ataque da gomose, como híbridos obtidos de cruzamentos controlados, em fase de frutificação/produção de sementes, dentre aqueles reconhecidos como promissores a partir de avaliações ao nível de campo.

Observações complementares, ao nível de campo, baseadas em análises de lesões de gomose no tronco de *seedlings* com seis anos de idade, indicam que híbridos de limões e laranjas doces estão entre os mais sensíveis, no conjunto avaliado, constatando-se que o potencial de inóculo no solo contíguo aos mesmos foi maior do que no de híbridos de *P. trifoliata*, cuja reação à doença foi de maior tolerância/resistência, conforme o esperado, em razão da resistência apresentada por *Poncirus*, universalmente conhecida.

5.7.5 SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS RESISTENTES / TOLERANTES AO VÍRUS DA TRISTEZA

Seedlings híbridos com idade igual ou superior a três anos, plantados em campo, vêm sendo avaliados quanto à presença de caneluras (*stem pitting*) em ramos com cerca de 20 cm de comprimento, coletados em todos os quadrantes das plantas (nove ramos por *seedling*). As leituras têm considerado uma escala de notas variando de um (sem sintomas) a cinco (ramos severamente afetados). Os híbridos que não apresentarem sintomas serão submetidos a testes de ELISA, realizados a partir de amostras de folhas novas, obtidas nos períodos mais frios do ano.

5.7.6 INDUÇÃO DE FLORESCIMENTO

Visando encurtar o longo período pré-reprodutivo comumente observado em citros, estão em desenvolvimento ações de pesquisa com a finalidade de definir metodologias que permitam antecipar o florescimento de híbridos selecionados como promissores, relativamente à tolerância à seca e ao alumínio, de modo a acelerar o início de suas avaliações posteriores. Estes estudos compreendem tanto o emprego de indutores de florescimento, a exemplo do paclobutrazol – PP(333) – como a aplicação de estresses provocados por baixa temperatura (em torno de 17 °C) seguida do restabelecimento da temperatura ambiente (em torno de 24 °C), mediante o uso de câmaras de crescimento, além da enxertia de *seedlings* jovens em plantas adultas (*top working*) e em plantas que se caracterizam por seu comportamento ananicado.

5.7.7 SELEÇÃO DE *SEEDLINGS* HÍBRIDOS EM CAMPO

O PMG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura obedece a um processo contínuo de geração de híbridos. Pretende-se, com a definição de metodologias relacionadas particularmente às ações de pesquisa dirigidas à seleção de híbridos tolerantes à seca e ao alumínio em fases jovens de desenvolvimento de *seedling*, levar à campo somente híbridos identificados como promissores, restringindo, assim, as populações em estudo a indivíduos com maior potencial de ganhos genéticos, relativamente aos principais objetivos do programa.

No momento, todos os *seedlings* reconhecidos como híbridos, tanto a partir de análises de caracteres morfológicos como moleculares, têm sido plantados em campo e submetidos a avaliações compreendendo observações relacionadas aos seguintes parâmetros: altura de planta, formato de copa, vigor, presença de doenças (com destaque para gomose de *Phytophthora*, "tristeza" ou *stem pitting* e verrugose), formato do limbo foliar, textura foliar, ocorrência de floração, presença de frutos, presença de espinhos e enrolamento (murchamento) foliar, este último avaliado durante períodos de estresses hídricos severos. No tocante aos híbridos que se encontram em fase de frutificação são incluídas as seguintes mensurações: número de sementes por fruto, porcentagem de poliembrionia, número médio de embriões por semente e intervalo de variação do número de embriões por semente.

5.7.8 AVALIAÇÕES DE HÍBRIDOS PROMISSORES EM COMBINAÇÃO COM COPAS COMERCIAIS

Híbridos identificados como promissores a partir dos trabalhos de seleção vêm sendo submetidos à enxertia com copas comerciais, com destaque para a laranja 'Pêra', tendo-se em vista sua importância para a citricultura brasileira. As avaliações relativas à esta etapa de estudos compreendem desde caracteres relacionados à fase de produção de mudas (viveiro), até aqueles pertinentes à fase de pomar. Como testemunhas estão sendo utilizados porta-enxertos tradicionais, a exemplo dos limões 'Cravo' e 'Volkameriano' e da tangerina 'Cleópatra'.

Uma vez formadas, as mudas obtidas comporão quadras de observação a serem instaladas em áreas de produtores, representativas, particularmente, dos Tabuleiros Costeiros dos Estados da Bahia e de Sergipe, onde se assenta a maioria dos pomares nordestinos. Ações envolvendo outras regiões brasileiras também serão estabelecidas, dirigidas notadamente para o Norte e Sudeste, contando com a

colaboração de outras instituições, públicas e privadas. A estreita participação do citricultor nessas etapas de avaliação será fundamental na validação da indicação final de novos porta-enxertos a serem incorporados em nossos sistemas de produção.

6. MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO

6.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O mamoeiro insere-se na classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e nos gêneros *Carica, Jacaratia, Jarilla, Cylicomorpha* e *Horovitzia*. O gênero *Carica* possui 22 espécies que se distribuem do México ao Chile e Argentina e para o leste do Brasil. O gênero *Jacaratia* possui seis espécies distribuídas do México ao Brasil, enquanto o gênero *Jarilla* conta com uma espécie encontrada no México e Guatemala. O único gênero com distribuição na África Equatorial é o *Cylicomorpha,* com duas espécies. O *Horovitzia* é o mais novo gênero, com apenas uma espécie.

A *Carica papaya* L. é uma das 22 espécies do gênero *Carica* e a única que possui valor comercial. É caracterizada por apresentar ovário unilocular, enquanto que as outras 21 espécies do gênero *Carica* possuem ovário em sua maior parte pentalocular, mas unilocular na sua parte superior.

6.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Marin & Gomes (1986) relatam que o caule é cilíndrico, com 10 cm a 30 cm de diâmetro, herbáceo, fistuloso, ereto, de coloração verde – clara no ápice e verde – grisácea a acizentada na base, encimado por uma coroa de folhas, dispostas de forma espiralada.

As folhas são alternas, grandes, com 20 cm a 60 cm de comprimento e até 70 cm de diâmetro, glabras, de contorno suborbicular, partidas em sete lóbulos oblongos, sinuosos ou lancinilados, com lâminas ovais ou orbiculares, 7 – 13 nervadas, profundamente palmatilobadas, verde claro – mate na face superior e verde brancacento pálido na face inferior, revestida de material ceroso, sendo as superiores eretas e expandidas (Medina *et al.*, 1989). Os pecíolos são longos, fistulosos, verdes – pálidos ou vermelho – vinosos, geralmente de 50 cm a 70 cm de comprimento.

Segundo Luna (1980), o mamoeiro apresenta um sistema radicular pivotante, com raiz principal bastante desenvolvida, classificada como nampiforme. As raízes apresentam coloração branco cremosa, ramificando-se de forma radical, com distribuição em maior quantidade nos primeiros 30 cm do solo (Marin & Gomes, 1986). No entanto, podem desenvolver até duas vezes a altura da planta, podendo explorar uma camada de solo com profundidade de até um metro.

6.3 ORIGEM E EVOLUÇÃO

A primeira menção sobre a existência de mamoeiro foi feita na Europa, em 1535, pelo cronista espanhol G. H. de Oviedo, em seu livro *The general and natural history of the Indies*, onde informava aos reis da Espanha ter encontrado plantas deste gênero crescendo entre o sul do México e o norte da Nicarágua. Daí, acredita-se que saíram as primeiras sementes para o Panamá, São Domingos, algumas ilhas do Caribe e regiões da América do Sul (De Candolle citado por Lassoudière, 1968).

O local de origem do mamoeiro é discutido há muitos anos. Alguns autores mencionaram que esta espécie é originária do sul do México, enquanto outros sugeriram as terras baixas da América Central oriental, seguindo-se posteriormente as Antilhas, descartadas por não ocorrer o gênero *Carica* nessas ilhas.

Atualmente considera-se que o centro de origem é, muito provavelmente, o noroeste da América do Sul – vertente oriental dos Andes, ou mais precisamente, a Bacia Amazônica Superior, onde se apresenta a máxima diversidade genética.

Após a descoberta do Novo Mundo, o mamoeiro foi amplamente distribuído nos trópicos, principalmente África e Ásia, inicialmente por navegadores portugueses, espanhóis e, posteriormente, por mercadores árabes. Relato de diversos autores permitiram levantar o ano em que o mamoeiro foi introduzido em vários países: Panamá e Porto Rico (1535), Cuba (1540), Brasil (1587), Índia (1611), Europa (1626), Senegal (1637), Paraguai (1648), Ceilão (1667), São Tomé (1686), Estados Unidos – Flórida (1773), Madagascar (1750), Nigéria (1824), Havaí e ilhas do sul do Pacífico (1800-1823) e Israel (1923).

Atualmente a produção mundial é de 4.823.826 toneladas, com uma área de 268.456 ha. O Brasil é o primeiro produtor mundial com 29.000 ha e uma produção de 1.762.500 toneladas, seguido da Índia com 500.000 toneladas e 29.000 ha plantados (IBGE, 1999).

6.4 SISTEMA REPRODUTIVO

A maioria das espécies do gênero *Carica* é dióica, com exceção do *C. papaya* L., *C. monoica* Desf. e do *C. pubescens*, que são polígama, monóica e monóica – dióica, respectivamente.

A *C. papaya* L. possui três tipos de formas sexuais: ginóica (com plantas exclusivamente femininas), andróica (com plantas masculinas) e andromonóica (com plantas cujas inflorescência são hermafroditas).

De acordo com as formas sexuais, as populações de *C. papaya* são classificadas como:

- Dióicas = constituídas por indivíduos ginóicos e andróicos.
- Ginóico – andromonóicas = constituídas por indivíduos ginóicos e andromonóicos.
- Andromonóico – trióicas = constituídas por indivíduos ginóicos, andróicos e andromonóicos.

O estudo da herança do sexo (Storey, 1953) mostrou que as plantas femininas são geneticamente homozigotas para o alelo m e as plantas masculinas e hermafroditas são heterozigotas para os alelos M_1 e M_2, respectivamente, formando as combinações:

mm – plantas femininas;
M_1m – plantas masculinas;
M_2m – plantas hermafroditas.

As combinações M_1M_1 e M_2M_2 não existem porque são letais no zigoto.

Visando a obtenção de frutos provenientes de flores hermafroditas, por apresentarem maior valor comercial, deve-se priorizar o cruzamento ou a

TABELA 4. Percentagem de plantas masculinas, femininas ou hermafroditas obtidas nos cruzamentos indicados, segundo Storey (1953).

Cruzamento	Percentagem de plantas esperada		
	Masculina M_1m	Feminina mm	Hermafrodita M_2m
Hermafrodita x hermafrodita (cruzamento ou autopolinização) $M_2m \times M_2m$	0	33	66
Hermafrodita x feminina $M_2m \times mm$	0	50	50

autopolinização de plantas hermafroditas, cuja descendência será de 33% de plantas femininas e 66% de plantas hermafroditas. Em programas de melhoramento genético, são utilizados, adicionalmente, os cruzamentos entre plantas hermafroditas e femininas, resultando em 50% de cada um dos tipos genitores (Tabela 4).

6.5 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO

O melhoramento genético do mamoeiro em diversas partes do mundo está voltado basicamente para a obtenção de cultivares endógamas. A não exploração do vigor híbrido, de um modo geral, parece ser conseqüência de insuficientes investigações sobre os efeitos da heterose no mamoeiro (Sampaio *et al.*, 1983).

6.5.1 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO NO HAVAÍ

Conforme o tipo de fruto, as cultivares de mamão são classificadas em dois grupos: Solo e Formosa. No Havaí, os objetivos do programa são divididos em características da planta e características do fruto de variedades do grupo Solo. Com relação às características da planta tenta-se obter um vigor superior, frutificação precoce e em parte mais baixa da planta, ausência ou ocorrência mínima de carpeloidia e esterilidade feminina na forma hermafrodita, resistência a pragas e/ou doenças e maior capacidade de produção por planta ou por unidade de área. Quanto às características do fruto são destacadas: peso aproximado de 0,45 kg, forma alongada, piriforme, casca lisa, sem manchas externas, frutos firmes com polpa espessa sem protuberâncias, cavidade redonda e longa duração em armazenamento, cor amarelo-alaranjada brilhante, alto teor de açúcares, ausência de odor desagradável e resistência a várias doenças do fruto.

6.5.2 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO NO BRASIL

No Brasil o programa visa desenvolver variedades e/ou híbridos resistentes a doenças, agregando características agronômicas desejáveis. As características agronômicas mais relevantes são a ausência ou a ocorrência mínima de flores hermafroditas carpelóides, ausência ou ocorrência mínima de flores hermafroditas estéreis, ausência ou ocorrência mínima de flores hermafroditas pentandras, frutificação precoce, vigorosa e com altura inferior a 90 cm, peso médio de fruto do grupo Formosa de 800g a 1.100g e do grupo Solo de 350g a 600g, casca lisa e sem manchas, polpa vermelho-alaranjada, cavidade ovariana pequena e um formato de estrela, polpa com espessura superior a 20 mm, sólidos solúveis acima de 14° brix e maior longevidade pós-colheita.

6.6 MÉTODOS DE MELHORAMENTO

6.6.1 INTRODUÇÃO DE PLANTAS

No Brasil, antes da introdução do mamoeiro Solo, praticamente não existiam variedades comerciais para plantio, visto que as sementes utilizadas apresentavam elevado grau de segregação devido à existência de cultivares dióicas. Entretanto, de acordo com Nakasone *et al.* (1972), progênies com características desejáveis terão um alto grau de uniformidade, quando submetidas a várias gerações de autopolinização.

Em função da sensibilidade das plantas hermafroditas do grupo Solo às variações ambientais, é necessário introduzir variedades e/ou linhagens melhoradas de mamão em regiões onde se deseja estudar a viabilidade deste cultivo sob determinadas condições climáticas (Nakasone, 1980).

No Brasil, ensaios sobre o comportamento e competição de variedades de mamoeiro são praticamente inexistentes. Trabalho desta natureza foi realizado na Bahia por Luna (1976), onde foram observadas oito variedades e seleções com relação à altura de planta, diâmetro do caule, altura da floração, grau de esterilidade, tempo de maturação, suscetibilidade ao ataque de fungos, formato, peso e comprimento do fruto, diâmetro e comprimento da cavidade, número de sementes, espessura, consistência, cor e sabor da polpa. Os resultados destacaram as variedades Tailândia, Solo e Guinea Gold, por apresentarem plantas vigorosas, precoces e fruto com características desejáveis.

Marin *et al.* (1989) introduziram e selecionaram a cultivar Improved Sunrise Solo Line 72/12, para as condições de cultivo do Norte do Espírito Santo. Esta cultivar tem se destacado por apresentar uma consistência de polpa melhor que a cultivar Sunrise Solo, tradicionalmente plantada, permitindo a comercialização de frutos para mercados mais distantes.

6.6.2 UTILIZAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS

O maior Banco Ativo de Germoplasma de mamão (BAG-Mamão) no Brasil se encontra em área de sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia.

O BAG-Mamão conta atualmente com 133 acessos, sendo 102 de *C. papaya*. Os acessos de *C. papaya* são divididos em dois grupos principais: acessos fixados e acessos segregantes. Acessos fixados são aqueles que apresentam cinco ou mais gerações de autofecundação, enquanto que os acessos sem histórico conhecido ou oriundos de coletas são considerados segregantes. Nos acessos segregantes será efetuada a seleção das plantas promissoras, as quais serão autofecundadas, por várias gerações, até que o acesso resultante possa ser considerado fixado. Somente os acessos considerados fixados serão caracterizados mediante aplicações de descritores e avaliação estatística.

Todo o BAG deverá ser avaliado, com os objetivos de permitir e agilizar intercâmbios de germoplasma e informações básicas, além de possibilitar a identificação de linhagens e variedades a serem utilizadas em programas de melhoramento e sistemas de produção.

Para avaliar as linhagens endogâmicas produzidas e a sua capacidade de gerar híbridos superiores, são utilizadas técnicas envolvendo cruzamentos dialélicos, utilizadas amplamente em estudos referentes à herança quantitativa.

6.6.3 CAPACIDADE COMBINATÓRIA DE LINHAGENS PARA PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS

Segundo Storey (1953), os trabalhos de melhoramento são realizados a partir da reunião do maior número possível de variedades em um local selecionando-se, entre elas, aquelas que apresentem características fenotípicas desejáveis para posterior estudo de capacidade combinatória visando produção de híbridos.

Informações sobre o tamanho dos frutos, formato, precocidade e porte da planta indicam, com um considerável grau de certeza, que tipo de híbridos entre indivíduos de duas variedades distintas poderão ser obtidos (Horovitz, 1954).

Após o cruzamento entre cultivares muito diferentes entre si, dois caminhos podem ser seguidos: a) conduzir as gerações por meio de autofecundações sucessivas, visando aumentar a probabilidade de encontrar recombinações de características desejáveis por meio do método de *pedigree*; b) fazer retrocruzamento, principalmente se um dos genitores já apresenta características desejáveis (Nakasone & Storey, 1955).

Para se melhorar as principais características da planta e do fruto, devem ser feitos sistematicamente cruzamentos entre variedades bastante diferentes (Nakasone *et al.*, 1972). Este processo requer tempo, já que junto a poucas características desejáveis, podem ocorrer muitas características indesejáveis, até que se obtenha variedades aceitáveis comercialmente.

Os primeiros trabalhos para obtenção de híbridos de mamão, no Brasil, foram feitos por Sampaio *et al.* (1983), em Conceição do Almeida - BA, e resultaram na obtenção dos híbridos Sunrise Solo x A-G e K-77 x Tailândia, com boa produção e resistência a *Phytophthora parasitica.*

6.6.4 RETROCRUZAMENTO

O retrocruzamento consiste no cruzamento de um híbrido com qualquer de seus genitores. Este método é utilizado quando se deseja agrupar uma ou duas características de herança simples a uma cultivar com características suficientemente satisfatórias. Devem ser feitos vários retrocruzamentos até que se obtenha o resultado esperado. Após estes cruzamentos, o gene (ou genes) que está sendo transferido estará na condição heterozigota, o mesmo não ocorrendo com os demais genes. Quando se busca a transferência de um gene dominante, depois do último retrocruzamento procede-se a autofecundação, que produz homozigose para este gene. Quando o gene a ser transferido é recessivo, os retrocruzamentos são intercalados com autofecundações. Desta maneira, será obtido um material com as mesmas qualidades do pai recorrente sendo, porém, superior a este pai na característica específica para a qual o programa foi conduzido (Allard, 1966).

Giacometti & Ferreira (1988) sugerem duas alternativas para mamoeiros ginóico-andromonóicos:

a) Ambos genitores de porte baixo e fruto com polpa de cor vermelho-alaranjada. Neste caso, já em F_1 pode-se selecionar combinações desejáveis de porte baixo e fruto de polpa vermelho-alaranjada.

b) Um dos genitores de porte alto e fruto com polpa de cor alaranjada e outro de porte baixo e fruto de polpa de cor vermelho-alaranjada. Somente em F_2 serão selecionados segregantes de porte baixo e fruto de polpa vermelho-alaranjada.

Em ambas alternativas, no F_3, se as qualidades do fruto, tais como tamanho, consistência, sólidos solúveis e sabor não estiverem presentes em plantas selecionadas, retrocruza-se com um dos genitores, possuidores das características desejáveis. No F_4 resultante do cruzamento deverão aparecer plantas e frutos desejáveis, os quais serão autofecundados. Caso apareçam segregantes desejáveis na terceira geração, deve-se continuar as autofecundações até a fixação do material, o que deverá ocorrer em F_7 ou F_8.

6.7 MELHORAMENTO NO BRASIL

De uma forma geral, os trabalhos de melhoramento desenvolvidos no Brasil visam explorar a máxima variabilidade genética da espécie *C. papaya* e de outros gêneros e espécies afins, mediante caracterização e avaliação de germoplasma e obter linhagens ou híbridos adaptados às condições edafoclimáticas das principais regiões produtoras, com ênfase para resistência a doenças.

6.7.1 MELHORAMENTO CONVENCIONAL

As cultivares de mamão mais exploradas no Brasil são: grupo Solo ('Sunrise Solo' e 'Improved Sunrise Solo Line 72-12') e Formosa ('Tainung Nº 1'). Suas principais características são:

'SUNRISE SOLO' - Cultivar procedente da Estação Experimental do Havaí (EUA), mais conhecida no Brasil como mamão Havaí, Papaya ou Amazônia. O fruto proveniente de flor feminina é ovalado e o de flor hermafrodita é piriforme, com peso médio de 500g; possui casca lisa e firme, polpa vermelho-alaranjada de boa qualidade e cavidade interna estrelada. Inicia a floração com 3 a 4 meses de idade, a 80 cm de altura, com início de produção 8 a 10 meses após o plantio, produzindo em média 40 t/ha/ano (Figura 4).

'IMPROVED SUNRISE SOLO LINE 72-12' - Cultivar também procedente do Haví, introduzida e melhorada pela Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), conhecida comumente como mamão Havaí, amplamente disseminada nas regiões produtoras do Espírito Santo. O fruto proveniente de flor feminina é ovalado e o de flor hermafrodita é piriforme, com casca lisa, firme, e peso médio de 500g, de grande



Foto: Jorge Luiz Loyola Dantas.

FIGURA 4. Cultivar Sunrise Solo.



FIGURA 5. Híbrido Tainung Nº 1.

aceitação nos mercados interno e externo. A cavidade ovariana é pequena e de formato estrelado; a polpa é espessa e de coloração vermelho-alaranjada, de boa qualidade, com boa resistência ao transporte e maior resistência ao armazenamento que a 'Sunrise Solo'. O início de produção ocorre a partir de 9 meses após o plantio, com altura de inserção das primeiras flores aos 60 a 70 cm.

'TAINUNG Nº 1' - Híbrido altamente produtivo resultante do cruzamento de um tipo de mamão da Costa Rica, de polpa vermelha, com 'Sunrise Solo'. O fruto oriundo de flor feminina é redondo alongado e o da flor hermafrodita é comprido, com peso médio de 900g. Apresenta casca de coloração verde claro e cor de polpa laranja-vermelhada, de ótimo sabor; possui cheiro forte, boa durabilidade de transporte e pouca resistência ao frio. A produtividade média está em torno de 60 t/ha/ano (Oliveira *et al.*, 1994) (Figura 5).

Em síntese, são poucas as variedades comerciais utilizadas, sendo estreita a base genética em que está assentada a cultura do mamoeiro no Brasil. Dessa forma, urge a necessidade do desenvolvimento de novas variedades para ampliar a sustentabilidade da lavoura.

A Figura 6 apresenta o organograma relativo ao programa de melhoramento genético em desenvolvimento pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, o qual segue inicialmente duas linhas distintas, porém com objetivo final comum: 1) a partir de população base (F_1) do híbrido Tainung Nº 1, proceder-se-á seqüencialmente a seleção e autofecundação de plantas com características superiores e, mediante testes de progênies, serão selecionadas linhagens promissoras, que constituirão o banco de linhas puras após a devida caracterização; 2) a partir da introdução de acessos segregantes efetuar-se-á seleção e autofecundação das plantas para promover a sua fixação que, juntamente com os acessos fixados introduzidos, serão caracterizados e integrados ao banco de linhagens.

6.7.2 MELHORAMENTO NÃO CONVENCIONAL

O emprego de diversas técnicas de biotecnologia como ferramentas importantes nos programas de melhoramento do mamoeiro é recente. Dentre essas técnicas destacam-se: resgate de embriões, cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, seleção *in vitro*, produção de sementes artificiais análises moleculares, transformação genética e micropropagação de plantas (Oliveira *et al.*, 1996).

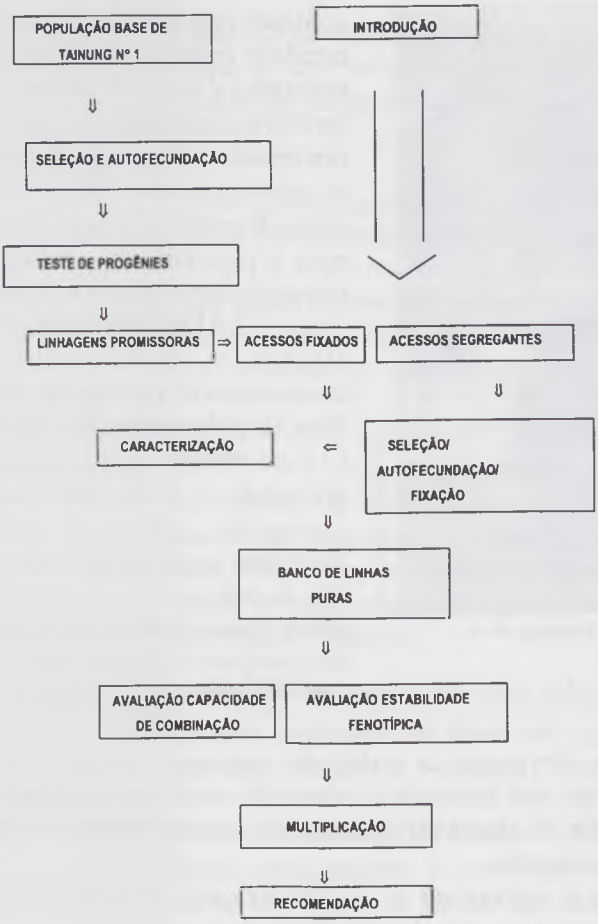


FIGURA 6. Organograma relativo ao programa de melhoramento genético do mamoeiro desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.

6.7.2.1 RESGATE DE EMBRIÕES

Vários pesquisadores em melhoramento genético do mamoeiro vêm realizando cruzamentos interespecíficos com a finalidade de obter cultivares mais produtivas e tolerantes aos fatores bióticos e abióticos que prejudicam a cultura. Estes híbridos interespecíficos têm sido sintetizados visando, principalmente, a transferência dos genes de resistência ao vírus da mancha anelar. Segundo Manshardt & Wenslaff (1989), o desenvolvimento de embriões *in vitro* é uma metodologia importante para superar os freqüentes problemas de abortos dos híbridos interespecíficos, em decorrência do desenvolvimento anormal do endosperma.

6.7.2.2 CULTURA DE ANTERAS

A cultura de anteras tem a finalidade de acelerar a obtenção de materiais homozigotos, os quais levariam anos para serem obtidos pelo métodos convencionais de autofecundação realizados em campo. Os homozigotos podem ser utilizados como novas

cultivares ou para a obtenção de híbridos (Oliveira *et al.*, 1996). Tsay & Su (1985) obtiveram sucesso na cultura de anteras com as cultivares de mamão Sunrise, Tainung, CY e Flórida.

6.7.2.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Sistemas de protoplastos têm sido desenvolvidos visando o melhoramento genético do mamoeiro. O isolamento dos protoplastos é realizado a partir de folhas (Liu *et al.*, 1984) e de células em suspensão (Chen & Chen, 1992). Atualmente, segundo Liu *et al.* (1984), existe uma série de plantas regeneradas a partir de protoplastos sendo avaliadas sob condições de campo.

6.7.2.4 SELEÇÃO *IN VITRO*

Os sistemas para seleção *in vitro* de genótipos tolerantes a fatores bióticos e abiótios têm sido desenvolvidos para várias culturas. Protoplastos, células em suspensão, calos e ápices caulinares são alguns dos materiais que podem ser submetidos a um processo de selção *in vitro*. O princípio dessa metodologia consiste em proporcionar o estresse, selecionar os indivíduos tolerantes e avaliar se o mesmo comportamento ocorre no campo (Oliveira *et al.*, 1996).

Com relação à cultura do mamoeiro, estudos preliminares estão sendo realizados nessa área. Sharma & Skidmore (1988) inocularam ápices caulinares *in vitro* com suspensão de esporos de *Phytophthora palmivora*, tendo as plantas exibido sintomas semelhantes aos que ocorrem no campo.

6.7.2.5 PRODUÇÃO DE SEMENTES ARTIFICIAIS

Diversos autores têm estudado a obtenção e utilização de sementes artificiais a partir do encapsulamento de embriões somáticos, os quais podem ser produzidos em grande quantidade. Através desta metodologia, obteve-se uma porcentagem de sobrevivência dos *seedlings* de 72%, sendo que as plantas obtidas cresceram e produziram frutos normais (Ye *et al.*, 1993).

6.7.2.6 ANÁLISES MOLECULARES

Técnicas de eletroforese, mediante emprego de sistemas isoenzimáticos, têm sido utilizadas para a sexagem do mamoeiro e caracterização genética de variedades (Oliveira *et al.*, 1996).

As plantas hermafroditas de mamoeiro caracterizam-se por produzirem frutos de forma alongada, piriforme ou ovalada, que são os preferidos pelo mercado (Oliveira *et al.*, 1994). A identificação dessas plantas em estágio precoce, por meio da análise de DNA, está sendo estudada por diversos grupos de pesquisa (Sriprasertsak *et al.*, 1988; Andreani Jr. & Lemos, 1995). Sriprasertsak *et al.* (1988) conseguiram identificar bandas características relacionadas ao sexo de plantas de mamoeiro, mediante análise de folhas de plantas jovens, utilizando o sistema isoenzimático peroxidase.

A caracterização de genótipos de mamoeiro por meio de técnicas moleculares é de grande importância para a identificação de cultivares e de híbridos interespecíficos em bancos de germoplasma e programas de melhoramento. Moore & Litz (1984) têm utilizado com sucesso os sistemas isoenzimáticos peroxidase, malato desidrogenase, superoxidase dismutase e glutamato oxaloacetato transaminase com essa finalidade.

6.7.2.7 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

A proteção cruzada é uma das formas de se controlar viroses em plantas. O desenvolvimento de plantas transgênicas de mamão resistentes ao vírus da mancha anelar, a partir de técnicas de engenharia genética e biologia molecular, possibilitará que o cultivo do mamoeiro deixe o nomadismo, reintroduzindo-o em áreas abandonadas, além de proporcionar a melhoria da produtividade, qualidade e do aspecto do fruto, o que permitirá uma maior competitividade do mamão brasileiro no mercado internacional.

Dessa forma, a Embrapa Mandioca e Fruticultura desenvolveu um projeto conjunto com a Universidade de Cornell (EUA) para a obtenção de plantas transgênicas de mamão resistentes aos isolados brasileiros do vírus da mancha anelar. A técnica da biolística foi utilizada para a transferência direta de genes. No momento, os pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura estão concentrando esforços no sentido de avaliar as primeiras plantas transgênicas sob condições de campo e desenvolver protocolos de regeneração de plantas transformadas de mamoeiro.

6.7.2.8 MICROPROPAGAÇÃO

O mamoeiro tem sido propagado principalmente por meio de sementes (Litz, 1986). A multiplicação de plantas de mamoeiro mediante cultura de tecidos vem sendo pesquisada em vários países e, dentro de poucos anos deverá ser utilizada comercialmente por empresas produtoras de mudas, a exemplo do que vem ocorrendo com outras culturas. As vantagens desse sistema de produção de mudas consistem na possibilidade de multiplicar em larga escala híbridos F_1 comerciais (grupo Formosa), plantas premunizadas e plantas hermafroditas livres de pragas e doenças.

6.8 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O melhoramento genético do mamoeiro no Brasil vem sendo executado por diversas instituições, todavia a dependência externa por variedades comerciais melhoradas ainda é fato reconhecido (Giacometti & Ferreira, 1988). Por outro lado, os recursos genéticos disponíveis no país são satisfatórios necessitando, para seu enriquecimento, da realização de coletas e novas introduções visando ampliar a variabilidade intra e interespecífica disponível, o que certamente contribuirá para o desenvolvimento de variedades e híbridos com as características desejáveis, resistentes a pragas e doenças. Estas coletas deverão ser realizadas no Brasil, Colômbia e Costa Rica, buscando-se introduzir acessos da África do Sul, Malásia, Taiwan e Venezuela.

O desenvolvimento das diversas técnicas modernas de biotecnologia como ferramentas importantes em programas de melhoramento e propagação do mamoeiro deverá reduzir o período para obtenção de novas variedades. Os primeiros resultados desses trabalhos estão sendo obtidos. Em futuro próximo, espera-se que diversas cultivares transgênicas com características agronômicas desejáveis, produtivas e tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos, sejam obtidas e propagadas massivamente *in vitro*, facilitando o cultivo do mamoeiro (Oliveira *et al.*, 1996).

Considerando os resultados obtidos pelos vários programas de melhoramento até então desenvolvidos, propõe-se as seguintes ações:

a) Implementar estudos em genética básica, tais como: citogenética, herdabilidade, heterose, combinação de genitores, marcadores moleculares e mapeamento genético;

b) Ampliar a base genética útil para o melhoramento. Para isso tornam-se imprescindíveis a caracterização e avaliação do germoplasma disponível, além do pré-melhoramento. A avaliação de recursos genéticos pode indicar caracteres potencialmente úteis para o melhoramento;

c) Analisar os métodos clássicos de melhoramento e ampliar os trabalhos com técnicas de biologia molecular, engenharia genética e associar estas técnicas aos metódos de melhoramento tradicionais.

7. MELHORAMENTO GENÉTICO DO MARACUJAZEIRO

Maracujá, termo utilizado para designar o fruto e as plantas de espécies do gênero *Passiflora*, constitui uma forma generalizada de referir-se a uma das plantas mais atraentes, não só por suas propriedades ornamentais mas também, por suas características nutricionais e medicinais, além da qualidade de seus frutos comestíveis.

O termo maracujá é derivado da língua Tupi, 'mara cuiá ', que significa comida preparada em cuia (Hoehne, 1946; Ruggiero, 1973). Outra denominação dada aos maracujazeiros é a ´flor da paixão`, denominação esta de origem mística, dada à semelhança de sua flor com a paixão de Jesus Cristo. Esta citação foi feita em 1610 por Jacomo Bosio, que descreveu a flor de maracujá como a 'Flor Passionis', selecionada como o exemplo mais evidente da 'Croce triofante' encontrado na floresta (Vanderplank, 1996).

A flor descrita por Jacomo Bosio mostra os filamentos da corona como a coroa de espinhos, os estigmas são os cravos, o androginóforo a coluna da flagelação, enquanto os estames representam as cinco feridas feitas em Jesus Cristo. A corona tem setenta e dois filamentos, que é o número de espinhos existente na coroa colocada na cabeça de Jesus Cristo. Além disso, as folhas em forma de cabeça de lança dram as peças usadas para ferir o Senhor, enquanto os pontos redondos e escuros existentes na parte dorsal das folhas representam as trinta peças de prata que Judas recebeu para trair o Senhor.

7.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A família Passifloraceae pertence à ordem Violales (Cronquist, 1988), ordem esta constituída de um agrupamento natural de famílias, originárias das Theales, uma ordem primitiva. Esta família apresenta os seguintes gêneros: *Adenia, Chlorophoranthus, Dilkea, Crossostemma, Echinothamus, Hollrungia, Machadoa, Modecca, Parapsia, Passiflora, Smeathmannia, Tetrapathaea, Tryphostemma, Schlechterina, Mitostemma, Tetrastylis* e *Deidania* (Killip, 1938; Leitão Filho & Aranha, 1974).

No Brasil, a família é representada por quatro gêneros, *Dilkea* (ocorrência no Amazonas e Pará), *Mitostemma* (presente no Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul), *Tetrastylis* (Estados da Bahia, Minas Gerais e Rio de janeiro) e *Passiflora* (de ocorrência em todo o país) (Reitz, 1980). No entanto, segundo Leitão Filho & Aranha (1974), apenas os gêneros *Dilkea* e *Passiflora* representam esta família no País.

A família Passifloraceae é constituída por cerca de 630 espécies, sendo a maioria originária da América Tropical. As espécies de maracujá são consideradas perenes em sua maioria, existindo espécies anuais em pequeno número, como é o caso de *P. gracilis* (Vanderplank, 1996).

7.2 ORIGEM

De acordo com VanderplanK (1996), o gênero *Passiflora* é essencialmente americano. Muitas espécies também são encontradas nas Américas do Norte e Sul, na Índia Ocidental, sendo as espécies remanescentes de ocorrência natural no sudoeste da Ásia, Ilhas do Pacífico Sul, Ilhas Galápagos, África, Austrália e uma única espécie em Madagascar mas, todas introduzidas, uma vez que a América do Sul é o local de origem de pelo menos 95 % das espécies (Killip, 1938).

Killip (1938) descreveu cerca de 354 espécies americanas de *Passiflora* sendo aproximadamente 101 citadas para o Brasil. Hoehne (1946) ampliou para mais de 150 espécies nativas amplamente distribuídas e Oliveira *et al.* (1988) ampliaram este número para mais de 200 espécies, sendo a região Centro-Norte a maior área de distribuição geográfica do gênero no Brasil. Destas, cerca de 51 a 64 produzem frutos comestíveis (Manica, 1997). Assim, pode-se afirmar que o Brasil é o principal centro de origem das Passifloráceas.

As espécies silvestres são encontradas principalmente em matas úmidas e freqüentemente crescem nas clareiras e nas beiradas das matas. Raramente, algumas espécies podem ser encontradas no interior das matas densas, em capoeiras ou em matas de planalto.

7.3 RECURSOS GENÉTICOS

O estreitamento da base genética de qualquer espécie de planta ocorre na medida em que há um avanço na melhoria do cultivo, como é o caso do uso de linhagens em plantas autógamas e de variedades híbridas em alógamas (Briggs & Knowles, 1967), em substituição a materiais tradicionais; a perda de genes também é observada, conforme citado por Cunha (1980), pela cessão de áreas para hidrelétricas, rodovias, indústrias etc. Desta forma, a conservação de germoplasma local em coleções é imperativa, assim como é recomendável a introdução de materiais de outros países, sendo que, neste caso, como citado por Allard (1966) e por Briggs & Knowles (1967), obtém-se os mesmos resultados de programas locais de melhoramento genético ao anexar-se às coleções variedades superiores. Seja qual for o caminho seguido, deve-se ter em mente que a variabilidade genética é a base para o melhoramento de plantas (Poehlman, 1966).

7.3.1 GERMOPLASMA DE MARACUJÁ

O termo germoplasma de maracujá refere-se à varibilidade genética do gênero *Passiflora*, notadamente aquelas espécies compatíveis com as cultivadas, com $2n = 2x = 18$. Os acessos existentes em coleções em todo o mundo encontram-se na Tabela 5 (Ferreira, 1998).

7.3.2 BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA (BAG)

A introdução do germoplasma é efetuada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) quando trata-se de material proveniente do exterior e de coletas, enquanto aquela decorrente de intercâmbio com instituições do País é

levada a efeito pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMF) e CENARGEN, podendo vir sob a forma de semente e estaca. As sementes são colhidas em frutos representativos do material, em boas condições fitossanitárias e maduros e retirados de plantas que forneçam uma amostragem adequada da população. As estacas são uma alternativa, no caso de não se poder trazer as sementes e, assim sendo, deve-se introduzir um número que garanta a multiplicação do material sem risco de perdas, indicando-se mais de 20 estacas, cada com dois a quatro nós, com meia folha ou folhas inteiras (São José *et al.*, 1994).

TABELA 5. Acessos de *Passiflora edulis* e *Passiflora* spp. mantidos em diversos países.

País	Instituição - Local	*Passiflora edulis*	*Passiflora* spp.	Total
Austrália	DPI-Nambour	4	10	14
Brasil	CNPMF-Cruz das Almas	20	25	45*
Brasil	IAC-Jundiaí	-	56	56
Brasil	IAPAR-Londrina	7	78	85
Brasil	UNESP-Botucatu	1	1	2
Brasil	UNESP-Jaboticabal	7	35	42
Camarões	IRA-Njombe	2	-	2
Chile	UAC-Valdivia	-	2	2
Colômbia	ICA-Palmira	7	-	7
Costa Rica	CATIE-Turrialba	4	9	13
Cuba	DICOF-Havana	2	2	4
Chile	ARI-Nicosia	1	-	1
Equador	INIAP-Oistoviejo	5	3	8
Equador	INIAP-Quito	5	3	8
França	CIRAD-Guadalupe	5	22	27
França	IRFA-Reunião	-	7	7
Gana	PGRU-Bunso	1	-	1
Jamaica	RDD/MA-Kingston	-	16	16
Quênia	NGK-Kikuyu	2	-	2
Malawi	BARS-Limbe	-	3	3
Nicarágua	UNA-Managua	5	-	5
Papua Nova Guiné	DPI-Keravat	-	2	2
Peru	UNA-Lima	16	-	16
Filipinas	UPLB-Laguna	3	3	6
África do Sul	DATS-Pretoria	4	3	7
Taiwan	TARI-Chia-yi	2	4	6
Taiwan	TARI-Kaohsiung	2	-	2
EUA	USDA/ARS-Hilo	16	5	21
EUA	USDA/ARS-Ames	-	1	1
EUA	USDA/ARS-Miami	51	140	191
Uruguai	UR/FA-Montevideo	-	2	2
TOTAL		172	432	604

*Dados atualizados = 50 acessos

Os acessos são plantados no espaçamento de 2,0 m x 5,0 m, em espaldeira vertical com arame liso nº 12, estirado a 2,0 m do solo em mourões de 2,50 m de comprimento, espaçados de 5,0 m. Cada acesso é plantado em 10 covas, cada cova com duas plantas, sem delineamento experimental, mantidas por polinização controlada. A renovação do plantio é efetuada a cada três-cinco anos e os tratos culturais, adubação e cuidados fitossanitários são aqueles preconizados para os plantios de maracujá. Atualmente, o BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura possui 50 acessos.

Paralelamente à conservação em campo, são conduzidos trabalhos para a conservação de acessos sob a forma de semente. Espécies que apresentam dificuldades de manutenção no BAG, em condições de campo, são multiplicadas sob condições controladas, a fim de promover a sua adaptação ou indicar outros meios de garantir a sua conservação.

Outra estratégia para a conservação das passifloras inclui a utilizaçã da cultura de tecidos. A conservação dos maracujazeiros em campo exige grandes áreas para o plantio, proteção contra o ataque de patógenos e pragas, além das plantas estarem sujeitas às adversidades climáticas. Por estas razões, têm-se verificado que a conservação *in vitro* de certas espécies reduz os custos de manutenção e torna o processo de conservação da coleção mais eficiente (Roca *et al.*, 1982), seja a partir de ápices caulinares, sementes, hastes, embriões zigóticos e/ou somáticos, ou mesmo calos.

A utilização de técnicas de cultura de tecidos para a conservação *in vitro* de acessos das passifloras já é uma prática rotineira utilizada em algumas instituições. Por exemplo, no Laboratório Central de Biologia Molecular da ESALQ – USP (Piracicaba, SP) cerca de 20 espécies foram introduzidas no ano de 1990. Estas espécies têm servido como fonte para estudos de introgressão gênica, via fusão de protoplastos. Também no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA), igualmente, cerca de 10 espécies e híbridos foram introduzidos.

Já a caracterização e a avaliação são conduzidas com base em uma lista de descritores mínimos (Cunha, 1996), procedendo-se à ampliação e aperfeiçoamento com o andamento dos trabalhos. Os caracteres observados são:

- vigor vegetativo: notas de 1 a 10, com a nota máxima sendo atribuída às plantas mais vigorosas, com bom aspecto visual e bom desenvolvimento vegetativo;
- produtividade, em kg ha^{-1};
- época de florescimento: meses do ano em que a planta floresce;
- horário de abertura das flores;
- coloração e tamanho das flores;
- número de frutos;
- peso médio de 100 frutos, em kg;
- tamanho dos frutos: distância entre o ápice e a região do pedúnculo e o diâmetro mediano do fruto;
- coloração externa e interna do fruto maduro;
- número de sementes por fruto maduro;
- espessura da casca: avaliada na região mediana do fruto e em local onde não há resíduos de inserção das sementes, em mm;
- cor do suco;

- teor de sólidos solúveis totais (°Brix): avaliado por refratômetro;
- acidez titulável: titulação de um volume conhecido de suco com uma solução padrão de hidróxido de sódio;
- rendimento em suco: relação entre volume de suco e peso da amostra de frutos;
- ocorrência de insetos-pragas e de inimigos naturais;
- avaliação visual de doenças;
- ocorrência de definhamento precoce;
- viabilidade do pólen;
- avaliação do grau de incompatibilidade: auto-polinizações e polinizações cruzadas recíprocas são efetuadas, observando-se as escalas: reação totalmente incompatível (menos de 5% de produção de frutos); reação parcialmente compatível (5 a 59% de produção de frutos); reação compatível (60% ou mais de produção de frutos);
- folha: forma, cor, tamanho, margem, consistência, pilosidade, nervuras secundárias, estípulas, ápice, glândulas e pecíolo;
- flor: tamanho, cor, consistência e forma das pétalas e sépalas, antera, filete, estigma, ovário, androginóforo e brácteas;
- caule: pilosidade e cor;
- gavinhas;
- caracterização, ao nível molecular, da diversidade genética entre os diferentes acessos de *Pssiflora* spp., usando marcadoresdo tipo RAPD.

As observações concernentes à caracterização botânica são efetuadas em seis amostras de flores e frutos por acesso, enquanto que nas análises laboratoriais são utilizadas amostras de 10 frutos.

Os dados de caracterização e avaliação são processados conforme os procedimentos da estatística univariada (estatística descritiva e correlação) e multivariada (*Cluster* e componentes principais), objetivando identificar os acessos homogêneos e também preparar o manual com um número mínimo de descritores que permitam maiores ganhos em trabalhos subseqüentes. Posteriormente, os acessos do BAG são tratados estatisticamente de acordo com a análise conjunta de experimentos em blocos casualizados com tratamentos comuns (Gomes, 1987).

7.4 OBJETIVOS DO MELHORAMENTO

Os objetivos básicos do melhoramento genético de populações visam basicamente obter dados sobre a eficiência dos métodos de seleção massal estratificada e de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos, com modificações para aplicação em maracujá; verificar os efeitos destes métodos de seleção sobre a variabilidade genética das populações frente ao progresso genético obtido; estimar parâmetros genéticos e o progresso genético esperado face ao progresso genético obtido; obter populações melhoradas de alta produtividade e com características agronômicas desejáveis, passíveis de: incorporação imediata nos sistemas de produção em uso pelo agricultor; utilização em programas de cruzamentos interpopulacionais, a fim de verificar o vigor híbrido e obter materiais para uso pelo agricultor; utilização como fonte de linhagens endogâmicas para uso em programas de maracujazeiro híbrido.

7.5 MÉTODOS DE MELHORAMENTO

O maracujazeiro é uma espécie alógama de cultivo recente, com ampla variabilidade genética a ser explorada. Muitas espécies de *Passiflora* apresentam características agronômicas e nutricionais que podem ser exploradas diretamente ou introduzidas por hibridação (Oliveira *et al.*, 1987).

Sendo uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento possíveis de serem utilizados, visando ao aumento da freqüência de genes favoráveis ou a obtenção de híbridos interespecíficos. O aumento das freqüência de genes favoráveis pode ocorrer pela seleção massal ou seleção com teste de progênies. Já a heterose (ou vigor híbrido) é explorado pela obtenção de híbridos, variedades sintéticas ou compostos (Bruckner, 1997). No entanto, a utilização de métodos de melhoramento tem sido limitada, uma vez que no maracujazeiro ocorre o mecanismo de incompatibilidade (Bruckner, 1994).

A presença desse mecanismo tem impossibilitado a exploração de espécies selvagens portadoras de genes de interesse pela hibridação sexual, uma vez que o sucesso nos cruzamentos depende das relações filogenéticas entre as espécies envolvidas no cruzamento.

7.5.1 INTRODUÇÃO DE PLANTAS

As possibilidades de intercâmbio de germoplasma de maracujá restringem-se a cerca de 500 acessos do total de 604 existentes nos diversos bancos de germoplasma (Ferreira, 1998). Isso ocorre por razões de ordem política e/ou fitossanitária, continuando a ser o material existente na natureza a maior fonte de germoplasma, no momento atual.

Vários países produtores de maracujá introduziram sementes de outros países, como o Brasil, Austrália, Havaí entre outros, objetivando a avaliação nessas regiões ou para incorporação em programas de melhoramento (Oliveira & Ferreira, 1991).

7.5.2 SELEÇÃO DE PLANTAS

A seleção massal em maracujá é normalmente utilizada pelo agricultor, que escolhe as melhores plantas para fornecer as sementes para o próximo plantio (Oliveira, 1980; Oliveira & Ferreira, 1991). Estes autores citam que essa seleção não tem dado os resultados esperados em outras espécies, como é o caso do milho, principalmente em caracteres poligênicos, mas, em maracujá, por ser de cultivo recente e pouco submetido a pressões de seleção, ela deve atuar com eficiência.

Os métodos de seleção massal, seleção entre e dentro de meios-irmãos e irmãos germanos têm sido empregados por Oliveira (1980) em trabalhos de melhoramento genético de maracujá amarelo para aumento de produtividade. O autor observou que a população de maracujá amarelo obtida por hibridação foi superior em produção àquela obtida por seleção massal em 11,4% na primeira safra, sendo que a diferença entre as médias de produção do segundo ano não foi significativa. O autor considerou, ainda, que a população resultante de sementes coletadas em plantas de polinização livre, com seleção da planta matriz apenas do lado feminino, foi resultante de seleção massal, enquanto aquela originária de hibridação foi conseqüência de polinização controlada, com seleção em ambos os sexos e cultivando-se, de cada progênie, cinco

descendentes para posterior seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos e irmãos germanos. As duas populações não diferiram significativamente com relação ao comprimento e largura do fruto, rendimento em suco e sólidos solúveis.

A seleção clonal empregada por Maluf *et al.* (1989) evidenciou a eficiência da seleção para peso de fruto, se comparada a teor de sólidos solúveis e percentagem de polpa.

7.5.3 HIBRIDAÇÃO INTRA E INTERESPECÍFICA

As hibridações têm sido relatadas com resultados promissores por Oliveira (1980) e por Vanderplank (1996), sendo híbridos produzidos na natureza e pela intervenção do homem.

Em hibridações interespecíficas, ênfase têm sido dada à introdução de genes de interesse de espécies selvagens para a espécie cultivada *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. Esta espécie apresenta algumas vantagens, como florescimento abundante e ininterrupto entre o final de outubro a começo de maio, sementes de germinação previsível e rápida, além de conservar o poder germinativo por aproximadamente um ano (Oliveira & Ruggiero, 1999).

7.5.4 HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA

A incompatibilidade existente em maracujazeiro tem impedido a realização de cruzamentos entre espécies sexualmente incompatíveis. A hibridação somática pela fusão de protoplastos, que são células sem a parede celular, tem-se constituído em uma alternativa para vencer essa barreira (Dornelas, 1995). Ao contrário da hibridação sexual, na hibridação somática os genitores contribuem com lotes diplóides de cromossomos, o que possibilita o pareamento entre os cromossomos das espécies envolvidas no processo de fusão, o que pode levar à introgressão gênica.

No caso específico do maracujazeiro, híbridos somáticos envolvendo algumas espécies já foram obtidos, como exemplo os de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. + *P. incarnata* (Otoni *et al*, 1995) em Viçosa (MG) e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa Deg.* + *P. alata, P. edulis* Sims f. *flavicarpa Deg.* + *P. cincinnata, P. edulis* Sims f. *flavicarpa Deg.* + *P. amethystina e P. edulis* Sims f. *flavicarpa Deg.* + *P. giberti* (Dornelas, 1995) em Piracicaba (SP).

7.5.5 MELHORAMENTO GENÉTICO DE POPULAÇÕES

7.5.5.1 SELEÇÃO MASSAL ESTRATIFICADA - SME

As populações originais (ciclo original) de maracujá amarelo e maracujá roxo são plantadas em quadras isoladas, em terrenos uniformes, cada área útil de 2.160 m^2, sendo 144 plantas utilizadas na seleção; uma fileira de plantas é usada como bordadura para toda a quadra. O espaçamento é de 3,0 m x 5,0 m, cultivando-se uma planta por cova; uma vez que só as plantas competitivas, cercadas por outras plantas, são consideradas para a seleção, cuidado especial é dado à formação das mudas, a fim de garantir um estande o mais completo possível.

O esquema é aquele descrito por Gardner (1961) e Paterniani (1969), com modificações. A quadra é estratificada em parcelas de 12 plantas cada, em uma área de 180 m^2, considerando-se para a seleção somente as plantas dentro de cada parcela.

A colheita é feita em 25% das plantas em cada parcela, sendo três plantas selecionadas por parcela que, após serem intercruzadas, fornecem as sementes utilizadas no ciclo seguinte de seleção. A amostra de sementes para o plantio deste ciclo é formado por igual número de sementes de cada planta selecionada; dessa amostra é armazenada uma parte das sementes para utilização em ensaios de produção.

As plantas selecionadas quando da primeira safra, pelo vigor egetativo, produção pendente (frutos ainda na planta) e dados anotados após a colheita, são polinizadas manualmnte na segunda safra, fazendo-se assim a seleção em ambos os sexos.

Os ensaios de produção são conduzidos em blocos casualizados, com cinco tratamentos e oito rpetições. Os tratamentos correspondem a quatro ciclos de seleção (0, I, II e III) e uma população comercializada por empresa fornecedora de sementes e produtores de maracujá. O espaçamento utilizado é de 2,0 m x 5,0 m, com duas fileiras por tratamento, cada com oito covas e uma planta por cova. O esquema é o mesmo em todos os ciclos de seleção.

7.5.5.2 SELEÇÃO ENTRE E DENTRO DE FAMÍLIAS DE MEIOS-IRMÃOS - SEDFMI

As populações originais (ciclo original) de maracujá amarelo e maracujá roxo são implantadas em quadras isoladas, cada área útil de 2.160 m^2, sendo 144 plantas utilizadas na seleção; cada quadra é circundada por uma fileira de plantas como bordadura. O espaçamento é de 3,0 m x 5,0 m, mantendo-se uma planta por cova.

O esquema adotado é aquele descrito por Paterniani (1968), com modificações. A seleção nessas quadras de polinização livre será feita com uma pressão de seleção de 25%, com a colheita das 36 plantas selecionadas sendo realizada individualmente, constituindo assim as progênies de meios-irmãos; as progênies são os tratamentos em ensaios de produção, no delineamento látice simples duplicado, com quatro repetições. Três repetições são implantadas em área contínua, no mesmo período, enquanto a quarta é plantada em lote isolado seis meses após as primeiras, permitindo assim o controle da polinização e a realização da colheita já com o conhecimento dos dados das três repetições. Essa repetição será formada por fileiras femininas representando as 36 progênies de meios-irmãos, plantando-se uma fileira masculina a cada três fileiras femininas; cada fileira masculina será formada por sementes de três progênies, com três plantas por progênie.

A polinização será controlada na quarta repetição, de modo a permitir que as plantas das fileiras femininas sejam fertilizadas apenas pelas plantas das fileiras masculinas. Para tanto, cinco flores de cada planta das progênies selecionadas, com base nos dados das três repetições, serão polinizadas por uma mistura de pólen das plantas das fileiras masculinas, também coletando-se o pólen apenas daquelas selecionadas; desta forma será feita a seleção em ambos os sexos. A emasculação das plantas das fileiras femininas não será necessária, devido à auto-incompatibilidade existente em *Passiflora* spp.

A pressão de seleção no primeiro ciclo será de 33,0%, enquanto no segundo e terceiro terá intensidades de 20,0% e 15,0%, respectivamente. A seleção entre progênies será conduzida com base nos dados das três repetições colhidas anteriormente, sendo que dentro de cada progênie será feita uma seleção massal, escolhendo-se quatro plantas competitivas por progênie.

O espaçamento adotado no látice simples duplicado é de 2,0 m x 5,0 m, com fileiras de nove covas úteis, cada cova com uma planta. As três repetições ocupam uma área total de (55,0 m x 76,0 m) x 3 = 12.540 m², sendo a área útil de (45,0 m x 72,0 m) x 3 = 9.720 m²; cada repetição circundada por uma fileira de bordadura. Assim o número total de plantas é de 1.254, enquanto as úteis são 972. A quarta repetição tem uma área total de (55,0 m x 100,0 m) x 1 = 5.500 m², sendo a área útil de (45,0 m x 96,0 m) x 1 = 4.320 m², também com uma fileira de bordadura. Esse esquema de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos é seguido em todos os ciclos de seleção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 3.ed. New York: John Willey, 1966. 485p.

ALMEIDA, J.I.L. de; ARAÚJO, F.E. de. **A acerola**: introduções preliminares de cultivo. Fortaleza: EPACE, 1992. (Pesquisa em Andamento, 21).

ALVES, E.J. Programa de melhoramento genético da banana e plátano na Embrapa-CNPMF: planejamento, implantação e progressos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p.83-94, 1993a.

ALVES, R.E. Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fisiologia da maturação e armazenamento refrigerado sob atmosfera ambiente modificada. Lavras: ESAL, 1993b. 99p. Dissertação, Mestrado.

ALVES, R.E. Contribuição ao estudo da cultura da acerola (*Malpighia glabra* L.): propagação assexuada e teores de nutrientes. Areia: UFPB, 1989. 79p. Trabalho, Graduação.

ALVES, R.E.; MENEZES, J.B. Botânica da aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. (Ed.) **Acerola no Brasil**, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1995. p.7-14.

ANDREANI JR., R.; LEMOS, E.G.L. Utilização do sistema peroxidase na determinação do sexo em plantas de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.251, 1995.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, p.243- 245, 1990.

BEER, Z.C.; VISSER, A.A. Mutation Breeding of Banana in South Africa. In: JONES, D.R. (Ed.) **The Improvement and testing of Musa**: a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.243-247.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S.L. **El cultivo del plátano en trópico**. Cali: ICA, 1991. 375p. (Manual de Assistência Técnica, 50).

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547p.

BRIGGS, F.N.; KNOWLES, P.F. **Introduction to plant breeding**. New York: Reinhold, 1967. 446p.

BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; BRUCKNER, C.H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. (Ed.) **Maracujá**: temas selecionados (1). Melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 70p.

BRUCKNER, C.H. Auto-incompatibilidade no maracujá (*Passiflora edulis* Sims). Viçosa: UFV, 1994. 85p. Tese, Doutorado.

CABOT, C. Amélioration génétique de l'ananas: I. Considérations préalables aux recherches conduites en Côte d'Ivoire. **Fruits**, v.42, p.556-557, 1987.

CABOT, C. Amélioration génétique de l'ananas: II. Objectifs du programme de création variétale entrepris en Côte d'Ivoire et techniques utilisées pour sa réalisation. **Fruits**, v.44, p.183-191, 1989.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; SOUTO, G.F. Reação de germoplasma de abacaxi à inoculação com *Fusarium moniliforme* var. subglutinans. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.787-791, 1985.

CABRAL, J.R.S.; FERREIRA, F.R.; MATOS, A.P. de.; SANCHES, N.F. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1998. 30p. (Documentos, 80).

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de. Pineapple breeding for resistance to fusariosis. **Revista de la Facultad de Agronomia**, v.21, p.137-145, 1995.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de. **Recomendações de cultivares de abacaxi resistentes à fusariose**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1986. 4p. (Comunicado Técnico, 11).

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de. **Seleção de genótipos de abacaxi resistentes à fusariose**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1989. 4p. (Pesquisa em Andamento, 23).

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. Segregation for resistance to fusariose, leaf margin type, and leaf colour from the Embrapa pineapple hybridization. **Acta Horticulturae**, n.425, p.137-144, 1997.

CASTLE, W.S. Controlling citrus tree size with rootstocks and viruses for higher density plantings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.91, p.46-50, 1979.

CHAMPION, J. **Les bananiers et leur culture**; botanique et genetique. Paris: IFAC, 1967. t.1, 214p.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (Ed.) **Citrus**: Basle: CIBA-GEIGY, 1975. p.14-20.

CHEESMAN, E.E. Classification of the bananas: III. Critical notes on species (c) *M. paradisiaca, M. sapientum*. **Kew Bulletin**, v.2, p.147-153, 1948.

CHEN, M.H.; CHEN, C.C. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.11, p.404-407, 1992.

COLLINS, S.L. **The pineapple:** botany, cultivation and utilization. New York: Interscience Publishers, 1960. 294p.

CONCEIÇÃO, A.S.; MATSUMOTO, K.; BAKRY, F.; BERND-SOUZA, R.. B. Plant regeneration from long-term callus culture of AAA-group dessert banana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1998. /No Prelo/

CONSTANTIN, M.J. **Induced mutation for crop improvement in Latin America**, Viena: IEAE, 1984. p.59-77: Potential of *"in vitro"* mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; DUVAL, M.F. Bases genéticas para definir uma estratégia de mejoramiento de la piña. Fort de France-Martinica. **Revista de la Faculdad de Agronomia**, v.11, p.95-118, 1995.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F.; DUVAL, M.F. Germplasm resources of pineapple. **Horticultural reviews**, v.21, p.133-175, 1997.

CORDEIRO, Z.J.M.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L. Rating Banana for reaction to *Fusarium* wilt in Brazil. In: VALMAYOR, R. V.; HWANG, S. C. ; PLOETZ, R.; LEE, S.W.; ROA, V.N. (Ed.) **Proceedings**. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT DEVELOPMENT IN BANANA CULTIVATION TECHNOLOGY, Chiuju, Pingtung-Taiwan, 1992. **Proceedings**. Los Baños, Laguna: INIBAP/ASPNET, 1993, p.84-88.

COSTA, D. da C.; CARNEIRO, R.M.D.G.; OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W. dos S.; ALMEIDA, F.P. de. Identificação de populações de *Meloidogyne* spp. em raízes de acerola *Malpighia punicifolia* L. **Nematologia Brasileira**, v.23, p.77-80, 1999.

CRONQUIST, A. The divisions and classes of plants. **Botanical Review**, v.26, p.425-482, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.

CUNHA SOBRINHO, A.P. da; SOARES FILHO, W. dos S.; PASSOS, O.S. Recursos genéticos de citros na Embrapa Mandioca e Fruticultura. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2, Brasília, 1999. **Anais**. Brasília, 1999. /CD-ROM/

CUNHA, M.A.P da. Recursos genéticos e modificações em métodos de seleção para produtividade em maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, p.413-423, 1996.

CUNHA, M.A.P. da. CENARGEN: Unidade dedicada ao germoplasma. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., Brasília, 1979. **Anais**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1980. p.11-14.

DALE, J. L Banana biotechnology: already a reality. **AgBiotechNet**, v.1, 1999 (ABN033).

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; CORDEIRO, Z.J.M.; SILVA, S.de O. e; SOUZA, A. da S. **Citogenética e melhoramento genético da bananeira (*Musa* spp.)**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1993. 61p. (Documentos, 48).

DANTAS, J.L.L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. de O; SOARES FILHO.W. dos S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E.J. (Org.) **A cultura da banana, aspectos técnicos, sócioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Cruz das Almas, EMBRAPA, CNPMF, 1997. p.27-34.

DE LANGE, J.H.; VINCENT, A.P. Citrus breeding: new techniques in simulation of hybrid production and identification of zygotic embryo and seedlings. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, Orlando, 1977. **Proceedings**. Orlando: 1977. v.2, p.589-595.

DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassiflora* 'Meiwa' with *Citrus sinensis* 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, v.49, p.55-62, 1991.

DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). **Fruits**, v.2, p.125-135, 1991.

DORNELAS, M.C. Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 182p. Dissertação, Mestrado.

DUJARDIN, M. Citogénétique de l'ananas. **Fruits**, n.46, p.376-379, 1991.

DUVAL, M.F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S.; BIANCHETTI, L.B. First results from joint EMBRAPA-CIRAD Ananas germplasm collecting in Brazil and French Guyana. **Acta Horticulturae**, n.425, p.137-144, 1997.

ELLIOTT, F.C. **Plant breeding and citogenetics**. New York: Mac-Graw Hill, 1958. 335p.

EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. **Acerola sertaneja BRS**; cultivar selecionada para as áreas irrigadas do Nordeste brasileiro. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, 1998. 4p.

FAO. **Production.Crops. Primary & Domais = SUA**. http://apps. fao. org/cgi-bin/nph-db.pl. (03 Maio 1999).

FAO/PNUMA. **Conservación in situ de recursos genéticos**. Santiago: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe, 1991.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Pesquisa em maracujazeiro no Brasil**; reunião técnica 1997. Cruz das Almas, 1998. p.48-53 (Documentos, 77).

FERREIRA, F.R. Recursos genéticos de fruteiras tropicais e subtropicais no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., Jaboticabal, 1997. **Anais**. Jaboticabal: FCAVJ, UNESP, 1997. p.5.

FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, n.334, p.23-26, 1993.

FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Melhoramento genético do abacaxizeiro. **Informe Agropecuário**, v.19, p.24-28, 1998.

FOY, C.D. Differential tolerance of dry beans, snapbeans, and lima beans varieties to an acid soil high in exchangeable aluminum. **Agronomy Journal**, v.59, p.561-564, 1967.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum toxic soil. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.959-987, 1988.

FROST, H.B.; KRUG, C.A. Diploid: tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. **Genetics**, v.27, p.619-634, 1942.

FRUTOS, R. Plant Improvement through genetic engineering: propescts and limitations. In: GANRY, J. (Ed.) **Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests**. Montpellier: CIRAD- FLHOR, 1993. p.347-351.

FURLANI, P.R.; HANNA, L.G. Avaliação da tolerância de plantas de arroz e milho ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.205-208, 1984.

GARDNER, C.O. An evaluation of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. **Crop Science**, v.1, p.241-245, 1961.

GIACOMELLI, E.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Seleção de algumas cultivares de abacaxizeiro resistentes à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., Florianópolis, 1983. **Anais**. Florianópolis: SBF, 1984. p.145-161.

GIACOMETTI, D.C. Sistema taxonômico dos *Citrus* de Tanaka. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., Viçosa, 1973. **Anais**. Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1973. v.2, p.585-599.

GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.A. (Ed.) **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.99-115.

GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do mamão no Brasil e perspectivas. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Mamão**. Jaboticabal: 1988. p.377-388.

GMITTER JR., F.G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economy Botany**, v.44, p.267-277, 1990.

GOLDMAN, I.L.; CARTER, T.E.; PATERSON, R.P. Diferential genotypic response to drougth stress and subsoil aluminum in soybean. **Crop Science**, v.29, p.330-334, 1989.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, v.7, p.5-7, 1988.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. Six new somatic citrus hybrid and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, p.169-173, 1991.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G.; TUSA, N.; CHANDLER, J.L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.656-659, 1990.

GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER Jr., F.G. Interespecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key lime' (*C. aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, n.39, p.23-29, 1989.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. dos S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Revista Brasileira de Genética**, v.20, p.489-496, 1997.

HEARN, C.J.; HUTCHISON, D.J.; BARRET, H.C. Breeding citrus rootstocks. **HortScience**, v.9, p.357-358, 1974.

HENZ, G.P.; TAKATSU, A.; REIFSHNEIDER, F.J.B. Avaliação da virulência e variabilidade em isolados de *Xantomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.350-352, 1987.

HODGSON, R.W. Taxonomy and nomenclature in citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 2., Lake Alfred, 1960. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida, 1961. p.1-7.

HOEHNE, F.C. **Frutas indígenas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1946. p.62-63.

HOROVITZ, S. Determinacion del sexo en *Carica papaya* L. Estructura hipotetica de los cromossomas sexuales. **Agronomia Tropical**, v.3, p.229-249, 1954.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Roma: IBPGR, 1992. 52p.

HOYT, E. **Conserving the wild relatives crops**. Roma: IBPGR, IUCN, WWF, 1988. 45p.

HUTCHISON, D.J.; O'BANNON, J.O. Evaluating the reaction of citrus selections to *Tylenchulus semipenetrans*. **Plant Disease Reporter**, v.56, p.747-751, 1972.

HWANG, S.C.; KO, W.H. Selecion of improved Cavendish banana mutants resistant to race - 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Acta Horticulturae**, n.275, p.417-423, 1990.

IBGE. Censo agropecuário. www:http:/www.sidra.ibge.gov.br/cgibin/prtaqbl. 1996.

INIBAP. **Global of the international Musa testing program**. La Lima: INIBAP, 1994. 303p.

JAMALUDDIN, S.H. Mutation Breeding of Banana in Malaysia. In: JONES D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa:** a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.228-232.

JOLY, A.B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Ed. Nacional, 1976. 777p.

KHAYAT, E.; DUVDEVANI, A.; SHCHUKIN, A.; LAHAV, E. Banana improvement program at Rahan meristem. **Acta Horticulturae**, n.490, p.71-78, 1998.

KILLIP, E.P. **The american species of Passifloraceae**. Chicago: Field Museum of Natural History, 1938. v.19, 613p. (Botanical Series)

KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OIYAMA, I.; ISHII, S. A somatic hybrid obtained by protoplast fusion between navel orange (*C. sinensis*) and satsuma mandarim (*C. unshiu*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.14, p.63-69, 1988.

KRIZEK, D.T.; FOY, C.D. Stress in diferential aluminium of two barley cultivar grown in an acid soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.11, p.351-364, 1988.

KUKIMURA, H.; IKEDA, F.; FUJITA, H.; MAETA, T.; NAKAJIMA, K.; KATAGIRI, K.; NAKAHIRA, K.; SOMEGON, M. Genetical, citological and physiological studies on the induced mutants with special regard to effective methods for obtaining useful mutants in perennial wood plants. In: FAO/IAEA. Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. **Improvement of vegetatively propagated plants and treecrops through induced mutations**. Viena: IAEA, 1976. p.93-137.

LASSOUDIÈRE, A. Le papayer: description et genétique. **Fruits**, v.23, p.585-596, 1968.

LEAL, F. Complementos a la clave para la identificación de las variedades comerciais de piña *Ananas comosus* (L.) Merril. **Revista de la Facultad de Agronomia**, v.1, p.1-12, 1990.

LEAL, F.; ANTONI, M.G. Espécies del género *Ananas*: origem y distribución geográfica. **Revista de la Facultad de Agronomia**, n.29, p.5-12, 1981.

LEAL, F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. Pinneaple. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Fruit breeding tree and tropical fruits**. New York: John Willey, 1996, v.1, cap.9, p.515-557.

LEAL, F.; GARCIA, M.L.; CABOT, C. Prospección y recolección de Ananas y sus congéneres en Venezuela. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.66, p.16-19, 1986.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C. **Botânica do maracujazeiro**. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1., Campinas, 1971. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974.

LICHTEMBERG, L. A. **Bananicultura nos subtrópicos**. Itajaí: Epagri; EEI, 1997 48p. (Relatório de Viagem).

LITZ, R.E. Papaya (*Carica papaya L.*). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agricultural and forestry trees**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.1,p.220-232.

LIU, C.S.; CHOW, H.T.; CHEN, C.Y. Isolation and culture of *papaya* protoplasts: studies on culture conditions and suplemented media. **Journal of the College of Science and Engineering**, v.31, p.89-98, 1984.

LOISON-CABOT, C. État das connaissances botanique, cytogénétiques et biologiques sur la reproduction de l'ananas. **Fruits**, v.45,p.347-355, 1990.

LUNA, J.V.U. Comportamento de variedades e seleções de mamoeiro (*Carica papaya* L.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., Rio de Janeiro, 1975. **Anais**. Campinas: SBF, 1976. v.2, p.525-533.

LUNA, J.V.U. **Instruções práticas para a cultura do mamoeiro**. Salvador: EPABA, 1980. 14p.

MAAS, J.L. Variation of several anthacnose fungi in virulence to strawberry and apple. **Plant Disease**, v.69, p.164-166, 1985.

MALUF, W.R.; SILVA, J.R.; GRATTAPAGLIA, D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; MACHADO, M.A.; CALDAS, L.S. Genetic gains via clonal selection in passion fruit *P. edulis* Sims. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.833-841, 1989.

MANICA, I. Maracujazeiro: Taxonomia, anatomia e morfologia. In: SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER, C. H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. (Ed.) **Maracujá:** temas selecionados:1. Melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 70p.

MANSHARDT, R.M.; WENSLAFF, T.F. Interespecific hybridization of papaya with other *Carica* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.114, p.689-694, 1989.

MARIN, S.L.D; GOMES, I.D.; ALVES, F. de L. **Introdução, avaliação e seleção do mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12 no Estado do Espírito Santo**. Vitória: EMCAPA, 1989. 9p. (Série Documentos).

MARIN, S.L.D; GOMES, J.A. Morfologia e biologia floral do mamoeiro. **Informe Agropecuário**, v.12, p.10-14, 1986.

MARINO NETTO, L. **Acerola**: a cereja tropical. São Paulo: Nobel, 1986. 91p.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUZA, L.A.C.; TEIXEIRA, J.B. In vitro selection for *Fusarium* wilt resistance in banana: II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f sp. cubense. **Fruits**, v.54, p.151-157, 1999.

MATSUMOTO, K.; OKA, S. Plant regeneration from protoplasts of Brazilian AAB group dessert banana. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BANANA IN THE SUBTROPICS, Puerto de la Cruz, 1997. **Abstracts**. Puerto de la Cruz : Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, 1997a. p.195.

MATSUMOTO, K; OKA, S. Studies of nurse culture methods on banana protoplast culture. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 6., Belém, 1997. **Resumos**. Belém: SBFV; FCAP, 1997b. p.154.

MATSUMOTO, K.; YAMAGUCHI, H. **Induction and selection of aluminium tolerance in the banana**. Viena: IAEA, 1991. p.249-255.

MATSUMOTO, K; HIRAO, C. Plant regeneration from suspension cultured cells of Brazilian AAB group banana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 5., Lavras, 1995. **Resumos**. Lavras: SBFV, UFLA, 1995. p.131.

MAY, G.D.; AFZA, R.; MASON, H.S.; WIECKO, A.; NOVAK, F. J.; ARNTZEN, C. J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*: mediated transformation. **Bio/ Technology**, v.3, p.486-492, 1995.

MEDINA, J.C; BLEINROTH, E.W.; SIGRIST, J.M.M.; DE MARTIN, Z.J.; NISIDA, A.L.A.C.; BALDINI, V.L.S.; LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. **Mamão: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2.ed. Campinas: ITAL, 1989. 367p.

MEDINA, V.M.; SILVA, S.O.; CERQUEIRA, R.C. Evaluación de las características de a maduracion pos cosecha de genotipos de banano. In: REUNIÓN DA ASOCIACIÓN PARA LA COOPERACIÓN EN INVESTIGACIONES DE BANANA EN EL CARIBE Y EN AMÉRICA TROPICAL (ACORBAT'98), 13., Guayaquil, 1998. **Memórias**. Guayaquil,1998. p.167-173.

MEDRADO, A.C. de M. Cultivo de sementes *versus* cultivo *in vitro* de embriões de citros (*Citrus* spp.): implicações na sobrevivência de híbridos. Cruz das Almas: EA/UFBA, 1998. 46p. Dissertação, Mestrado.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D. Callus formation from cultured protoplasts of banana (*Musa* sp.). **Plant Science**, v.85, p.91-98, 1992.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; TIZROUTINE, S.; BUI TRANG, V.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR D.; SCHWENDIMAN, J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). **Plant Cell Reports**, v.13, p.41-44, 1993.

METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Polígono; EDUSP, 1973. 262p.

MOORE, G.A.; LITZ, R.E. Biochemical markers for *Carica papaya*, *Carica cauliflora* and plants from somatic embryos of their hybrid. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.109, p.213-218, 1984.

MORAIS, L.S. Ajustes no meio de Murashige & Tucker (MT) para o cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Cleópatra'. Cruz das Almas: EA/UFBA, 1997. 95p. Dissertação, Mestrado.

MOREIRA, C. dos S. Freqüência de híbridos em citros (*Citrus* spp.) em função do grau de poliembrionia. Cruz das Almas: EA/UFBA, 1996. 78p. Dissertação, Mestrado.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requeriment of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1161.

NAKASONE, Y.H. A situação do vírus da mamão no Havaí. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 1., Jaboticabal, 1980. **Anais**. Jaboticabal: FCAV, UNESP, 1980. p.199-209.

NAKASONE, Y.H.; STOREY, W.B. Studies on the inheritance of fruiting height of Carica papaya L. **Proceedings of the American Society of Horticultural Science**, v.66, p.168-182, 1955.

NAKASONE, Y.H.; CROZIER JR., J.A.; IKEHARA, D.K. **Evaluation of 'Waimanalo', a new papaya strain**. Hawaii: Hawaii Agricultural Experiment Station, 1972. 12p. (Technical Bulletin, 79).

NASCIMENTO, A.S. do; SÁ, W.M.S.; SOGLIA, M.C.; BENTO, J.M.S.; OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W. dos S. **Entomofauna associada à cultura da acerola *(Malpighia punicifolia* L.) em Cruz das Almas, Bahia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1998. 3p. (Pesquisa em Andamento, 57).

NASCIMENTO, A.S. do; SÁ, W.M.S.; SOGLIA, M.C.; OLIVEIRA, J.R.P. **Insetos-praga associados à cultura da acerola**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. 6p.

NIEDENZU, F. Malpighiaceae. In: ENGLER, A. (Ed.) **Das Pflanzenreich**. Leipzig: Wihelm Engelmann, 1928. p.622-623.

NISHIURA, M. Natural mutation and its utilization in the selection of citrus fruits. **Gamma Field Symposia**, n.4, p.27-38, 1965.

NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M.; CONGER B.V.; TANG XIAOLANG, Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). **Bio/Technology**, v.7, p.154-159, 1989.

NYBOM, N.; KOCH, A. Induced mutations and breeding method in vegetatively propagated plants. In: FAO/ IAEA (Org.) **The used of induced mutations in plant breeding**. Dorking: Adlard & Son, 1965, p.671-678.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINOGA, K.; OIYAMA, I. Somatic hybridization in citrus: Navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and grapefruit ((*Citrus paradisi* Macf.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.609-612, 1989.

OLIVEIRA, A.M.G.; FARIAS, A.R.N.; SANTOS FILHO, H. P.; OLIVEIRA, J.R.P.; DANTAS, J.L.L.; SANTOS, L.B. dos; OLIVEIRA, M. das A.; SOUZA JR., M. T.; SILVA, M.J.; ALMEIDA, O.A. de; NICKEL, O.; MEDINA, V.M.; CORDEIRO, Z.J.M. **Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 52p. (FRUPEX. Série Publicações Técnicas, 9).

OLIVEIRA, J.C. de; FERREIRA, F.R.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K. Caracterização e avaliação de germoplasma de Passifloracea quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FRUTICULTURA, 9., Campinas, 1987. **Anais**. Campinas: SBF, 1987. p.591-596.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Maracujá**: do plantio à colheita. Jaboticabal: FUNEP, 1999. 388p.

OLIVEIRA, J.B. Solos para citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.196-227.

OLIVEIRA, J.C. de. Melhoramento genético de *Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg. visando aumento de produtividade. Jaboticabal: UNESP, 1980. 133p. Tese, Livre-Docência.

OLIVEIRA, J.C. de.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ A.R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Vitória da Conquista: UESB, 1991. p.211-239.

OLIVEIRA, J.C. de; CARNIER, P.E.; ASSIS, G.M. de. Preservação de germoplasma de maracujazeiros. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. **Anais**. Jaboticabal: FCAVJ, UNESP, 1988. p.200.

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W. dos S. Acerola: conservação, caracterização e seleção de germoplasma pelo CNPMF-EMBRAPA. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, R.E. (Ed.) **Acerola no Brasil**, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1995. p.22-27.

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W. dos S. **Guia de descritores de acerola**: versão preliminar. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1998a. 22p. (Documentos, 84).

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W. dos S. Guia de descritores para acerola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., Salvador, 1994. **Resumos**. Salvador: SBF, 1994. v.1, p.91-92.

OLIVEIRA, R.P. de; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, E.P. de; NICKEL, O.; VILARINHOS, A.D.; MORALES, C.F.G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L; MORALES, C.F.G. (Ed.) **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EA; UFBA; EMBRAPA, CNPMF, 1996. p.159-172.

ORTIZ MARCIDE, J.M. Nomenclatura botanica de los citricos. **Levante Agricola**, n.259/260, p.71, 1985.

PANIS, B.; COTE, F.; ESCALANT, J.V.; SAGI. Aspects of Genetic Engineering in Banana. In: FRISON, E.A.; HORRY, J.P.; WAELE, D. de. **New frontiers in resistance breeding for nematode fusarium and sigatoka**. Montpellier: IPGRI; CIRAD; MARDI; INIBAP, 1995. p.182-183.

PASSOS, O.S.; ROCHA, A.F.M.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Variedades cítricas no Nordeste brasileiro: novas alternativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.103-112, 1997.

PATERNIANI, E. Avaliação do método de seleção entre e dentro de famílias de meios irmãos no melhoramento do milho (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1968. 92p. Tese, Professor Catedrático.

PATERNIANI, E. II. Melhoramento genético de populações de milho. In: KERR, W.E. **Melhoramento e genética**. São Paulo: Companhia Melhoramentos, 1969. p.39-59.

PEGG, K.G.; LANGDON, P.W. **Banana and plantains breeding strategies**: *Fusarium* wilt (Panama disease). Cairns: ACIAR, 1986. p.31-35

PEREA, D. M.; CONSTABEL, C. Estratégias para el mejoramiento de bananos e platanos. **Augura**, v.19, p.40-47, 1996.

PÉREZ PONCE J.; ORELLANA, P. Musa improvement in Cuba In: JONES D.R. (Ed) **The improvement and testing of Musa**: a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.203-206.

PINTO, A.C.Q.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RAMOS, V.H.V. Melhoramento da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., Jaboticabal, 1997. **Anais**. Jaboticabal: FCAVJ, UNESP, 1997. p.65-66.

PINTO, I. de S. Tolerância ao alumínio de cinco porta-enxertos de citros (*Citrus* spp.) cultivados em solução nutritiva. Cruz das Almas: EA; UFBA, 1999. 65p. Dissertação, Mestrado.

POEHLMAN, J.M. **Breeding field crops**. New York: Holt, 1966. 427p.

PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. **L'ananas**: sa culture, ses produits. Paris: Maisonneuve et Larose, 1984. 562p.

RAGHUVANSHI, S.S. Cytological evidence bearing on evolution in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.1, p.207-214.

REECE, P.C. Classification of *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.1, p.429-434.

REITZ, R. (Ed.) **Flora ilustrada catarinense**: Passifloraceaes. Itajaí: Herbário Barbosa Rodriguez, 1980. 130p.

ROCA, W.M.; RODRIGUEZ, J.; BELTRAN, J.; ROA, J. MAFLA, G. Tissue culture for the conservation and international exchange of germplasm. In: FUJIWARA, A. (Ed.) **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.771-772.

ROUX, N.; AFZA, R.; BRUNNER, H.; MORBURGO, R.; VAN DUREN, M. Complementary approaches to cross-breeding and mutation breeding for *Musa* improvement. In: JONES, D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa**: a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.213-218.

RUGGIERO, C. Estudos sobre a floração e polinização do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* S. *flavicarpa* Deg.). Jaboticabal: FCAV/ UNESP, 1973. 92p. Tese, Doutorado.

SADI, L.; PANIS, B.; REMY, S.; SCHOOFS, H.; DE SMET, K.; SWENNEN, R.; CAMMUE, B.P.A. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. **Bio/Technology**, v.13, p.481-485, 1995.

SADI, L.; REMY, S.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; VOLCKAERT, G. Trensient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv.Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenetic cell suspensions. **Plant Cell Reports**, v.13, p.262-266, 1994.

SAMPAIO, H.S. de V.; LUNA, J.V.U.; SAMPAIO, L.S. de V. Comportamento de linhas endógamas de mamão (*Carica papaya* L.) e seus híbridos, em solo infestado com *Phytophthora* sp. **Magistra**, Cruz das Almas, v.1, p.36-45, 1983.

SANTOS, K.G.B.; GUERRA, M.; SOARES FILHO, W. dos S. Padrão de bandas cromossômicas obtido com o fluorocromo CMA em três espécies de tangerinas. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 9., Teresina, 1993. **Anais**. Teresina: UFPI; UEPI; EMBRAPA; SBG - Regionais do Nordeste, 1993. p.167.

SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; DUARTE FILHO, J.O.; LEITE, M.J.N. Formação de mudas de maracujazeiros. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p.41-44.

SHARMA, N.K. SKIDMORE, D.I. *In vitro* expression of partial resistance to *Phytophthora palmivora* by shoot cultures of *papaya*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.187-196, 1988.

SHEPHERD, K. History and methods of banana breeding In: CGIAR. External program and management review of the international network for the improvement of banana and plantain; first report. Washington: CGIAR Secretariat; The World Bank, 1992. p.108-110.

SHEPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1., Jaboticabal, 1984. **Anais**. Jaboticabal: FCAVJ UNESP, 1984. p.50-74

SHEPHERD, K. Observations on *Musa* taxonomy. In: IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA, Los Baños, 1988. **Proceedings**. Montpellier: INIBAP, 1990. p.158-165.

SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; FERREIRA, R. Classificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Banana (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., Florianópolis, 1983. **Anais**. Florianópolis: SBF; EMPASC, 1984. p.213-219.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, v.12, p.11-19, 1986.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SILVA, S. de O. e. Breeding Prata and Maçã for Brazil. In: GLOBAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL MUSA TESTING PROGRAM, San Pedro Sula, 1994. **Proceedings**. Montpellier: INIBAP, 1994. p.157-168.

SIHACHAKR, D.; DUCREUX, G. Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed) **Plant protoplasts and genetic engineering IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.43-59.

SILVA, S. de O. e; SHEPHERD, K. Análise do germoplasma de banana do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical - CNPMF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, p.115-127, 1991.

SILVA, S. de O. e; MATOS, A. P.; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33,p.693-703, 1998a.

SILVA, S. de O. e; BORGES, A. L.; LIMA, G. J.; LIMA, R. J.; OLIVEIRA, R. C. N. Produccion de racimos e contenidos de nutrientes en frutos de genotipos de bananera. In: REUNIÓN DA ASOCIACIÓN PARA LA COOPERACIÓN EN INVESTIGACIONES DE BANANA EN EL CARIBE Y EN AMÉRICA TROPICAL -ACORBAT' 98, 13., Guayaquil,1998. **Memórias**. Guayaquil, 1998c. p.179-192.

SILVA, S. de O. e; LIMA, R. J.; FADIGAS, F. S.; LIMA, R. S.; MATSUURA, F.C.A.U.; OLIVEIRA, R.C.N. Teor de vitamina C e produção de frutos em cultivares e híbridos promissores de bananeira In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., Poços de Caldas, 1998. **Resumos**. Poços de Caldas: UFLA; SBF, 1998b. p.143.

SILVA, S. de O. e; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A. da S.; CARNEIRO, M.S. Germoplasma de banana. In: ALVES, E.J. (Ed.) **A cultura da banana:** aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA , SPI, 1997. p.61-84.

SILVA, S. de O. e; CARVALHO, P.C.L.; ALVES, E.J.; CARVALHO, J.A.B.S.; OLIVEIRA, C.A.P.; SHEPHERD, K. **Catálogo de germoplasma de banana.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. 200p. /No Prelo/

SILVA, S. de O. e; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J.; BORGES, A.L.; FANCELLI, M.; OLIVEIRA, S.L. de; ALMEIDA, M. de A. **Avanços do programa de pesquisa em *Musa* no CNPMF, Embrapa, Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa, CNPMF, 1996. 37p. (Documentos, 65).

SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 2.ed. London: Longmans, 1966. 512p.

SIMMONDS, N.W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 1973. 539p.

SIMMONDS, N.W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The Journal of the Linean Society of London**, v.55, p.302-12, 1955.

SMITH, M.K.; DREW, R. A. Current aplications of tissue culture in plant propagation and improvement. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.267-289, 1990.

SMITH, M.K.; HAMIL, S.D.; LANGRTON, P. W.; PEGG, K.G. Mutation Breeding for Banana Improvement in Australia. In: JONES D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa:** a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.233-241.

SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; LEE, L.M. Influence of pollinators on fruit set in citrus. **Acta Horticulturae**, n.403, p.39-46, 1995a.

SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, L.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Influence of pollinators on polyembryony in citrus. **Acta Horticulturae**, n.403, p.256-265, 1995b.

SOARES FILHO, W. dos S.; MORAIS, L.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; DIAMANTINO, M.S.A.S.; PASSOS, O.S. 'Santa Cruz': uma nova seleção de limão 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.21, p.222-225, 1999.

SOARES FILHO, W. dos S.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A. da S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; ARAUJO, E.F. de. Influência dos tegumentos externo e interno na germinação de sementes de citros: implicações na sobrevivência de *seedlings* híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.91-101, 1995c.

SOARES FILHO, W. dos S.; VASQUEZ ARAUJO, J.E.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., Acireale, 1992. **Proceedings**. Catania: International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.135-138.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.

SOOST, R.K.; ROOSE, M.L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Fruit breeding**; tree and tropical fruits. New York: John Wiley, 1996. v.1, cap.6, p.257-323.

SOUTO, G.F.; MATOS, A.P. de. Métodos para avaliar resistência a *Fusarium subglutinans* em abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.23-30, 1978.

SOUZA JR., M.T.; SOARES FILHO, W. dos S.; SILVA, R.P. Identificação de *seedlings* zigóticos de citros mediante o emprego do sistema enzimático glutamato-oxaloacetato-transaminase (E.C.2.3.1.1.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p.57-65, 1993.

SPURLING, M.B. Citrus in the Pacific area. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.1, p.93-101.

SRIPRASERTSAK, P.; BURIKAM, S.; ATTATHOM, S.; PIRIYASURAWANG, S. Determination of cultivar and sex of papaya tissues derived from tissue culture. **Natural Sciences**, v.22, p.24-29, 1988.

STEBBINS, G.L. The effect of asexual reproduction on higher plant genera with special reference to *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.1, p.455-458.

STOREY, W.B. Genetics of papaya. **Journal of Heredity**, v.44, p.70-78, 1953.

SWANSON, C.P. **Cytology and cytogenetics**. New Jersey: Prentice-Hall, 1957. 596p.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.) **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v.1, cap.3, p.190-430.

TAKHTAJAN, A. L. Phylogenetic principles of the system of higher plants. **Botanical Review**, v.59, n.1, p.1-145, 1953.

TANG, C.Y; HWAN, S.C. *Musa* Mutation Breeding. In: In: JONES D.R. (Ed.) **The improvement and testing of Musa:** a global workshop. Montpellier: INIBAP, 1994. p.219-227.

TEZENAS DU MONTCEL, H. Musa acuminata subspecie *banksii* status and diversity. In: WORKSHOP ON IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA, Montpellier, 1988. **Proceedings**. Montpellier: INIBAP, 1988. p.12.

TOYODA, H.; SHIMIZU, K.; CHATANI, K.; KITA, N.; MATSUDA, Y.; OUCHI,S. Selection of bacterial wilt- resistant tomato through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.8, p.317-320, 1989.

TSAY, H.S.; SU, C.Y. Anther culture of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, v.4, p.28- 30, 1985.

TUJILLO, I: GARCIA, E. Strategies for breeding somaclonal variants resistant to yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*). **Infomusa**, v.5, p.12-13, 1996.

TULMANN-NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Indução e uso de mutação "in vitro" In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.341-378.

TUSA, N.; GROSSER, J.G.; GMITTER Jr., F.G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society of Science**, v.115, p.1043-1046, 1990.

UENO, I.; HIRAI, M. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds by cotiledon colour. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station**, v.10, p.35-49, 1983.

VALMAYOR, R.V.; SILAYOI, B.; JAMALUDDIN, S.H.; KUSUMO, S.; ESPINO, R.R..C.; PASCUA, D.C. **Banana classification and comercial cultivars in Southest Asia**. Los Baños: PCARRD, 1991. 20p. (Information Bulletin, 24).

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 1996. 224p.

VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of *Citrus* protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Plant protoplasts and genetic engineering I**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.147-159.

VÁSQUEZ ARAUJO, J.E. Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus* spp.) mediante características morfológicas. Cruz das Almas: EA/UFBA, 1991. 74p. Dissertação, Mestrado.

VÁSQUEZ ARAUJO, J.E.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S.; SOUZA, A. da S. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds: the use of cotyledon colours. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., Acireale, 1992. **Proceedings**. Catania: International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.142-144.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Integrated manegement system for pineapple Fusarium disease control. **Acta Horticulturae**, n.334, p.439-454, 1993

WAKASA, K. Variation in the plants differentiated from tissue culture of pineapple. **Japanese Journal of Breeding**, v.29, p.13-22, 1979.

WALTON, J. D.; EARLE, E. D. **Isolation and bioassay of fungal phytotoxins**. In: VASIL, I.K. (Ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.598-605.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.) **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1, p.1-39.

WITHERS, L.A. Early detection of somaclonal variation. In: WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS FOR BANANA AND PLANTAIN IMPROVEMENT, San José, 1992. **Proceedings**. San José, 1992. p.200-208.

WRIGHT, J.W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press, 1976. 463p.

YE, K.N.; HUANG, J.C.; LI, B.J.; YOU, C.B.; CHEN, Z.L.; DING, Y. Hybrid papaya artificial seed production for experimental field. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v.15, p.411-413, 1993.

YELENOSKY, G.; BROWN, R.T.; HEARN, C.J. Tolerance of trifoliata orange selection and hybrids to freezes and flooding. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.86, p.99-104, 1974.

ZUBA, M.; BINDING, H. Isolation and culture of potato protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Plant protoplasts and genetic engineering I**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.124-146.

18

MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS TROPICAIS

ANTÔNIO VANDER PEREIRA[1]
CACILDA BORGES DO VALLE[2]
REINALDO DE PAULA FERREIRA[1]
JOHN W. MILES[3]

[1]Embrapa Gado de Leite, R. Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco - CEP: 36038-330 - Juiz de Fora, MG.
[2]Embrapa Gado de Corte, C.P. 154 - CEP: 79002-970 - Campo Grande, MS.
[3]Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT - Cali ,Colômbia.

1. INTRODUÇÃO

O homem vem selecionando plantas, mesmo inconscientemente, por milhares de anos. Entre as mais prováveis causas que o levaram a iniciar a agricultura, estão a possibilidade de "fixar residência" e a domesticação de animais, o que se estima tenha iniciado há 10.000 anos. Entre as primeiras espécies cultivadas encontram-se as gramíneas que serviam de alimento, tanto aos homens quanto aos animais. Diversos estudos têm demonstrado que os cereais, como o trigo e a cevada, encontram-se entre as primeiras plantas cultivadas pelo homem. Existem registros comprovando que as plantas forrageiras, especialmente a alfafa, já eram cultivadas na agricultura primitiva, há mais de 3.300 anos (Bolton *et al.*,1972). Os efeitos da domesticação são facilmente perceptíveis em gramíneas, como trigo e milho, e em leguminosas, como ervilha e alfafa. Entretanto, as cultivares forrageiras atuais, na maioria, são fenotipicamente muito semelhantes aos tipos selvagens, denotando muito pouca domesticação. Este fato é especialmente verdade entre as forrageiras tropicais, cujo processo de seleção e melhoramento ainda é incipiente.

O crescimento populacional associado ao desenvolvimento de novas tecnologias vêm promovendo mudanças rápidas na sociedade com profundos impactos sobre a agropecuária. As cadeias produtivas e segmentos agrícolas que não incorporarem técnicas modernas e uma visão de mercado, a fim de tornarem-se mais eficientes, efetivas e sustentáveis provavelmente não persistirão.

O cenário que se vislumbra na agropecuária moderna diante das pressões de natureza ecológica, fundiária e mercadológica, é de utilização sustentável dos recursos naturais (solo, vegetação, clima), com otimização dos insumos e retornos financeiros. Neste contexto, as pastagens, que sempre foram relegadas a um plano secundário e normalmente ocupando solos de menor fertilidade, vêm merecendo crescente interesse e competindo com a agricultura por insumos e tecnologias. A intensificação da atividade pressupõe o desenvolvimento de cultivares de forrageiras com melhor desempenho e eficiência na utilização dos insumos. Aqui abrem-se os espaços para variedades melhoradas e adaptadas aos diversos ecossistemas pastoris do País.

Falta uma melhor avaliação do papel desempenhado pela forrageiras na produção de alimentos e na manutenção do equilíbrio ambiental. A maioria dos consumidores urbanos não consegue perceber a importância das forrageiras na sustentação da produção de alimentos e artigos de consumo diário, como leite, carne, lã e couro. Deve-se considerar também que a área verde coberta com forrageiras contribui significativamente para a produção de oxigênio e para a proteção dos ambientes naturais contra a erosão.

2. EVOLUÇÃO DE PLANTAS FORRAGEIRAS

As forrageiras, tal qual a conhecemos atualmente, resultaram do processo de evolução conjunta entre plantas (gramíneas, leguminosas) e animais herbívoros. Desde

milhares de anos o continente africano abrigava numerosa quantidade de ruminantes de grande porte, pertencentes à família Bovidae, que se alimentavam, principalmente, das gramíneas nativas. O mesmo tipo de interação foi responsável pela evolução de inúmeras forrageiras temperadas no Hemisfério Norte. Entretanto, a América tropical, embora apresentasse uma grande riqueza em espécies de gramíneas, apresentava muito poucas espécies de animais herbívoros (Walton, 1983). Isto explica, em parte, porque a maioria das gramíneas tropicais, utilizadas como forrageiras, apresenta como centro de origem e diversificação o continente africano.

A pressão de seleção sobre as plantas consumidas sob pastejo contribuiu, de forma decisiva, para sua evolução como planta forrageira. Este processo de coevolução entre animais e plantas foi responsável pela seleção de características forrageiras importantes, como o perfilhamento e a persistência da planta sob ação do pastejo.

Os centros de diversidade das espécies forrageiras constituem sítios em que as plantas vêm evoluindo há mais de 20 milhões de anos. É neles que aparecem e são selecionadas características que apresentam vantagens adaptativas e reprodutivas. Entre os mecanismos reprodutivos sexuais e assexuais em forrageiras tropicais, predominam a apomixia e a propagação vegetativa. Estas estratégias, presentes em espécies cultivadas, como *Brachiaria, Panicum e Pennisetum*, possibilitaram a seleção e "fixação" de determinados genótipos superiores e constituem, atualmente, a maioria das variedades forrageiras cultivadas. Entretanto, outros gêneros importantes, como *Andropogon* e mesmo algumas espécies dos três gêneros citados, como *Brachiaria ruziziensis*, reproduzem-se por via sexual normal.

No continente americano estão localizados os centros de origem e diversidade da maioria das leguminosas tropicais. Aqui encontramos gêneros, como *Stylosanthes*, *Calopogonium* e *Leucaena*, de grande interesse para a pecuária, por contribuírem para uma dieta de melhor valor nutritivo.

3. PRINCIPAIS GRUPOS DE PLANTAS FORRAGEIRAS

Plantas forrageiras ou *forragens* podem ser definidas como plantas inteiras ou partes destas que servem de alimento aos animais domésticos e silvestres. Assim, as forragens são as partes comestíveis das plantas utilizadas como alimento pelos animais em pastejo ou, ainda, colhidas para arraçoamento em estádio fresco ou conservado. Existem diferentes tipos de forragens, como folhas e caules das plantas herbáceas, raízes e tubérculos, cascas de sementes, folhas, brotos e cascas de arbustos, árvores e cactos, restos e rebrota de cultura, frutos e sementes. Portanto, milhares de espécies de plantas podem ser consideradas forrageiras ou produzir alimento para os animais. No entanto, no contexto deste capítulo, apenas algumas plantas destinadas exclusivamente à alimentação animal serão consideradas.

As principais espécies que apresentam potencial forrageiro são encontradas dentro de duas famílias: Gramineae e Leguminosae.

3.1 GRAMÍNEAS

Existem cerca de 10.000 espécies de plantas conhecidas, sendo as gramíneas, orquídeas e compostas as famílias mais numerosas. À família Gramineae ou Poaceae pertencem 75% das espécies de plantas forrageiras. Gramíneas são plantas

monocotiledôneas que apresentam como características básicas: porte herbáceo, ausência de tecido lenhoso, capacidade de produção de sementes, presença de nós nos caules e folhas com bainhas. Entre as gramíneas encontram-se importantes produtoras de grãos (milho, trigo, arroz), combustíveis (cana-de-açúcar), forragem para animais (*Brachiaria, Panicum*), materiais de construção, remédios etc.

Há espécies de gramíneas adaptadas às mais diferentes condições de ambientes. Estima-se que, aproximadamente, 2/3 da massa vegetal que recobre a superfície terrestre é composta por gramíneas de diversos tipos. Em razão desta capacidade de adaptação, tem sido possível introduzir espécies de gramíneas em novas áreas de cultivo, muitas vezes, diferentes do habitat da espécie.

A maioria das gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil é composta por espécies de origem africana, tais como *Brachiaria, Panicum, Pennisetum, Andropogon, Setaria, Cynodon* e *Cenchrus*. Algumas espécies introduzidas desde a época do descobrimento do Brasil e por apresentarem excelente adaptação às condições ambientais brasileiras têm sido consideradas "espécies naturalizadas", como o capim-gordura (*Melinis minutiflora*) e o capim jaraguá (*Hyparrhenia rufa*). Um importante gênero de gramíneas forrageiras nativo da América do Sul e que engloba um grande número de espécies com bom valor forrageiro é *Paspalum*. Suas espécies ocorrem em praticamente todas as comunidades herbáceas brasileiras, com adaptação desde o subtrópico da Argentina e Uruguai até as regiões sob a linha do Equador.

As gramíneas são classificadas em duas categorias quanto a sua adaptação ambiental e eficiência fotossintética: espécies temperadas (plantas C_3) e tropicais (plantas C_4). Normalmente, as espécies forrageiras temperadas apresentam melhor qualidade, definida em termos de digestibilidade, consumo e teor de proteína. A degradação ruminal das gramíneas C_3 ocorre mais rapidamente por apresentarem parede celular mais fina e com menor teor de compostos indigeríveis, como a lignina, do que as do tipo C_4. Por outro lado, as gramíneas tropicais (C_4) apresentam maior eficiência fotossintética, sendo, portanto, mais produtivas em termos de matéria seca.

Importante, no entanto, é ressaltar a grande diferença entre estágios de desenvolvimento do melhoramento de forrageiras temperadas e tropicais: enquanto nas primeiras já se explorou a variabilidade natural e utilizam-se rotineiramente sofisticadas metodologias como marcadores moleculares e melhoramento assistido para características quantitativas (QTL's), o melhoramento das espécies tropicais consiste muitas vezes apenas na seleção a partir da variabilidade natural em coleções restritas e ainda pouco estudadas.

3.2 LEGUMINOSAS

As leguminosas constituem o segundo mais importante grupo de plantas forrageiras. A família Leguminosae é caracterizada por apresentar plantas dicotiledôneas, produzir sementes em vagens e pela capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com bactérias ou outros microrganismos. Embora as gramíneas desempenhem um papel mais expressivo na alimentação humana e dos animais, as leguminosas, geralmente, produzem alimentos com melhor qualidade. Espécies leguminosas, como a alfafa e trevos, são conhecidas pela alta qualidade e capacidade de produção. As leguminosas forrageiras também são reconhecidas pela capacidade de conservar o valor nutritivo por período de tempo superior às gramíneas.

As leguminosas forrageiras podem ser consumidas diretamente pelos animais, sob pastejo, em consórcio ou em bancos de proteína (legumineira), ou, ainda, em forma processada (picada verde ou como forragem conservada – feno e silagem). Em todas as situações as leguminosas são utilizadas para promover uma melhoria na qualidade da alimentação animal e, conseqüentemente, aumentar a produtividade. As leguminosas também são cultivadas com o objetivo de melhorar a fertilidade do solo, em função da sua capacidade de fixar nitrogênio.

Tal como as gramíneas, as leguminosas forrageiras são divididas em duas categorias: espécies temperadas e tropicais. Entre as leguminosas temperadas, destacam-se a alfafa (*Medicago sativa*), o trevo branco (*Trifolium repens*) e vermelho (*T. pratense*) e o cornichão (*Lotus corniculatus*) e, entre as tropicais, o estilosantes (*Stylosanthes guianensis*), a leucena (*Leucaena leucocephala*) e o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*).

Stylosanthes guianensis e Arachis pintoi estão entre as espécies leguminosas nativas do Brasil com maior potencial para melhoramento (Valls *et al.*, 1994). A coleta e avaliação de germoplasma dessas duas espécies têm identificado ecótipos com elevada aptidão para uso em sistemas de cultivo exclusivo e consorciado.

O *Arachis pintoi* é uma leguminosa com ampla diversidade e distribuição por diversas regiões do Brasil sendo considerada como uma das espécies recomendadas, tanto para uso em sistemas de consórcio, como para cobertura vegetal em frutíferas (Valls & Simpson, 1994). Uma grande coleção de *Arachis* foi reunida pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen – com base em coletas realizadas em diversas regiões brasileiras (Valls & Pizarro, 1994). Este germoplasma tem sido avaliado e empregado em alguns programas de melhoramento no Brasil e no exterior.

4. O MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS NO BRASIL

O melhoramento genético das plantas forrageiras, principalmente das espécies tropicais, ainda não atingiu o mesmo estágio de desenvolvimento obtido pelos cereais. Por isso, espera-se que o melhoramento possa promover significativos avanços no aumento da produtividade da pecuária, realizando o mesmo papel fundamental desempenhado para as culturas de grãos. No caso do melhoramento de plantas forrageiras, é necessário considerar a complexa relação solo-planta-animal. Dessa forma, o objetivo do melhoramento não se restringe em obter uma planta mais produtiva, mas em conseguir maior eficiência na transformação da mesma em produção animal.

O melhoramento de forrageiras tem recebido maior atenção nos países desenvolvidos, o que significa dizer que as espécies temperadas encontram-se em um estágio mais avançado de melhoramento em relação às tropicais. O melhoramento de algumas espécies, como a alfafa, já alcançou o mesmo nível de importância atribuído a culturas como o milho e o trigo. Grande parte dos programas de melhoramento genético de forrageiras importantes, como a alfafa e o *Cynodon*, vem sendo conduzido por empresas privadas. Estas empresas têm conseguido obter lucros por meio da comercialização de sementes e recebimento de *royalties*, o que demonstra o elevado potencial econômico da atividade de melhoramento.

O número de espécies tropicais que apresentam aptidão forrageira, bem como a variabilidade genética encontrada nas populações naturais dessas plantas, é considerado muito elevado. Paim (1977) destaca que o estoque de conhecimentos básicos sobre a maioria das espécies tropicais é muito baixo por falta de levantamentos e estudos detalhados de botânica, taxonomia, genética, situação que foi pouco modificada nos últimos anos. Também o processo de coleta e caracterização de germoplasma necessita ser mais estimulado.

O Brasil possui extensas áreas ocupadas por diferentes formações campestres. A pecuária nacional explora uma área de 180 milhões de hectares, sendo, aproximadamente, 105 milhões de hectares de pastagens cobertas com vegetação natural e 75 milhões de hectares com forrageiras cultivadas, os quais alimentam um rebanho de cerca de 150 milhões de bovinos (IBGE, 1996). Nas áreas de pastagens não cultivadas prevalecem as forrageiras nativas e as "naturalizadas" que não sofreram nenhum processo de melhoramento, e que, por conseguinte, apresentam baixa capacidade de suporte e qualidade muito variável de acordo com a época do ano.

Apesar da existência de grande número de espécies nativas apresentando potencial forrageiro, a maioria das forrageiras cultivadas, no Brasil, é constituída por espécies exóticas. Algumas das espécies introduzidas, como as braquiárias, o colonião, o capim-gordura, o andropógon e a grama-bermuda, dominam a paisagem das pastagens cultivadas.

Até recentemente, a introdução tem sido o principal método de melhoramento utilizado para forrageiras, no Brasil. Para muitas espécies nativas e exóticas, este processo continua válido e deverá ser responsável pela obtenção de cultivares superiores e pela ampliação da variabilidade do germoplasma disponível. Este método, apesar de simples e rápido, tende a se esgotar, visto que se baseia apenas na avaliação da capacidade adaptativa de materiais coletados na natureza ou obtidos por programas de melhoramento desenvolvidos no exterior. Deve-se considerar que vem ocorrendo uma acelerada destruição dos habitats das plantas forrageiras, com conseqüente perda de variabilidade natural. Outros problemas, como as restrições ao livre acesso ao germoplasma e as leis de proteção de cultivares, bem como o surgimento de novos desafios agronômicos indicam que o melhoramento de forrageiras via recombinação genética constitui uma oportunidade que deve ser mais intensamente explorada.

No Brasil, a partir da década de 80, em decorrência do processo de intensificação da produção pecuária, foram iniciados os primeiros programas de melhoramento. Os principais programas de melhoramento de forrageiras em andamento são: capim-elefante (Embrapa Gado de Leite e Instituto Pernambucano de Agropecuária), alfafa (Embrapa Gado de Leite e Universidade Federal do Rio Grande do Sul), *Brachiaria* e *Panicum* (Embrapa Gado de Corte) e *Paspalum* (Embrapa Sudeste).

Para espécies temperadas, que são cultivadas apenas no sul do País, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é a obtenção de cultivares adaptadas às condições brasileiras. Assim, o processo de melhoramento, além da introdução de germoplasma silvestre e melhorado, pode exigir a realização de cruzamentos com a utilização de métodos mais complexos, como a seleção com base em testes de progênie (estimativa do valor genotípico).

No Brasil, os principais problemas enfrentados para condução de programas de melhoramento das plantas forrageiras estão relacionados com a carência de recursos e com o pequeno número de profissionais envolvidos no processo. No caso das forrageiras, em especial, as dificuldades tendem a ser maiores pela própria natureza dos programas que são de longa duração e custo elevado, por envolver extensas áreas e avaliações com animais. Entretanto, deve-se entender que o melhoramento de forrageira constitui uma forte demanda nacional e que o ofício de melhorista constitui uma excelente oportunidade para jovens cientistas que se interessem pelo desenvolvimento da pecuária brasileira.

5. PRÉ-REQUISITOS PARA O MELHORAMENTO

O trabalho de melhoramento constitui uma ferramenta útil no sentido de poder obter cultivares superiores, a partir da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma forrageiro. Entretanto, alguns pré-requisitos necessitam ser considerados visando atingir este objetivo.

a)Diversidade disponível : Seleção *vs.* Melhoramento

A produção animal nos trópicos depende basicamente de pastagens, sejam estas nativas ou cultivadas. As poucas cultivares disponíveis são, na maioria das vezes, nada mais que ecótipos naturais, sendo alguns introduzidos até acidentalmente, avaliados e depois multiplicados para comercialização.

Cameron (1983) questionou a necessidade de investimento no melhoramento de forrageiras enquanto a variabilidade natural não estiver completamente explorada. Recomendou, como Harlan (1983), a avaliação de coleções de germoplasma representativas da variabilidade natural antes de iniciar programas efetivos de melhoramento genético. Muito importante, portanto, é selecionar os genótipos superiores no germoplasma disponível e, neste estudo, determinar as limitações que poderiam ser abordadas nos programas de melhoramento.

Levantamentos sobre espécies estreitamente relacionadas também são relevantes, principalmente nos casos em que é necessário realizar cruzamentos interespecíficos ou selecionar genitores compatíveis para a transferência de características não encontradas dentro do germoplasma da espécie cultivada.

Considerando os diversos Bancos de Germoplasma implantados no Brasil e no exterior, a situação de conservação do germoplasma de algumas forrageiras tropicais, como *Panicum maximum*, *Brachiaria*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Stylosanthes*, *Leucaena* e *Arachis*, encontra-se em situação bastante favorável; entretanto, outras importantes espécies, como *Andropogon*, *Urochloa*, *Melinis* e *Hyparrhenia*, ainda carecem de um esforço de coleta e avaliação.

b) Conhecimentos básicos

Um segundo pré-requisito em programas de melhoramento são conhecimentos da biologia floral, modo de reprodução, níveis e comportamento cromossômico do germoplasma disponível (Asker & Jerling, 1992). Muitas das gramíneas forrageiras tropicais se reproduzem por apomixia – produção de sementes sem que ocorra a fecundação do embrião – dando origem a progênies cópias exatas da planta-mãe.

Diversos autores têm demonstrado que em plantas forrageiras ocorre uma elevada correlação entre a apomixia e poliploidia. Normalmente as espécies apomíticas apresentam um elevado nível de ploidia enquanto plantas sexuais são diplóides ou tetraplóides (De Wet & Harlan, 1970; Quarin & Normann, 1987; Valle *et al.*, 1989; Valle, 1990; Asker & Jerling, 1992). Em função da barreira que a apomixia representava à recombinação, melhoristas até pouco tempo não possuíam meios de transpor o isolamento reprodutivo dessas espécies. Com o avanço nas técnicas de detecção e estudo mais detalhado em coleções mais amplas de forrageiras, fontes compatíveis de sexualidade puderam ser encontradas e, finalmente, a hibridização foi possível.

A estrutura reprodutiva das principais leguminosas tropicais é ainda pouco conhecida e, apesar da predominância de autogamia, estudos recentes realizados por Maass & Torres (1998) mostraram taxas significativas de fecundação cruzada para algumas espécies de *Centrosema*, *Chamaecrista* e *Desmodium*.

A herdabilidade de características forrageiras importantes são também em geral desconhecidas. Estudos sobre a determinação da base genética da apomixia em várias espécies indicaram uma herança simples, com a apomixia geralmente dominante sobre a sexualidade: *Bothriochloa-Dicanthium* (Harlan *et al.*, 1964); *Panicum maximum* (Savidan, 1982b); *Cenchrus* (Sherwood *et al.*, 1994); *Paspalum* (Burton & Forbes, 1960); *Brachiaria* (Ndikumana, 1985; Valle & Savidan, 1996).

c) Estabelecimento de objetivos

O melhoramento pressupõe a necessidade de modificar uma variedade, cujas deficiências e qualidades são conhecidas, e tem como objetivo aumento de produtividade, melhoria de qualidade e adaptação ambiental. A existência de informações sobre a variabilidade e disponibilidade do germoplasma, demanda dos produtores, sistemas de utilização, potencial produtivo, qualidade da forrageira e capacidade de adaptação ambiental facilitam o estabelecimento dos objetivos de um programa de melhoramento. A definição de objetivos claros e factíveis é repetidamente mencionada na literatura como a limitação mais crítica para o sucesso de um programa de melhoramento de forrageiras (Porzecanski, 1981; Clements, 1989; Cameron, 1983; Miles *et al.*, 1990).

Em estudos preliminares, quando ainda não se definiu que planta forrageira será utilizada, os objetivos, aparentemente simples, devem ser identificar gêneros ou espécies que apresentem características básicas, como persistência e produção de maior volume e qualidade de forragem do que a vegetação nativa nas condições de solo, clima e pressões bióticas predominantes. Apesar de óbvios, determinar quais atributos específicos da planta resultam nestes objetivos pode ser bastante complicado.

Onde já existem cultivares comerciais amplamente utilizadas, normalmente as deficiências já são conhecidas: suscetibilidade a uma doença como a antracnose em estilosantes (Lenné & Calderón, 1984; Cameron *et al.*, 1997a), pragas como a cigarrinha-das-pastagens em braquiária (Valério *et al.*, 1996), pouca adaptação ao pastejo pela remoção de pontos de crescimento como em siratro (Jones & Jones, 1978), ou ainda a presença de fatores de antiqualidade, como mimosina em leucena (Pereira & Alcântara, 1993).

Alguns critérios de mérito importantes a serem considerados no estabelecimento dos objetivos do melhoramento de forrageiras foram enumerados por Pereira (1998) e Miles & Valle (1994):

- Rendimento de matéria seca total, de folhas, anual, e distribuição estacional;
- Valor nutritivo ou qualidade – atributo que envolve consumo, palatabilidade digestibilidade e ausência de fatores antinutricionais;
- Adaptação ao ambiente de interesse (solo, clima e manejo imposto);
- Persistência – monitorada pela sobrevivência e rendimento ao longo do tempo;
- Fixação de nitrogênio;
- Facilidade de propagação e estabelecimento (rendimento e qualidade de sementes);
- Resistência a pragas e doenças;
- Compatibilidade de associação com outras espécies.

Finalmente, o objetivo imediato para cada situação é distinto: onde não se identificaram forrageiras adaptadas para substituir a vegetação nativa, o melhoramento passa pela introdução, avaliação e seleção. Onde já existem cultivares comerciais em uso, o que se busca é corrigir alguma deficiência bem identificada, sem perder os atributos positivos já existentes. Neste caso, realiza-se o melhoramento genético no sentido específico, baseado na recombinação e seleção. Nas situações em que é recomendado o uso da hibridação, o processo é iniciado pela escolha dos genitores.

d) Identificação de genitores

Uma vez definidos objetivo e metas do programa, é necessário identificar os genitores que participarão das etapas seguintes. Ao contrário da introdução de germoplasma, que envolve grande variação genética entre e dentro de espécies, o melhoramento genético abrangerá uma variabilidade mais estreita, pois trabalhará normalmente dentro da espécie. Por outro lado, a hibridação possibilita orientar o processo de mudança e criar novos genótipos não existentes na natureza. O processo pode ser caro e necessitar de um longo período de tempo para obter resultados consistentes, sendo que, iniciar um programa de melhoramento implica em compromisso a médio e longo prazo, disponibilidade de germoplasma com ampla variabilidade e conhecimentos acumulados sobre a biologia e citogenética dessas plantas (Harlan, 1983). Clements (1989) sugere que um período de "aprendizagem" é essencial antes de um programa de melhoramento atingir a etapa produtiva de liberação de novos híbridos. É nesta fase que se inicia a seleção de futuros genitores, identificando aqueles genótipos que exibam as características desejadas e observando a estabilidade das mesmas em diferentes ambientes. Além disso, o conhecimento da divergência genética e complementação alélica possibilitará o estabelecimento de uma coleção de trabalho e a seleção de genitores com melhor capacidade combinatória, aumentando a chance de obtenção de segregantes superiores.

A estratégia para o melhoramento de forrageiras deve conter as seguintes fases: identificação das características importantes de serem melhoradas; escolha da metodologia adequada para avaliação do material; identificação de fontes de variação genética dentro do germoplasma disponível; escolha e recombinação dos genitores; seleção dos segregantes superiores; comparação do material melhorado com um padrão existente; avaliação do comportamento animal e da planta; distribuição dos novos materiais.

6. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Vários fatores têm sido apontados como dificuldades a serem superadas pelo melhoramento de forrageiras para as condições tropicais (Paim, 1977; Cameron, 1983; Miles & Valle, 1997):

- Dificuldade de acesso ao germoplasma, visto que a maioria das espécies gramíneas importantes é exótica;
- Pequeno conhecimento sobre a variabilidade da maioria das espécies leguminosas nativas que apresentam bom potencial forrageiro;
- Elevado número de espécies apresentando alta complexidade de estrutura reprodutiva (alogamia, autogamia, propagação vegetativa, apomixia) e níveis de ploidia (diplóides, triplóides, tetraplóides e hexaplóides);
- Pequeno estoque de informações básicas sobre a biologia e a genética do material a ser melhorado (modo de reprodução, localização de genes, estudos sobre herança etc.);
- Necessidade de adaptação das metodologias de melhoramento e técnicas experimentais para muitas das espécies;
- Baixo nível de domesticação das espécies, dificultando os procedimentos de melhoramento e a adaptação aos agrossistemas;
- Presença de auto-esterilidade, impossibilitando a autofecundação em muitas espécies;
- Sensibilidade ao fotoperíodo e isolamento reprodutivo temporal, dificultando a recombinação de muitos genótipos;
- Deficiência na produção de sementes (deiscência, baixa viabilidade, florescimento indeterminado);
- Demora na obtenção de novas cultivares decorrente da necessidade de avaliação com animais e persistência.

Embora existam limitações, considera-se que as perspectivas de melhoramento das forrageiras tropicais são bastante favoráveis. A Tabela 1 ilustra os diferentes estágios, características e potencial de utilização das principais forrageiras tropicais.

O melhoramento genético de plantas forrageiras deve ser dirigido para a obtenção e(ou) seleção de materiais superiores que possam aumentar a quantidade e(ou) qualidade de forragem produzida, a eficiência da produção animal e, conseqüentemente, os lucros da exploração pecuária. Os métodos de melhoramento aplicados às espécies forrageiras são os mesmos utilizados para outras culturas de valor econômico. Entretanto, às vezes, torna-se necessário realizar modificações na metodologia original em função da existência de características genéticas específicas nas forrageiras (apomixia, propagação vegetativa, prolificidade, ciclo perene) e, assim, obter uma maior eficiência no trabalho.

Por outro lado, os objetivos finais são diferentes. Em espécies anuais, por exemplo, os melhoristas procuram, em síntese, aumentar significativamente a produção de grãos, seja direta ou indiretamente. Em forrageiras, a resposta que se busca é um melhor desempenho produtivo animal e não apenas um melhor comportamento agronômico da planta. Neste caso, estão envolvidas complexas interações clima x solo x planta x animal, que tornam o processo mais difícil e de execução demorada.

TABELA 1. Potencial de utilização e estágio de melhoramento das principais forrageiras cultivadas no Brasil.

Nome Científico	Nome Comum	Características					
		I	II	III	IV	V	VI
GRAMÍNEAS							
Andropogon gayanus Kunth.	andropógon	C	Sal	StFtCt	S	I	3
Brachiaria decumbens Stapf.	braquiária decumbens	D	A	StFtCs	S	P	3
Brachiaria brizantha (A. Rich.) Stapf.	brizanta ou brizantão	C	A	StFsCt	S	I	1
Cenchrus ciliares L.	capim-buffel	C	A	StFtCs	S	I	1
Cynodon dactylon (L.) Pers.	bermuda ou grama-seda	D	S	SsFsCs	SV	M	1
Cynodon nlemfuensis Vanderyst	grama-estrela	D	S	SsFsCs	V	I	2
Melinis minutiflora Beauv.	capim-gordura, meloso	C	A	StFtCt	S	P	4
Hyparrhenia rufa Beauv.	jaraguá ou provisório	C	S	StFtCs	S	P	3
Panicum maximum Jacq.	colonião	C	A	StFsCs	S	P	1
Pennisetum purpureum Schum.	capim-elefante	C	Sal	StFsCs	VS	I	1
Setaria anceps Stapf. ex Massey.	setaria	C	S	SsFsEt	S	P	4
LEGUMINOSAS							
Medicago sativa	alfafa	C	Sal	SsFsEs	S	M	1
Stylosanthes guianensis	estilosantes	C	Sau	StFtEt	S	P	2
Arachis pintoi	amendoim forrageiro	C	S?	StFt	S	P	3
Leucaena leucocephala	leucena	A	Sau	StFt	S	P	3

I - Tipo de Crescimento → C: cespitoso; D: decumbente; A: arbóreo
II - Método de Reprodução → S: sexual al: alógama au: autógama A: apomítico
III - Tipo de estresse: S: seca; E: encharcamento; F: baixa fertilidade; C: cigarrinhas
Tolerância ambiental → t: tolerante; s: suscetível
IV - Tipo de propagação → S: semente; V: vegetativo
V - Estágio de melhoramento → M: muito; I: intermediário; P: pouco
VI - Potencial de utilização → 1: excelente; 5: ruim
Adaptado de Burton (1993)

7. PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES FORRAGEIRAS

O processo de obtenção de novas cultivares forrageiras apresenta algumas etapas específicas que o distingue do melhoramento dos cereais. A Figura 1 ilustra as diferentes etapas que devem ser cumpridas:

• Introdução e caracterização – o germoplasma introduzido deve ser caracterizado em relação a um conjunto de descritores botânico-agronômicos, para identificar acessos e selecionar genitores para a etapa seguinte.

• Hibridação e seleção – nesta etapa são realizados os cruzamentos visando recombinar características de interesse. Os genótipos superiores deverão ser multiplicados para avaliação nas etapas posteriores.

• Avaliação em pequenas parcelas – esta avaliação tem por objetivo estimar o potencial produtivo dos acessos e outros caracteres agronômicos e deve ser realizada em experimentos com repetição. Esta etapa do trabalho pode ser multilocacional para avaliar a adaptação dos materiais em diferentes ambientes.



FIGURA 1. Etapas na avaliação de gramíneas forrageiras visando à liberação de novas cultivares.

• Avaliação em parcelas grandes – nesta fase, é utilizado um número reduzido de tratamentos, visto que as parcelas (piquetes) podem ocupar área até 1.000 m^2. Nela avalia-se o comportamento da planta, sob efeito de pastejo, em comparação às testemunhas conhecidas.

• Avaliação final – participam desta etapa apenas um ou dois materiais selecionados nas fases anteriores e as testemunhas. Os testes são realizados em sistemas reais de produção, sendo avaliado o desempenho animal.

• Lançamento – Antes do lançamento deve-se produzir uma quantidade suficiente de sementes para distribuição aos produtores. O material a ser lançado deve apresentar vantagens comparativas em relação às cultivares já existentes.

8. INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE

Em um determinado ambiente, a manifestação fenotípica resulta da ação do genótipo sob influência do meio. Entretanto, quando se considera um conjunto de locais, detecta-se, além dos efeitos genéticos e ambientais, um efeito adicional proporcionado pela possível interação destes fatores. A avaliação dos efeitos da interação genótipos x ambientes torna-se de grande interesse para o melhoramento, pois, no caso de sua manifestação, o comportamento de um genótipo pode variar entre ambientes. Isto dificulta a obtenção de cultivares com ampla adaptabilidade.

As causas da interação têm sido atribuídas a fatores fisiológicos e(ou) bioquímicos inerentes a cada genótipo cultivado. Como os genótipos se desenvolvem em sistemas dinâmicos, em que ocorrem constantes mudanças desde a semeadura até a maturação, há geralmente um comportamento diferenciado dos mesmos em termos de resposta às variações ambientais (Cruz & Regazzi,1994). Segundo estes mesmos autores nos programas de melhoramento, têm sido freqüente a avaliação do comportamento relativo de um grupo de cultivares às variações ambientais, considerando-se como ambientes os diferentes locais. Entretanto, estudos a respeito da interação genótipos x ambientes não proporcionam informações pormenorizadas do comportamento de cada genótipo ante as variações ambientais. Para tal objetivo, realizam-se análises de adaptabilidade e estabilidade pelas quais se torna possível a identificação de cultivares de comportamento previsível e que respondam favoravelmente às variações ambientais em condições específicas ou amplas.

Em conseqüência desses fatores, a consideração dos efeitos da interação genótipo x ambiente constitui um importante aspecto no melhoramento das forrageiras. Aos produtores interessa que as plantas apresentem a máxima expressão

do seu potencial genético, produzindo grande quantidade de matéria seca de boa qualidade. Considerando que a uniformização dos ambientes de cultivo é praticamente impossível pelos elevados custos envolvidos, a solução viável para manter a alta produtividade das forrageiras em diversos ambientes é a utilização de plantas geneticamente adaptadas.

A estratégia de selecionar plantas para condições específicas de ambiente tem sido adotada pelos programas de melhoramento de espécies importantes, como milho, arroz, trigo, feijão, soja, algodão etc. É com base no trabalho de seleção e validação em ensaios multilocacionais que têm sido possível a esses programas de melhoramento lançar cultivares superiores adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas. Considerando que a maioria das forrageiras importantes se reproduz por apomixia ou por meio de propagação vegetativa, o que significa que suas populações são geneticamente homogêneas, a adaptação das cultivares a ambientes muito divergentes ou a resposta a um agente biótico pode tornar-se mais difícil.

A capacidade de se ajustar a um determinado local (adaptação) e apresentar comportamento constante em diversas condições ambientais (estabilidade) estão relacionadas com a constituição genotípica da cultivar. Populações melhoradas e com ampla variabilidade genética, normalmente apresentam maior facilidade de adaptação em diferentes situações, sustentando produções elevadas. Por outro lado, a faixa de resposta à variação ambiental tende a ser menor em materiais de base genética estreita, como é o caso dos clones. Assim, a avaliação e seleção de cada clone de capim-elefante em diferentes condições edafoclimáticas (ensaios multilocacionais - Figura 1) constitui a estratégia mais adequada para se recomendar cultivares adaptadas às diversas regiões brasileiras.

Devido à impossibilidade de considerar as inúmeras plantas forrageiras, individualmente, serão apresentados, a seguir, detalhes das principais espécies cultivadas no Brasil, bem como das estratégias de melhoramento mais utilizadas.

9. MELHORAMENTO DE BRAQUIÁRIAS

Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* alcançaram grande importância econômica no Brasil nos últimos trinta anos, viabilizando a atividade pecuária nos solos fracos e ácidos dos Cerrados, criando novos polos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central. Uma dinâmica e progressista indústria de produção de sementes desenvolveu-se no Centro-Sul brasileiro graças às braquiárias, movimentando, anualmente, cerca de trinta mil toneladas de sementes, a um valor aproximado de 115 milhões de dólares (Santos Filho, 1996), considerando-se apenas o mercado interno. Mas o Brasil tornou-se o maior mercado exportador de sementes de braquiária para a América Latina, e este mercado continua em expansão.

Dois relevantes eventos sobre *Brachiaria* congregaram especialistas e as informações apresentadas encontram-se reunidas nos Anais do 11° Simpósio sobre Manejo da Pastagem (Simpósio, 1994) e no livro: "*Brachiaria*: *Biology, Agronomy, and Improvement*" (Miles *et al.*,1996). Outras informações importantes foram publicadas nos livros dos "Encontros para discussão sobre capins do gênero *Brachiaria*" (Encontros, 1987; 1991).

9.1 ORIGEM

O gênero *Brachiaria* pertence à tribo Paniceae e compreende cerca de 100 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, com grande concentração no continente africano. Essas espécies vegetam em habitats muito variados, tais como várzeas inundáveis, margens de florestas ralas e até regiões semidesérticas. A ocorrência mais comum, no entanto, é em vegetação de savana. Há espécies reconhecidamente adaptadas a solos de baixa fertilidade e mal drenados (Bogdan,1977).

As principais espécies forrageiras de importância econômica nas Américas são originárias da África do leste. São elas: *B. arrecta* (ex. *B. radicans)*; *B. brizantha*; *B. decumbens*; *B. dictyoneura*; *B. humidicola*; *B. mutica* e *B. ruziziensis.*

Keller-Grein *et al.* (1996) descreveram a dispersão das espécies mais importantes, dentro do continente de origem, a África. *B. brizantha* é sem dúvida a mais cosmopolita das espécies, tendo sido extensamente coletada na Etiópia, Quênia, Uganda, Ruanda, Burundi, Tanzânia, Zâmbia, Zimbábue e norte da África do Sul. Aparece ainda nos países do Golfo da Guiné, como Nigéria - onde foi amplamente coletada - e em Camarões. A segunda espécie em abrangência de distribuição é *B. humidicola*, tendo sido encontrada nos mesmos países que a primeira, mas nos locais mais úmidos ou de drenagem deficiente.

Já *B. decumbens* e *B. ruziziensis* apresentam uma distribuição muito mais restrita, tendo sido coletadas em Uganda, Ruanda e Burundi e, menos freqüentemente, no Zaire. *B. dictyoneura* também está restrita a países do extremo leste, como Tanzânia e Quênia. *B. mutica* e *B. arrecta* são originárias do oeste africano e são forrageiras muito palatáveis e extremamente bem adaptadas a solos encharcados e férteis.

9.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

Uma recente revisão taxonômica do gênero foi realizada por Renvoize *et al.* (1996), compreendendo 97 espécies, distribuídas por todo o taxon. Conforme citado por estes autores, *Brachiaria* foi descrita pela primeira vez por Trinius, em 1834, que a classificou como uma subdivisão de *Panicum*, e, posteriormente, em 1853, foi elevada à categoria de gênero por Grisebach.

No gênero *Brachiaria* existe uma superposição de características com outros gêneros como *Urochloa* e *Panicum*. Segundo Renvoize *et al.* (1996), a taxonomia atual deixa muito a desejar e, não existe ainda uma solução satisfatória para o problema de identidade genérica e das espécies componentes.

As principais características que identificam o gênero, dentro da tribo Paniceae, são as espiguetas ovais a oblongas, arranjadas em rácemos unilaterais, com a gluma inferior adjacente à ráquis, i.e., em posição adaxial (Renvoize *et al.*, 1996).

Brachiaria realiza fotossíntese do tipo C_4 pelo ciclo PEP-CK (Fosfoenolpiruvato carboxicinase), característica esta particular a um pequeno grupo de gêneros, que incluem *Urochola* e *Panicum* (Clayton & Renvoize, 1986).

Renvoize *et al.* (1996) dividiram as 97 espécies estudadas em nove grupos, considerando a associação de características morfológicas mais significativas e descreveram cada um dos grupos, oferecendo uma lista das espécies que os compõem, subdivididas por continente de origem.

9.3 DOMESTICAÇÃO E DISPERSÃO

As espécies de *Brachiaria* de importância econômica não podem ser consideradas domesticadas pois, por definição, independem do homem para sua sobrevivência e ainda não sofreram modificações em sua adaptação ecológica ou diferenciação morfológica (Harlan, 1975). Estas espécies são de utilização recente e não existem hoje, no mercado, cultivares resultantes de manipulação genética: híbridos ou plantas transgênicas.

Existem espécies de *Brachiaria* originárias dos cinco continentes mas, sem dúvida, as espécies de maior expressão econômica são originárias do leste da África e cultivadas fora deste continente. Segundo Boonman (1993) espécies de *Brachiaria* são componentes comuns e de grande valor na vegetação natural do leste africano. Porém, pastagens cultivadas são essencialmente inexistentes nos sistemas de produção animal da África, a não ser em pequenas propriedades, para produção de leite, e, assim mesmo, como forragem cortada e não para pastejo direto. Fora do continente africano, *Brachiaria* é a forrageira tropical de maior utilização para produção animal, seja de leite ou carne, em termos de área plantada (Miles & Valle, 1996), totalizando, só no Brasil Central, mais de trinta milhões de hectares.

A espécie *B. mutica* (capim-angola) foi a primeira espécie de braquiária introduzida no Brasil. O processo foi realizado de forma involuntária, tendo o material sido trazido no período colonial, possivelmente, como cama de escravos. O processo de introdução feito com o objetivo de selecionar materiais para formação de pastagens ocorreu muito tempo depois.

A primeira introdução oficial de *Brachiaria decumbens,* no Brasil, ocorreu em 1952, no antigo IPEAN (Serrão & Simão Neto, 1971). Foi, porém, em 1965, após novas introduções desta e de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, e com subseqüente importação de grandes quantidades de sementes, a partir de 1968, que essas espécies expandiram-se para a Amazônia e o Cerrado. A boa adaptabilidade a solos fracos e ácidos, agressividade na competição com invasoras e bom desempenho animal, explicam a rápida expansão de braquiárias, especialmente de *B. decumbens* cv. Basilisk, nos trópicos.

9.4 GERMOPLASMA

As variedades comerciais de braquiária existentes no Brasil são poucas e por serem exóticas e reproduzirem-se essencialmente por apomixia, nova variabilidade não é criada. A diversidade de germoplasma na América era escassa até a coleta e introdução de quase 700 acessos deste gênero pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Esta coleção é resultante de coletas realizadas entre 1984 e 1985 no leste e sul da África com o suporte do IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*) e colaboração do ILCA (*International Livestock Center for Africa*).

As principais coleções de germoplasma de braquiária existentes no mundo, conforme apresentado por Keller-Grein *et al.* (1996), estão na Colômbia (CIAT com 687 acessos), Etiópia (ILCA com 520 acessos) e no Brasil (Embrapa com 446 acessos). Uma grande parte dos acessos destas coleções é de *B. brizantha*.

O germoplasma de *Brachiaria,* da Embrapa Gado de Corte, foi caracterizado usando 26 descritores morfológicos (vegetativos e reprodutivos), tendo sido agrupados os acessos com base em análise multivariada. A coleção vem sendo mantida em parcelas,

no campo, visando à conservação do germoplasma *ex situ* e por sementes a longo prazo. Para cada acesso, é conservado, em câmara fria, um estoque mínimo de 30 gramas de sementes puras viáveis.

9.5 CITOGENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria* é caracterizado por uma maioria de espécies poliplóides e apomíticas. Darlington & Wylie (1955) determinaram que os números básicos de cromossomos para o gênero são n = 7 ou 9. Um levantamento da literatura pertinente é apresentado por Valle & Savidan (1996).

A coleção na Embrapa Gado de Corte foi avaliada quanto ao nível de ploidia com o auxílio da citometria de fluxo, uma técnica que determina a quantidade de DNA presente em núcleos, por meio de fluorescência de um pigmento adicionado que se complexa com o DNA (Galbraith *et al.*, 1983). Detectou-se variação intra e interespecífica no número de cromossomos, inclusive tendo sido identificados pela primeira vez pentaplóides naturais (Penteado *et al.*, 1997; Leteriello *et al.*, 1997). Existe uma grande variação na quantidade total de DNA determinada por citometria, especialmente em *B. brizantha*, o que sugere processos de alopoliploidização de genomas distintos ou diferentes processos de poliploidização na história evolutiva do gênero, como ocorre para outras gramíneas.

A apomixia está normalmente associada à poliploidia. Esta, por sua vez, freqüentemente resulta em irregularidades meióticas levando à baixa fertilidade do pólen. Existem vários tipos de apomixia, dependendo da origem do saco embrionário – se meiótico ou não – e do número de divisões mitóticas. A apomixia em *Brachiaria* é a aposporia do tipo *Panicum*, conforme ilustrado na Figura 2.

A seqüência de eventos na formação do saco embrionário de uma planta – megagametogênese – determinará o modo de reprodução e, conseqüentemente, a natureza da progênie resultante. Na parte masculina, a microsporogênese determinará a fertilidade do pólen e, assim, sua contribuição na constituição genética da progênie.

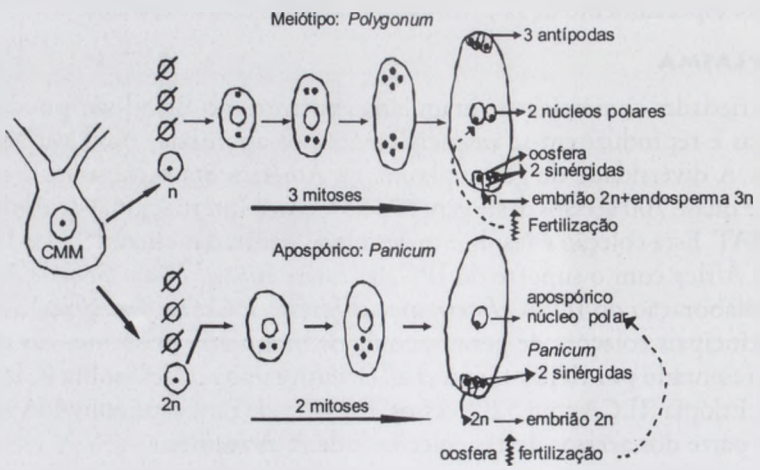


FIGURA 2. Modo de reprodução em *Brachiaria* e *Panicum*: reprodução esquemática da formação de sacos embrionários meióticos do tipo *Polygonum* (sexual) e apospóricos do tipo *Panicum* (apomítico). CMM: célula-mãe da megáspora

Descrição detalhada sobre a gametogênese em *Brachiaria* foi apresentada por Gobbe *et al.* (1983) e Ndikumana (1985). Em geral, a microsporogênese precede a megagametogênese e se desenvolve de forma normal: meiose da célula-mãe da micróspora (2n cromossomos) seguida da formação de quatro gametas (n cromossomos).

A megagametogênese em *Brachiaria* pode ocorrer de duas maneiras (Figura 2). A primeira é por via sexual, onde uma meiose regular da célula-mãe da megáspora (CMM) resulta numa tétrade de células reduzidas. Apenas uma destas, na região chalazal do ovário, sofre três mitoses, resultando num saco embrionário meiótico do tipo *Polygonum*. Os núcleos se diferenciam em uma célula-ovo; duas células sinérgidas, de vida efêmera; dois núcleos polares e três células antípodas. A célula-ovo, uma vez fecundada, se transforma em embrião, e os núcleos polares, fecundados, formarão o endosperma da semente.

A segunda é por via assexual, na qual o saco embrionário apospórico se desenvolve a partir de uma célula somática (2n) no nucelo (tecido que circunda a CMM) por duas mitoses sucessivas e depois que as quatro células reduzidas da meiose se degeneram. Os quatro núcleos resultantes se diferenciam em uma célula-ovo, duas sinérgidas e um núcleo polar. Apenas o núcleo polar é fecundado e a célula-ovo, não reduzida, dará origem ao embrião por partenogênese. Mais de uma célula somática pode iniciar desenvolvimento e resultar em sacos múltiplos dentro do ovário, mas nunca se observou mais do que uma semente por espigueta; portanto, supõe-se que algum mecanismo de seleção e eliminação se estabeleça para que apenas um embrião sobreviva.

Ndikumana (1985) observou que sacos embrionários apospóricos tendem a se formar mais rapidamente do que sacos meióticos em *B. brizantha* e *B. decumbens*, duas espécies de reprodução apomítica, mas que sempre produzem alguns sacos meióticos. Esse fato é muito importante na fertilização ou partenogênese, pois determina o comportamento reprodutivo da flor em questão. Plantas que produzem tanto sacos meióticos quanto apospóricos são chamadas de apomíticas facultativas.

Determinou-se o modo de reprodução de 540 acessos de 18 espécies diferentes pertencentes à coleção de *Brachiaria* reunida pelo CIAT, e os resultados são apresentados na Tabela 2. Os ovários foram clareados e examinados em microscópio com contraste de interferência e os acessos classificados como sexuais sempre apresentaram sacos meióticos ou estéreis, mas nunca sacos apospóricos. Acessos apomíticos apresentaram sacos apospóricos simples ou múltiplos e percentagens variáveis de sacos meióticos.

Há outras formas de determinação do modo de reprodução. Cruz *et al.* (1989) compararam clareamento a cortes histológicos, concluindo que, embora a análise por cortes permita visualização mais definida das estruturas internas do saco embrionário, a clarificação é mais fácil e rápida, especialmente quando se tem um grande número de acessos ou híbridos a classificar. Outra alternativa é o teste de progênies. Sementes de polinização aberta são plantadas em linhas e da homogeneidade fenotípica pode-se deduzir a presença de apomixia, enquanto a sexualidade produz fenótipos segregantes. Valle & Miles (1996) relataram resultados de uma comparação entre um teste de progênie e o exame microscópico de sacos embrionários. Os autores encontraram boa concordância entre determinações para plantas sexuais e para as

TABELA 2. Modo de reprodução de 18 espécies de *Brachiaria*, baseado na análise do saco embrionário.

Espécies	Nº. de acessos analisados	No. de acessos	
		Sexuais[a]	Apomíticos[b]
B. adspersa	1	1	0
B. arrecta	4	4	0
B. bovonei	4	0	4 (7-96%)
B. brizantha	275	1	274 (0-74%)
B. comata	1	1	0
B. decumbens	65	24	41 (0-56%)
B. deflexa	1	1	0
B. dictyoneura	8	1	7 (0-43%)
B. dura	3	3	0
B. humidicola	64	3	61 (0-66%)
B. jubata	43	8	35 (0-47%)
B. nigropedata	21	0	21 (5-20%)
B. platynota	4	3	1 (61%)
B. plantaginea	1	1	0
B. ruziziensis	36	36	0
B. serrata	2	2	0
B. [illegible]	2	2	0
B. subulifolia	5	0	5 (7-38%)
Total	540	91	449

[a]Sacos apospóricos nunca foram observados.
[b]Variação de sexualidade (% de sacos meióticos) observada em acessos apomíticos.
Fontes: Valle & Miles (1996) e revisado por Valle (1999) dados não publicados.

apomíticas de baixa sexualidade. O teste de progênie apresentou problemas na determinação de plantas apomíticas facultativas com alta sexualidade, cujas progênies segregaram fenotipicamente quase como uma planta sexual.

Na coleção reunida pelo CIAT, encontrou-se sexualidade em acessos de espécies antes tidas como apomíticas obrigatórias: *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. dictyoneura* (Valle & Miles, 1994). Para outras espécies, tais como *B. serrata*, *B. platynota* e *B. subulifolia* o modo de reprodução foi descrito pela primeira vez por Valle (1990). A significância destes resultados, quanto à sexualidade encontrada, está no fato de permitir que cruzamentos sejam realizados e, com isso, abrir perspectivas para o melhoramento genético dessas espécies.

9.6 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

Algumas deficiências das cultivares de braquiária hoje utilizadas comercialmente na América Tropical são reconhecidas: *B. decumbens* cv. Basilisk é suscetível à cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae); *B. brizantha* cv. Marandu é resistente ao inseto mas suscetível a *Rhizoctonia* (fungo que causa manchas foliares – Kelemu *et al.*, 1995) e menos persistente em solos ácidos e pobres; *B. humidicola* comum é bem adaptada a condições de solos mal drenados, mas apresenta menor valor nutritivo e sendo apenas tolerante a cigarrinhas-das-pastagens; *B. ruziziensis*, a única espécie sexual entre essas,

apresenta melhor valor nutritivo, porém é suscetível a cigarrinhas-das-pastagens e não persiste em solos ácidos nem tolera longos períodos secos.

A avaliação agronômica de acessos do banco de germoplasma descortinou uma variabilidade significativa que vem sendo explorada por meio de seleção de ecótipos promissores (Pizarro *et al.*, 1996). Por outro lado, o programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte foi iniciado, visto que características importantes não foram identificadas num único ecótipo.

Assim, o objetivo principal dos programas de melhoramento em andamento na Embrapa Gado de Corte e no CIAT (Colômbia) é obter híbridos persistentes, por intermédio de cruzamentos interespecíficos, que reúnam características desejáveis de dois ou mais genitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens.

9.7 CRUZAMENTOS INTERPLÓIDICOS

No banco de germoplasma existem espécies poliplóides e apomíticas por aposporia do tipo *Panicum,* como explicado anteriormente. Todos os acessos de *B. ruziziensis* mostraram ser sexuais e diplóides, alógamos e com auto-incompatibilidade genótipo específica. Outros acessos (21 *B. decumbens* e 1 *B. brizantha*) identificados como sexuais também são diplóides ou tetraplóides (1 *B. humidicola* e 1 *B. dictyoneura*), enquanto os apomíticos compatíveis são tetra ou hexaplóides.

Tentativas de cruzamentos interplóidicos e interespecíficos aconteceram desde a década de 70 quando Ferguson & Crowder (1974) utilizaram *B. ruziziensis*, sexual e diplóide, polinizada por *B. decumbens*, apomítica e tetraplóide. Não foram obtidos híbridos e o insucesso foi atribuído à diferença de ploidia entre os genitores. Mais tarde, Hacker (1988) cruzou um acesso diplóide e sexual de *B.decumbens* com outro tetraplóide e apomítico. Recuperou um único híbrido triplóide e estéril, e diante do insucesso sugeriu duas formas de obter plantas férteis: pela duplicação de cromossomos do híbrido triplóide ou pela duplicação de acessos sexuais diplóides para realizar cruzamentos no nível tetraplóide. Trabalhos de outros pesquisadores resultaram na duplicação de acessos diplóides sexuais de *B. ruziziensis* por meio de colchicina (Swenne *et al.*, 1981) e, finalmente, na produção dos primeiros híbridos interespecíficos entre *B. ruziziensis* sexual, tetraploidizada artificialmente, e acessos de *B. decumbens* e *B.brizantha*, apomíticos e tetraplóides naturais (Ndikumana, 1985). A segregação próxima a 1:1 de plantas apomíticas e sexuais, apesar do reduzido número de híbridos obtidos (29) forneceu as primeiras indicações de uma herança simples da apomixia em *Brachiaria*, como a encontrada em *Panicum* por Savidan (1983) e que viabilizou a manipulação da apomixia em programa de melhoramento genético deste gênero.

Hibridações em maior escala tiveram início na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande e, no CIAT - Colômbia, a partir de 1988, conforme esquema apresentado na Figura 3. Ao explorar a apomixia existente no complexo *B.brizantha / B. decumbens* por meio de *B. ruziziensis* sexual, tetraploidizada artificialmente, viabilizou-se a produção de híbridos interespecíficos para avaliação de desempenho agronômico, ao mesmo tempo em que se estudou a herança da apomixia. Ainda, foi gerado um grande número de híbridos sexuais reutilizáveis em novos cruzamentos.

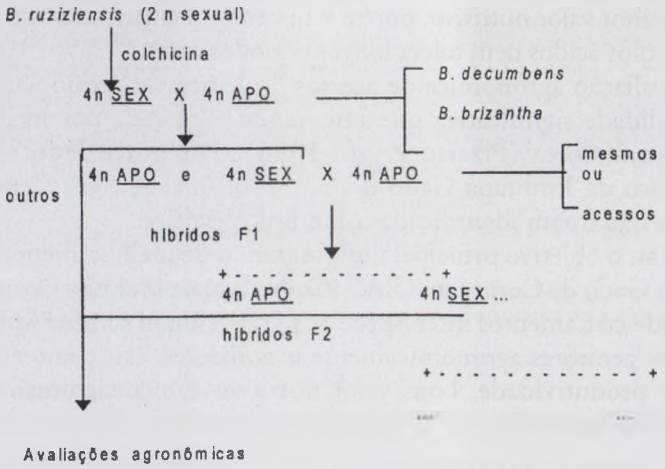


FIGURA 3. Esquema de hibridação proposto para *Brachiaria* (adaptado de Gobbe *et al.*, 1983).

9.8 SITUAÇÃO ATUAL

Entre os avanços alcançados nos programas da Embrapa e do CIAT destacam-se:

a) Herança da apomixia

O controle genético da aposporia foi estudado usando-se biótipos completamente sexuais de *B. ruziziensis* (R) tetraploidizada artificialmente. Vasos de R na casa de vegetação, utilizada como planta-mãe, foram polinizados artificialmente por *B. decumbens* cv. Basilisk (D) e *B. brizantha* cv. Marandu (B), genitores apomíticos, tetraplóides naturais. Não foi feita a emasculação das flores polinizadas, já que a auto-esterilidade parece predominar nestes clones de *B. ruziziensis* (Ngendahayo *et al.*, 1988). Híbridos F_1 sexuais, selecionados pelas características fenotípicas no campo, foram autopolinizados (F_2), retrocruzados com o genitor apomítico, cruzados com meios-irmãos, com irmãos completos e com o genitor apomítico alternativo – *tricross* ou *3-way* (F_1 sexuais de (R x D) polinizados por B e F_1 sexuais de (R x B) polinizados por D).

Uma vez que ainda não existem marcadores genéticos confiáveis para determinar a natureza híbrida das plantas, esta foi feita com base em características morfológicas e fenológicas. Modo de reprodução foi determinado nas progênies, utilizando-se a técnica de clareamento e microscopia com contraste de interferência. Os resultados obtidos indicam uma herança tetrassômica simples, consistente com um modelo de segregação aleatória de cromátides (Allard, 1971), com dominância da apomixia sobre a sexualidade (Tabela 3).

As progênies de autopolinização das plantas sexuais e de cruzamentos entre plantas sexuais, em nível diplóide ou tetraplóide, resultaram sempre em progênies de reprodução sexual, portanto indicando recessividade (aaaa). As progênies de cruzamentos de planta sexual por apomítica segregaram em proporção próxima de 1:1, sugerindo um genótipo simplex (Aaaa) para o genitor apomítico (Valle & Savidan, 1996). Outras evidências de herança simples em *Brachiaria* foram discutidas por Miles & Escandón (1997).

TABELA 3. Segregação para modo de reprodução (Sexual ou Apomítico) em diferentes tipos de cruzamento de *Brachiaria*.

Cruzamentos[a]	Nº. de plantas observadas			Proporção esperada	χ^2
	SEX	APO	Total		
1. S_1 auto	22	0	22	1:0	
2. F_1 híbridos	187	165	352	1:1	1.367
3. F_2	12	0	12	1:0	
4. F_1 sex BC	22	24	46	1:1	0.044
5. Irmãos Completos	64	59	123	1:1	0.113
6. Meio-irmãos	81	83	164	1:1	0.012
7. *Tricross*	58	42	100	1:1	2.54
8. APO x APO	4	6	10	1:3	
9. SEX x SEX (4x)	7	0	7	1:0	
10. SEX x SEX (2x)	28	0	28	1:0	

[a] S_1 = clones de *B.ruziziensis*.
[b] Valores χ^2 são maiores que 3,84 e 6,63 para significância a 5 e 1%, respectivamente.
Fontes: Valle & Miles, 1994; Valle & Savidan (1996)

No CIAT, hibridações interespecíficas foram realizadas a campo – planta sexual estrategicamente colocada em parcela do genitor apomítico – já que baixas taxas de autopolinização foram detectadas neste germoplasma (Calderón & Agudelo, 1990). Cerca de 800 híbridos de primeira geração foram obtidos, envolvendo vários genitores apomíticos. Observaram-se diferenças significativas em fertilidade de espiguetas, indicando ser esta uma característica passível de melhoramento. Híbridos tiveram, em média, menor fertilidade do que os genitores, porém a variabilidade entre eles foi maior e alguns híbridos mostraram fertilidade tão alta quanto os melhores genitores. Modo de reprodução de 128 desses híbridos, selecionados por produção de sementes e vigor, foi determinado por teste de progênies de polinização aberta e confirmados por análise de sacos embrionários, observando-se a segregação de 1:1 de tipos apomíticos e sexuais na progênie.

b) Técnicas de biotecnologia

A busca por marcadores moleculares estreitamente ligados ao loco que confere a reprodução por apomixia justifica-se, tanto por auxiliar na compreensão do seu mecanismo (Pessino *et al.*, 1997; Leblanc *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998) como para permitir uma identificação precoce do modo de reprodução em progênies híbridas. Analisaram-se marcadores RAPD e AFLP no CIAT (Thome *et al.*, 1996) e sondas RFLP de milho (Pessino *et al.*, 1997; 1998) no *Institute for Grassland and Environmental Research*. Foram identificados marcadores RAPD e RFLP localizados a 15 centiMorgan ou mais do loco da apomixia. Apesar do sucesso inicial, ainda não se encontrou um marcador dentro da região intermediária do cromossomo. Marcadores para apomixia também estão sendo estudados no âmbito de um grande programa envolvendo milho e *Trypsacum* no Centro Internacional de Melhoramento Milho e Trigo - CIMMYT (Grimanelli *et al., 1998*).

Além dos marcadores, já foram desenvolvidas técnicas de regeneração de plantas a partir de cultivo de calos, meristemas, salvamento de embriões imaturos de

cruzamentos interespecíficos, e metodologia de transformação direta por bombardeamento de partículas (Thome *et al.*, 1996; Rodrigues-Otubo, 1997a; b).

Existem excelentes perspectivas de avanços nesta área que deverão aumentar significativamente a eficiência do melhoramento, como será discutido mais adiante.

c) Seleção e avaliação agronômica

Uma coleção de cerca de 450 acessos foi introduzida do CIAT desde 1987, sendo iniciada a avaliação em pequenas parcelas sob cortes periódicos. Os parâmetros avaliados incluíram produção anual e estacional, proporção folha:haste, velocidade e densidade de rebrota, produção de sementes, resistência a insetos, a doenças e ao frio, teores de proteína bruta e de digestibilidade. Resultados permitiram selecionar 19 acessos pelo bom desempenho agronômico (Tabela 4) e por diversidade morfológica para comporem a primeira rede nacional de ensaios. Dentro de *B. brizantha* foram selecionados os acessos mais produtivos, tanto para produção total de matéria seca como para matéria seca foliar. Foram identificados ainda acessos altamente resistentes à cigarrinha. Na seqüência do esquema de avaliação e seleção, oito acessos foram plantados em piquetes para avaliar o efeito do animal sobre o pasto, selecionando-se quatro para experimentação sob pastejo, visando avaliar o efeito do pasto sobre o desempenho animal.

O potencial do melhoramento de espécies apomíticas só poderá ser explorado eficientemente quando se conhecer melhor o mecanismo da aposporia. Os métodos de melhoramento para *Brachiaria* devem ser orientados para a exploração das propriedades especiais da apomixia, visando ao desenvolvimento de cultivares apomíticas (Miles & Valle, 1996; 1997). Os métodos hoje utilizados são empíricos. Neste momento, estão em teste no CIAT populações sexuais tetraplóides de base genética amplificada (Miles & Escandón, 1997), que podem ser melhoradas por métodos convencionais de seleção. Posteriormente, por meio de hibridação com genótipos apomíticos selecionados, será possível recuperar híbridos apomíticos superiores. No entanto, um método que utilize como critério de seleção o desempenho híbrido poderá vir a ser mais eficiente, como, por exemplo, a seleção recorrente para capacidade combinatória específica. Estas alternativas merecem ser estudadas através de modelos de simulação.

Híbridos selecionados podem ser melhorados quanto a características agronômicas, resistência à cigarrinha, valor nutritivo, e quanto ao modo de reprodução usando-se um bloco de policruzamento num esquema de seleção recorrente, envolvendo uma geração de recombinação genética e outra de avaliação das progênies.

9.9 PERSPECTIVAS

No CIAT após quatro ciclos de seleção, obtiveram-se populações melhoradas quanto ao vigor, hábito de crescimento e relação folha: colmo. Os métodos de avaliação quanto à reação a cigarrinhas-das-pastagens constituem uma importante limitação para a seleção de genótipos resistentes. Uma seleção realizada a campo por dois anos, seguida de avaliação em casa de vegetação, possibilitou identificar alguns híbridos apomíticos. Contudo, em testes sob pastejo, os híbridos não apresentaram resistência adequada à cigarrinha-das-pastagens, demonstrando a necessidade de aperfeiçoamento da metodologia.

TABELA 4. Características agronômicas de 19 acessos de *Brachiaria*, cultivares comerciais e médias comparativas com todos os acessos avaliados no primeiro campo, em Campo Grande, MS.

Acessos	Espécies[1]	MST[2]	MSF	%PMS	R	F/C	CIG
BRA-003948	B	13,5	7,2	23,6	3,7	1,5	+
BRA-002844	B	9,5	5,4	21,1	3,2	2,0	*
BRA-003395	B	13,5	8,4	13,7	3,2	2,3	**
BRA-003450	B	16,2	8,6	16,1	3,4	1,6	*
BRA-003719	B	12,3	4,9	23,4	3,3	1,1	*
BRA-003891	B	15,7	8,5	23,3	3,5	1,6	+
BRA-003204	B	17,7	9,8	21,0	3,6	1,6	**
BRA-003361	B	13,6	8,9	22,1	4,1	2,6	**
BRA-003824	B	13,8	7,3	21,0	3,6	1,6	*
BRA-003484	B	7,4	4,0	21,0	3,5	1,8	+
BRA-003387	B	8,7	4,9	21,6	3,2	1,9	+
BRA-002801	B	8,7	4,2	25,7	3,1	1,6	S
BRA-003441	B	14,5	9,4	15,7	4,4	2,8	**
BRA-003247	B	11,8	6,9	17,0	4,0	2,3	**
BRA-004391	B	8,4	4,2	36,3	2,8	1,3	*
BRA-005011	H	6,4	3,6	16,3	3,0	3,3	S
BRA-005118	H	7,9	3,9	15,4	3,1	1,4	S
BRA-004499	D	9,1	4,4	21,5	3,0	1,4	S
BRA-002739	B	13,5	6,5	18,4	3,2	1,2	*
Testemunhas	comerciais						
BRA-001068	D	10,3	4,4	25,7	3,2	1,1	S
BRA-000591	B	10,8	5,8	17,6	3,9	2,1	**
BRA-002208	H	6,1	2,9	17,8	3,4	2,4	+
Média da coleção	193 acessos	7,8	3,8	18,6	2,8	1,6	
Média dos selecionados	22 acessos	11,7	6,4	20,8	3,4	1,8	

[1]B = *B. brizantha*; D = *B. decumbens*; H = *B. humidicola*

[2]MST = Matéria Seca Total ; MSF = Matéria Seca Foliar; %PMS = Proporção da Produção de MSF (estação seca/anual); R = Rebrota (0 = nada a 6 = melhor); F/C = Relação folha:colmo; CIG = Índice de infestação por cigarrinhas: **=muito resistente; *=resistente; +=tolerante; S=suscetível.

Fonte: Valle *et al.* (1999)

Já nas populações sexuais alcançou-se bom avanço quando comparadas a *B. ruziziensis* genitor tetraploidizado. Alguns clones híbridos apresentaram produtividade muito superior, tanto na época de chuvas como no período seco.

Na Embrapa Gado de Corte, 56 híbridos F_1's (27 apomíticos e o restante sexual) foram avaliados em parcelas sob cortes. A avaliação de infestação por cigarrinha-das-pastagens no campo identificou alguns híbridos promissores.

Os híbridos sexuais selecionados serão recombinados com uma população sexual num bloco de policruzamento, e os melhores apomíticos integrarão o esquema de avaliação para desenvolvimento de novas cultivares de acordo com o organograma apresentado na Figura 1.

Algumas limitações necessitam ser superadas para a melhoria na eficiência do melhoramento de *Brachiaria*, como o desenvolvimento de uma metodologia mais precisa de triagem para resistência a cigarrinha-das-pastagens, na forma de marcadores

moleculares ou caracterização bioquímica. Outra limitação está no pouco conhecimento dos fatores que condicionam a boa adaptação a solos ácidos e fracos. Aqui também estudos fisiológicos e marcadores moleculares poderiam auxiliar na seleção de genótipos promissores. Um marcador molecular para a detecção da apomixia também auxiliaria em muito a determinação do modo de reprodução dos híbridos e permitiria definir precocemente o destino dos genótipos no programa de melhoramento. Os métodos de melhoramento hoje em uso para *Brachiaria* ainda são empíricos como para qualquer sistema que envolve apomixia e sexualidade. Estudos teóricos de genética quantitativa, e talvez modelagens, poderiam conduzir a esquemas eficientes, não só do ponto de vista genético mas também logístico.

O desenvolvimento de uma nova cultivar com base na seleção de genótipos superiores dentro de um banco de germoplasma necessita, em geral, de seis a oito anos (Figura 1), porém pode levar mais tempo quando envolver cruzamentos e avaliação e seleção de progênies. O grande número de acessos envolvidos, a importância deste material para a pecuária tropical e o pouco conhecimento existente sobre o gênero bem como os problemas específicos levantados, justificam plenamente um amplo esforço de equipes multidisciplinares, a fim de culminar no lançamento de variedades melhoradas, híbridas ou não, melhor adaptadas, no mais curto espaço de tempo possível.

10. MELHORAMENTO DO CAPIM-ELEFANTE

O capim-elefante é uma das mais importantes forrageiras, sendo cultivado em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, devido ao seu elevado potencial de produção de matéria seca, qualidade, palatabilidade, vigor e persistência. Outro fator favorável à sua utilização é a baixa incidência de pragas e doenças quando comparado com outras espécies. Esta forrageira está entre as espécies de maior eficiência fotossintética, apresentando elevada capacidade de produção e acúmulo de matéria seca de boa qualidade. A sua utilização mais freqüente ocorre no regime de corte (capineiras), podendo também ser utilizado para ensilagem (Vilela, 1994) e pastejo rotativo (Deresz, 1999).

Durante muito tempo, o capim-elefante foi empregado, quase que exclusivamente, para a formação de capineiras, sendo utilizado na forma de verde picado ou como silagem. Recentemente, com o desenvolvimento da tecnologia de pastejo rotativo, renovou-se o interesse pela sua utilização visando à intensificação da produção de leite a pasto. Resultados de pesquisa com o capim-elefante, sob pastejo rotativo, têm demonstrado ser possível obter produtividade acima de 15.000 kg de leite/ha/ano (Deresz, 1999). Estes resultados têm contribuído para seleção do capim-elefante como a espécie de maior potencial para produção de leite a pasto.

O capim-elefante é uma espécie amplamente difundida por todo o Brasil, sendo cultivada em condições ambientais bastante divergentes. Entretanto, existem poucas cultivares melhoradas para os diferentes ecossistemas e sistemas de utilização, especialmente sob pastejo rotativo. Uma das grandes limitações à sua maior expansão é a necessidade do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor. Considerando que as cultivares existentes, na maioria, são clones (ausência de variação genética entre plantas) e sendo esta forrageira (quase

sempre) cultivada sob condições de manejo deficiente, a expressão do potencial da espécie é comprometida pela dificuldade da planta de se adaptar aos diferentes ambientes. Uma solução econômica para este problema é o desenvolvimento de cultivares superiores, adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas. O uso de cultivares melhoradas, além de contribuir para o aumento da produtividade e redução do custo de produção animal, constitui uma tecnologia acessível à maioria dos produtores.

A obtenção de cultivares melhoradas constitui uma das mais importantes demandas dos produtores de leite de todo o País, sendo intensa a procura de variedades para pastejo adaptadas aos diferentes ecossistemas. Entre os atributos desejados, buscam-se cultivares apresentando maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade forrageira, maior eficiência na utilização de nutrientes, distribuição mais eqüitativa da produção de matéria seca durante o ano, elevada produção de sementes viáveis, resistência a pragas e doenças.

10.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO

A espécie *Pennisetum purpureum* é uma gramínea que ocorre naturalmente numa extensa área ocidental do continente africano, sendo freqüente ao longo dos vales férteis com precipitação acima de 1.000 mm (Brunken, 1977). A África tropical é apontada como o centro de origem e diversidade desta espécie (Stapt & Hubbard, 1934), sendo os territórios da Guiné, Moçambique, Angola, Zimbábue e sul do Quênia relacionados como as principais áreas de variabilidade da forrageira (Brunken, 1977).

O capim-elefante já era conhecido dos nativos africanos pelo nome de "Zinyamunga", entretanto o seu descobrimento e divulgação como planta forrageira foi feito pelo coronel Napier, por cujo nome essa espécie também passou a ser conhecida (Granato, 1924). O capim-elefante foi, inicialmente, introduzido nos Estados Unidos da América, pelo Departamento de Agricultura, em 1913 (Jauhar, 1981). Segundo Granato (1924), o capim-elefante chegou ao Brasil em 1920, a partir de estacas provenientes de Cuba.

Atualmente, o capim-elefante é cultivado na maioria das regiões tropicais do mundo, sendo conhecido por diversos nomes como: capim napier, pasto elefante, pasto gigante, capim-cana africana e outros.

10.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E DESCRIÇÃO DA PLANTA

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) pertence à família Gramineae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Pennisetum* e seção Penicillaria. A tribo Paniceae reúne os mais importantes gêneros de plantas forrageiras tropicais, como *Brachiaria, Panicum, Melinis, Setaria, Axonopus e Acroceras*. Segundo revisão realizada por Tcacenco & Botrel (1994), desde a sua descrição original, o capim-elefante já passou por uma série de denominações, como *P. macrostachyum* Benth, *P. benthamii* Steud, *Ciymnothrix nitens* Anderss, *P. nitens* (Anderss.) Hack, *P. flexispica* K. Schum, *P. benthamii* var. *sambiense Hack, P. benthamii* var. *nudum* Hack, *P. benthamii* var. *ternatum* Hack, *P. fiavonicum* Leeke, *P. pruinosum* Leeke, *P. pallescens* Leeke, *P. lachnorrhachis* A. Peters, *P. purpureum* subs. *flexispica* (K. Schum.) Maire & Weiler e *P. purpureum* subsp. *benthamii* (Steud.) Malre & Weiller.

O gênero *Pennisetum* apresenta mais de 140 espécies (Brunken,1977), incluindo forrageiras cultivadas (*P. purpureum, P. clandestinum, P. unisetum, P. pedicellatum*), cereais (*P. glaucum*) e ornamentais (*P. villosum, P. setaceum*) (Kativu & Mithen, 1987). O gênero é distribuído por toda a faixa tropical do planeta, tendo sido coletadas várias espécies nativas do Brasil, da África e da Ásia (Brunken, 1977; Kativu & Mithen, 1987).

A espécie *Pennisetum purpureum* apresenta ciclo vegetativo perene, crescimento cespitoso, porte elevado, colmos eretos, cilíndricos e cheios, folhas largas e compridas, inflorescência primária terminal do tipo panícula e abundante lançamento de perfilhos aéreos e basais (Bogdan, 1977; Diz, 1994). Os caracteres morfológicos podem apresentar ampla variação entre os diferentes ecótipos. O grau das variações morfológicas chega a ser tão contrastante, que vários autores propuseram uma subdivisão da variabilidade dentro da espécie. Diversas proposições de divisão da variabilidade foram apresentadas em relação à presença de pêlos (Bogdan, 1977), diâmetro do colmo, formato da touceira e época de florescimento (Xavier *et al.*, 1993) e estabelecimento de tipo padrão (Pereira, 1993). Maire (1952) chegou a propor a subdivisão da espécie *Pennisetum purpureum* em três subespécies, sendo: ssp. *benthamii*, ssp. *purpureum* e ssp. *flexipica*. Entretanto, a natureza contínua da variação e a compatibilidade genética entre os diferentes ecótipos não permitem uma divisão intra-específica (Brunken, 1977).

10.3 CITOGENÉTICA

Existem poucas informações sobre a origem filogenética, o processo evolutivo e os centros de diversificação do capim-elefante. A espécie apresenta um número básico cromossômico n = 7 tendo evoluído como um alotetraplóide (2n = 4x = 28) com comportamento diplóide normal (Brunken, 1977; Manara, 1973). Durante a meiose são formadas 14 bivalentes, não sendo observado o pareamento de cromossomos em univalentes e multivalentes (Jauhar, 1968). Os estágios subseqüentes da meiose são regulares, resultando na formação de tétrades isobilaterais e elevada percentagem de pólen fértil (Hanna, 1981; Jauhar, 1981).

De acordo com a classificação de *gene pools* proposta por Harlan & De Wet (1971), as espécies de *Pennisetum* podem ser divididas em três conjuntos gênicos. O conjunto gênico primário inclui o milheto cultivado (*P. glaucum*) e duas formas silvestres (*P. violaceum* e *P. mollissimum*). O capim-elefante compõe o conjunto gênico secundário, enquanto o conjunto gênico terciário é caracterizado por uma ampla diversidade de números básicos de cromossomos (x=5, 7, 8 ou 9) e níveis de ploidia (diploidia até octoploidia).

A espécie possui dois genomas A'A'BB (Jauhar, 1981), sendo o genoma A' parcialmente homólogo ao genoma A do milheto – *P. glaucum* (Dujardin & Hanna, 1985). Essas duas espécies são estreitamente relacionadas, cruzando-se com grande facilidade e originando híbridos estéreis. Os triplóides podem ser mantidos por propagação vegetativa e apresentam grande interesse forrageiro. Normalmente, o híbrido interespecífico assemelha-se mais ao capim-elefante, por causa da maior contribuição genética (2/3 dos cromossomos) e da dominância do genoma B do *P. purpureum* sobre o genoma A do *P. glaucum* (Gonsales & Hanna, 1984). A restauração

da fertilidade pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico (Hanna *et al.*, 1984; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna & Dujardin, 1986). Os hexaplóides produzem sementes maiores que as do capim-elefante, sendo este poliplóide considerado como promissor para propagação por sementes. Outra espécie geneticamente próxima é o *P. squamulatum*, cujo genoma possui segmentos comuns aos genomas A' e B do capim-elefante. O *P. squamulatum* é uma espécie apomítica, podendo este caráter ser transferido ao capim-elefante. Essas espécies apresentam elevado potencial de utilização no melhoramento do capim-elefante, possibilitando a ampliação da base genética da espécie e a obtenção de cultivares portadoras de características especiais, como sementes de maior tamanho, melhor qualidade nutritiva, resistência a pragas e doenças, apomixia etc.

10.4 ESTRUTURA REPRODUTIVA

O conhecimento da estratégia reprodutiva e meio de propagação de uma espécie indica a forma de distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, bem como facilita escolher as alternativas mais adequadas de métodos de melhoramento. O capim-elefante é uma espécie alógama, protogínica, com grande facilidade para a propagação vegetativa. Desta forma, o aproveitamento da heterose híbrida pode se constituir num processo simplificado, visto que um genótipo superior pode ser selecionado e mantido por meio da propagação vegetativa.

As inflorescências do capim-elefante são classificadas como panículas, muito embora apresentem aparência de espigas. As panículas são de formato cilíndrico, 13 a 30 cm de comprimento, densamente florida por espiguetas isoladas ou em grupos, e as flores podem ser masculinas ou bissexuais. O intervalo entre o aparecimento dos estigmas e das anteras varia de sete a nove dias (Pereira *et al.*, 1997), o que dificulta a autofecundação e facilita a realização dos cruzamentos controlados. As sementes ou cariopses são muito pequenas e, após o amadurecimento, desprendem-se com facilidade da panícula, tornando a sua colheita um processo antieconômico.

A época de florescimento pode variar com a cultivar e com as condições ambientais. Na Região Sudeste, o florescimento, normalmente, ocorre no período de março a agosto. De acordo com Xavier *et al.* (1993) e Pereira (1993), as cultivares podem ser classificadas, quanto à época de florescimento, em precoces (março e abril), intermediárias (abril e maio) e tardias (junho e julho), podendo ocorrer isolamento reprodutivo temporal entre variedades, principalmente entre as precoces e tardias.

A propagação desta forrageira, normalmente, é realizada por meio de estacas vegetativas ou pedaços de colmo. Isto garante que a identidade genética dos clones possa ser mantida a cada geração, bem como possibilita a obtenção de populações mais uniformes. Embora a propagação vegetativa seja o meio preferencial para cultivo do capim-elefante, a espécie é capaz de produzir sementes com variáveis graus de fertilidade entre cultivares. Considerando que as cultivares, na maioria, são clones, as sementes produzidas são originadas de cruzamentos entre plantas do mesmo genótipo (autofecundação), resultando em baixa germinação e plantas com baixo vigor, decorrentes do processo de depressão endogâmica. Essa é uma das razões de não se recomendar a propagação do capim-elefante por meio de sementes.

Por enquanto, as sementes de capim-elefante são pouco utilizadas. Entretanto, a obtenção de cultivares com variação genética intrínseca e sementes de maior tamanho poderão viabilizar o plantio do capim-elefante por meio de sementes.

10.5 GERMOPLASMA

O capim-elefante foi introduzido no Brasil, em 1920, quando foram trazidas para o Estado de São Paulo estacas da cultivar Napier, provenientes de Cuba (Granato, 1924). Posteriormente, diversos outros processos de introdução foram realizados, enriquecendo a variabilidade do germoplasma com outros ecótipos africanos e, mais recentemente, com clones resultantes de programas de melhoramento. A maioria dos processos de introdução de capim-elefante, no Brasil, foi resultante da ação isolada e eventual de pesquisadores e produtores, e tiveram o objetivo de trazer cultivares superiores que pudessem ser utilizadas diretamente nos sistemas de produção. Entre as principais cultivares introduzidas destacam-se Napier, Cameroon, Roxo, Mercker, Anão, Vrukwona, Taiwan A-146, Taiwan A-144, Merkeron, Porto Rico, Cubano e alguns híbridos triplóides e hexaplóides. Não existem registros de expedições de coleta de germoplasma nos centros de diversidade e nem mesmo da introdução de coleções com ampla variabilidade genética.

As principais coleções de capim-elefante do Brasil encontram-se localizadas na Embrapa Gado de Leite, Universidade Federal de Pelotas, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina e Instituto Pernambucano de Agropecuária. Entretanto, a maioria dos acessos destas coleções é comum e foi introduzido do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite - BAGCE. Este Banco apresenta 120 acessos de capim-elefante, 50 acessos de milheto e 15 acessos de outras espécies de *Pennisetum*. O BAGCE reúne a maioria das cultivares existentes no Brasil, bem como realizou introduções de acessos de coleções estrangeiras.

O germoplasma de capim-elefante do BAGCE é geneticamente constituído por clones, populações e cultivares melhoradas de *P. purpureum*, raças cromossômicas (triplóides, hexaplóides) resultantes da hibridação entre *P. purpureum* x *P. glaucum*, acessos de *P. glaucum* e diversas outras espécies selvagens de *Pennisetum*. Apesar desta variação de tipos genéticos, existe um elevado grau de similaridade entre muitos acessos de capim-elefante (Daher *et al.*, 1997), em conseqüência da elevada contribuição de poucos programas de melhoramento, uso reduzido de genitores e da presença de duplicatas, as quais são resultantes, principalmente, da substituição dos nomes originais. Pereira (1999) apresentou uma avaliação sobre a variabilidade do germoplasma de capim-elefante presente nos Bancos de Germoplasma e apontou uma série de fontes de problemas que podem conduzir à conservação de duplicatas.

Para um uso eficiente do germoplasma de capim-elefante, torna-se necessário proceder a um estudo detalhado de caracterização dos acessos. Este processo tem por objetivo avaliar e descrever a variabilidade do germoplasma, bem como localizar características e marcadores morfológicos ou genéticos. Os descritores podem ser morfológicos (botânico-agronômicos) ou bioquímicos de natureza qualitativa. Os descritores mais comuns para capim-elefante referem-se aos caracteres morfológicos (ex.: altura da planta; número, comprimento e diâmetro dos internódios; comprimento e largura das folhas); reprodutivos (ex.: época de florescimento; comprimento,

diâmetro e cor das inflorescências, tamanho da cariopse); agronômicos (ex.: relação folha/colmo, produção de matéria seca) e bioquímicos (ex.: digestibilidade, conteúdo protéico). Os acessos do Banco da Embrapa Gado de Leite encontram-se caracterizados em relação a 30 descritores botânico-agronômicos.

Outra ferramenta poderosa na avaliação de diferenças genéticas entre acessos são as técnicas moleculares. Utilizadas como método auxiliar na caracterização do germoplasma, elas são úteis principalmente na identificação de marcadores genéticos e no processo de eliminação de duplicatas no Banco de Germoplasma.

10.6 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

A contribuição do melhoramento de plantas para as forrageiras tropicais pode ser considerada muito pequena quando se compara com espécies como o milho e soja. No caso do capim-elefante, a maioria das cultivares é constituída por clones selecionados de materiais coletados nas áreas de diversidade da espécie. Pode-se observar nos materiais sob cultivo alguns sinais de espécies não domesticadas como florescimento não sincronizado, sementes minúsculas e deiscentes, e outros caracteres que afetam negativamente o plantio desta forrageira por meio de sementes.

Considerando a existência de uma demanda nacional por cultivares superiores, o objetivo do melhoramento desta forrageira é o desenvolvimento de variedades para uso nos sistemas de pastejo e corte, e que sejam adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas brasileiras. Entre as características que apresentam elevada prioridade nos programas de melhoramento desta forrageira destacam-se: produção de matéria seca, qualidade nutritiva, distribuição estacional da produção, digestibilidade, persistência, resistência ao pisoteio, velocidade de rebrota, propagação via semente, tolerância à seca, eficiência no uso de nutrientes e resistência a cigarrinha-das-pastagens.

O melhoramento da maioria das características de importância forrageira do capim-elefante pode ser conseguido por meio da exploração da variabilidade existente na própria espécie. Porém, considerando a capacidade do capim-elefante de trocar genes com outras espécies de *Pennisetum*, o trabalho de melhoramento pode recorrer à utilização de germoplasma de espécies pertencentes a conjuntos gênicos próximos, como o *P. glaucum e o P. squamulatum.*

O capim-elefante pode ser melhorado adotando-se os mesmos procedimentos desenvolvidos para espécies alógamas. Entretanto, deve-se considerar algumas características específicas da forrageira que, dependendo das circunstâncias, podem contribuir ou dificultar o processo, tais como: alogamia, florescimento protogínico, elevado número de inflorescências por planta, inflorescências grandes com elevado número de flores, florescimento gradual, produção abundante de pólen, propagação vegetativa e por meio de sementes, ciclo vegetativo perene, germoplasma com ampla variabilidade e facilidade de cruzamento interespecífico. Na Figura 4 é apresentado o organograma do programa de melhoramento de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite.

10.7 INTRODUÇÃO DE CULTIVARES

A introdução de cultivares é considerada o mais simples dos métodos de melhoramento, sendo recomendada como a primeira opção, em razão da rapidez na obtenção de resultados e pelos baixos custos envolvidos. Para o capim-elefante a

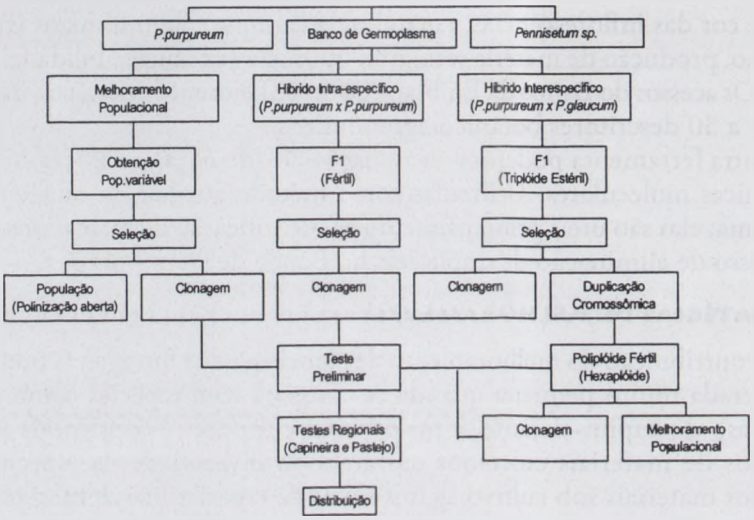


FIGURA 4 - Organograma do Programa de Melhoramento Genético do Capim-elefante da Embrapa Gado de Leite.

chance da introdução de cultivares superiores é considerada pequena, em virtude da raridade dos programas de melhoramento desta espécie forrageira, em desenvolvimento no Brasil e no exterior. Por outro lado, a coleta de ecótipos nos centros de diversidade da espécie apresenta-se como uma excelente oportunidade de introdução de novos tipos e de enriquecimento da variabilidade presente nos bancos de germoplasma.

As mais importantes cultivares de capim-elefante usadas atualmente como Napier, Cameroon, Mercker e Roxo, foram obtidas por meio da introdução de tipos superiores encontrados nas áreas de diversidade da espécie no continente africano.

10.8 HIBRIDAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA

Segundo Hanna (1999), a hibridação entre clones de capim-elefante constitui a melhor estratégia para se obter cultivares superiores. Para seleção dos genitores a serem combinados podem ser adotados diversos critérios, como a complementação alélica e a divergência genética. A distância genética fornece uma estimativa da capacidade combinatória entre genótipos possibilitando a seleção de genitores que melhor combinem entre si, produzindo progênies segregantes com elevado grau de heterose. Estas estimativas normalmente são obtidas por meio de análises multivariadas, tendo por base dados do trabalho de caracterização botânico-agronômica, bioquímica e molecular. Na impossibilidade de se obter essas estimativas, Hanna (1999) sugere o intercruzamento entre vários clones, com diferentes características genéticas, como método de se obter progênies superiores.

Os cruzamentos controlados podem ser realizados, manualmente, em condições de campo ou em casa de vegetação. No campo, selecionam-se as inflorescências antes da abertura da flor (estádio de "emborrachamento"), protegendo-as com sacos de papel, de modo que impeça a ocorrência de cruzamentos naturais. No momento em que os estigmas estiverem receptivos, o pólen é coletado do genitor

masculino e colocado sobre os estigmas do genitor feminino, sendo mantida a proteção das inflorescências até a colheita das sementes. Embora o capim-elefante apresente flores masculinas e femininas na mesma inflorescência, o risco de autopolinização é pequeno, visto que a espécie apresenta um intervalo de protoginia variando de seis a nove dias (Pereira *et al.*, 1997).

Nos cruzamentos realizados em campo, muitas inflorescências já protegidas podem quebrar-se por ação do vento, visto que as ráquis de sustentação das mesmas são muito frágeis. Este problema pode ser evitado colhendo-se as inflorescências antes da abertura, no estádio de "emborrachamento", e colocando-as em uma solução nutritiva até o completo desenvolvimento das sementes (Schank & Chynoweth, 1993). Esta solução é preparada com 2% de sacarose e 0,2% de hidroxiquinoleína. Nestas condições mais controladas pode-se realizar os cruzamentos com maior facilidade e com menor índice de perda.

Após obtenção das sementes dos cruzamentos, estas são colocadas para germinar, iniciando-se o processo de seleção entre e dentro de famílias. As melhores progênies são clonadas, avaliadas em linhas clonais, passando a seguir para os testes locais e regionais sob sistema de corte e de pastejo. Para ser liberada, além da superioridade agronômica, uma nova cultivar deve apresentar um bom desempenho sobre a produção animal.

O programa de melhoramento de forrageiras da Embrapa Gado de Leite liberou, recentemente, uma nova cultivar de capim-elefante destinada ao uso sob pastejo, denominada Pioneiro (Pereira *et al.*, 1997). Esta cultivar, que foi obtida do cruzamento de dois acessos de capim-elefante selecionados no BAGCE, constitui o primeiro material desenvolvido para utilização no sistema de pastejo rotativo. A cultivar Pioneiro caracteriza-se por apresentar toucarias de formato aberto, grande número de brotasses aéreas e basais, colmos finos e folhas eretas. O florescimento normalmente ocorre no mês de abril. Destaca-se, ainda, pelo elevado poder de brotarão das estacas, crescimento vigoroso e rápida expansão das toucarias, ocupando as falhas existentes na pastagem, resultando numa maior cobertura do solo.

10.9 HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA

A proximidade genética entre o capim-elefante (*P. purpureum)* e o milheto (*P. glaucum*) possibilita a obtenção de híbridos entre estas duas espécies com relativa facilidade. Deste cruzamento resulta um híbrido interespecífico triplóide, estéril, que morfologicamente se assemelha ao capim-elefante e apresenta algumas características intermediárias entre as duas espécies parentais. Este tipo de combinação genética busca reunir no híbrido algumas das características desejáveis do milheto, tais como qualidade da forragem, resistência à seca e tolerância às doenças, com a rusticidade, agressividade, perenidade e a elevada produtividade de matéria seca do capim-elefante (Diz, 1994; Schank *et al.*, 1993). Segundo Jauhar (1981), a forragem destes híbridos interespecíficos apresenta melhor aceitação pelos bovinos que o próprio capim-elefante. O esquema geral para obtenção de híbridos entre estas duas espécies é apresentado na Figura 5.

Os triplóides e hexaplóides têm sido considerados como importantes fontes de variação para seleção de novos clones superiores. Entre os híbridos triplóides

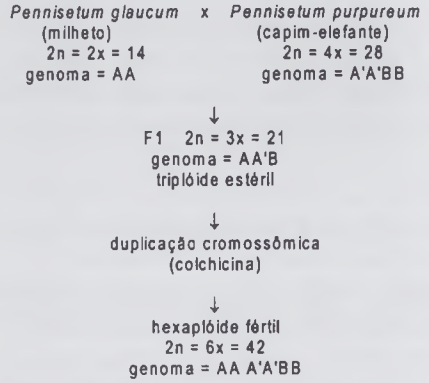


FIGURA 5 - Metodologia de obtenção de híbridos triplóides e hexaplóides de capim-elefante x milheto.

observa-se grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionados materiais com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante (Pereira, 1998). Entretanto, a maioria dos híbridos tem mostrado florescimento precoce, característica considerada indesejada em forrageiras, por reduzir a produção de matéria seca de folhas. Os programas de melhoramento têm procurado contornar este problema cruzando-se cultivares de florescimento tardio das duas espécies.

Os hexaplóides, embora menos estudados, apresentam como vantagens a produção de sementes com maior tamanho e elevado poder germinativo. Segundo Schank (1999), os hexaplóides apresentam um grande potencial de utilização, uma vez que podem ser propagados por meio de sementes com maior facilidade que o capim-elefante tetraplóide.

10.10 MELHORAMENTO POPULACIONAL

O melhoramento do capim-elefante pode ser conduzido por dois caminhos básicos: obtenção de clones e melhoramento populacional. O processo de obtenção de clones constitui um método mais simples, uma vez que identificado um genótipo superior, ele pode ser mantido por propagação vegetativa. Este procedimento constitui a estratégia mais comumente utilizada pelos melhoristas, sendo responsável pela obtenção da maioria das cultivares disponíveis. Entretanto, o melhoramento por este processo depende, fundamentalmente, da existência de distância genética ou complementaridade alélica que resulte em uma boa capacidade combinatória entre os clones parentais.

No caso do melhoramento populacional, o processo de seleção baseia-se no aumento da freqüência de genes favoráveis, resultando numa população superior à original. Diversos fatores, como variabilidade genética da população base, tamanho da população, método de seleção empregado e influência ambiental devem ser considerados por interferirem no sucesso da seleção.

O capim-elefante é uma espécie alógama, com propagação preferencialmente vegetativa, sendo que o melhoramento populacional desta forrageira deve ser precedido da obtenção de uma população geneticamente heterogênea. Pode-se obter esta população por meio do intercruzamento de diferentes fontes de germoplasma selecionadas com base em critérios como superioridade agronômica, diversidade genética e complementação alélica.

Um dos objetivos da obtenção de uma população geneticamente variável seria o desenvolvimento de variedades propagadas por meio de sementes que não apresentem perda de vigor em relação aos seus genitores. Em capim-elefante, as sementes da maioria das cultivares (clones) resultam de autofecundação (cruzamento

entre plantas do mesmo genótipo), dando origem a progênies com baixa taxa de germinação e vigor, por efeito da depressão endogâmica. Dessa forma, a obtenção de populações melhoradas constitui uma alternativa viável para o desenvolvimento de cultivares com propagação por meio de sementes. Outra alternativa, ainda não explorada no melhoramento do capim-elefante, é o melhoramento de linhagens endogâmicas visando à obtenção de híbridos. O melhoramento voltado para a obtenção de híbridos de linhagens, intra e interespecíficos, constitui um caminho de amplas possibilidades para o capim-elefante.

Após a seleção e intercruzamento dos genitores (clones) para constituir uma população variável, são necessários de três a quatro ciclos de recombinação para restaurar o equilíbrio genético. A seleção recorrente tem sido o método mais recomendado para o melhoramento populacional, por apresentar a vantagem de conseguir o aumento da freqüência dos genes favoráveis sem causar uma drástica perda na variabilidade genética.

Recentemente, a Embrapa Gado de Leite iniciou um programa de melhoramento intrapopulacional de capim-elefante e, interpopulacional, entre capim-elefante e milheto, objetivando a obtenção de populações de ampla base genética e com boa capacidade de combinação geral e específica.

11. MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Panicum maximum*

Gramíneas do gênero *Panicum maximum* têm sido cultivadas nas Américas desde os tempos coloniais (Bogdan, 1977). Originárias de solos férteis da África, vieram como cama de escravos nos navio negreiros (Parsons, 1972), e devido à boa adaptação no Brasil e ao alto valor nutritivo, logo se consagraram como excelentes forrageiras. *Panicum maximum*, tal qual o capim-elefante, é exigente quanto à fertilidade do solo, necessitando reposição de nutrientes depois de alguns anos de cultivo.

Muitas cultivares de *Panicum maximum* têm sido liberadas no exterior, Makueni, Gatton, Green Panic, Likoni e, no Brasil, Centenário, Vencedor, Tobiatã, Aruana, Centauro, Tanzania-1 e Mombaça, a maioria selecionada entre os acessos disponíveis nos bancos de germoplasma. Apesar da espécie incluir genótipos sexuais, apomíticos e apomíticos facultativos, a maioria das cultivares é composta por ecótipos silvestres coletados nas áreas de ocorrência natural da espécie e selecionados com base no desempenho agronômico (Hacker & Jank, 1998).

Panicum maximum divide o espaço no mercado sementeiro no Brasil com as braquiárias. Normalmente, cultivares de *Panicum* são recomendadas para categorias animal mais exigentes e solos de melhor fertilidade, enquanto as braquiárias são, em geral, utilizadas para a cria e recria do rebanho em solos mais fracos e ácidos, complementando-se como forrageiras importantes nos sistemas de produção de carne brasileiros. Também na produção de leite, e não só no Brasil, o *Panicum maximum* tem-se revelado importante, seja para pastejo direto ou para silagem e feno (Hacker & Jank, 1998). A cultivar Likoni, selecionada em Cuba, foi recomendada para produção de leite na forma de silagem, visto que nesta forma de utilização apresentou resultados 22% e 44% superiores à grama estrela e aos híbridos de capim-elefante x milheto (Esperance & Diaz, 1985).

No 12°. Simpósio sobre Manejo da Pastagem (Simpósio, 1995), foram discutidos diversos aspectos da biologia, manejo e utilização do *Panicum maximum*, constituindo-se seus anais importante fonte de referência.

11.1 ORIGEM

O gênero pertence à tribo Paniceae e compreende cerca de 500 espécies, que, segundo Bogdan (1977), encontram-se amplamente distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo. O gênero inclui várias espécies de valor forrageiro, porém poucas têm grande expressão na produção animal, como *Panicum maximum*, uma das mais importantes forrageiras na produção de carne desde os tempos coloniais. O gênero *Panicum* chegou a incluir outros gêneros como *Brachiaria* e *Paspalum*, que foram posteriormente desmembrados.

O *Panicum maximum*, também conhecido como capim-guiné, capim-colonião, ou sempre verde é nativo da África do Leste, estendendo-se até o subtrópico da República Sul Africana. Ocorre nas bordas de florestas, capões e savanas com poucas árvores. Cresce bem em solos leves e não encharcados sob alguma sombra, desde o nível do mar até cerca de 1.800 m de altitude e acima de 700 mm de chuvas anuais.

É uma espécie de morfologia muito variável com vários tipos dignos de serem reavaliados taxonomicamente. Dois merecem atenção especial: var. *trichoglume* (*Green panic* ou *Petrie*) de porte baixo e folhas finas, e o tipo "Embu", encontrado no Quênia, diferindo de outras variedades de *P. maximum* pela emissão de longos colmos basais, radicantes e de folhas quase lanceoladas, apesar de flores típicas da espécie (Bogdan, 1977).

A primeira coleta, organizada após extensos estudos em herbários e documentos, sobre a origem e distribuição da espécie, foi feita pelo ORSTOM (*Institute Français de Recherche Scientifique pour le Developpment en Coopération*), no Quênia e Tanzânia em 1967 (Combes & Pernés, 1970). Esta expedição resultou na coleta de 249 amostras de significativa variabilidade genética de *P. maximum* e ainda de uma planta sexual diplóide. Dois anos depois, nova expedição dirigida para a coleta de outras plantas sexuais, na mesma região, resultou na obtenção de 21 amostras de tipos sexuais e outras 135 apomíticas. Esta coleção foi conservada na estação experimental do ORSTOM – Costa do Marfim e, por 12 anos, pesquisadores estudaram características básicas sobre citologia, morfologia, genética e herança da apomixia (Savidan, 1982b).

O alto valor forrageiro e grande interesse do Brasil em aumentar a variabilidade disponível de *P. maximum* levou a Embrapa a firmar um convênio com o ORSTOM em 1982, o que viabilizou a transferência do germoplasma para a Embrapa Gado de Corte. Esta coleção é a mais completa da espécie e considerada representativa da variabilidade existente no continente de origem.

11.2 GERMOPLASMA

Uma coleção de germoplasma de *Panicum maximum* com ampla variabilidade foi coletada na África, tendo sido avaliada e conservada na Costa do Marfim. Em 1982, esta coleção foi introduzida no Brasil e incorporada ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte (Savidan *et al.*, 1985). A coleção consistiu de 426 acessos

apomíticos e várias plantas sexuais, que, após uma criteriosa avaliação morfológica seguida de avaliação agronômica, foi descrita num catálogo publicado por Jank *et al.* (1997). Uma descrição detalhada e ilustrada com fotografias dos 25 acessos mais promissores entre 183 avaliados foi apresentada por Savidan *et al.* (1990).

Os principais bancos de germoplasma de *P. maximum* encontram-se localizados no Brasil (Embrapa Gado de Corte), no CIAT e em Cuba, sendo os acessos conservados em condições de campo. Na França, o ORSTOM tem conservado uma grande coleção por meio de sementes.

11.3 CITOGENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO

Como relatado em *Brachiaria*, *Panicum maximum* também é caracterizado por apomixia associada à poliploidia. O número básico de cromossomos é n=8 e a apomixia resulta da formação de um ou vários sacos embrionários por aposporia (não redução do número cromossômico) seguida de partenogênese (não fecundação da célula-ovo) como apresentado na Figura 2.

Em 1969, 500 acessos de *P. maximum* foram estudados quanto ao modo de reprodução na Costa do Marfim. Destes, apenas 22 foram identificados como sexuais e diplóides. Entre 1971 e 1973, pesquisadores japoneses coletaram 140 acessos de *Panicum maximum* na África do Leste (Hojito & Horibata, 1982) e entre o material coletado conseguiram isolar uma planta sexual e diplóide (Nakajima *et al.*, 1979).

O estudo da herança da apomixia foi realizado por meio de análises citoembriológicas das progênies de cruzamentos de plantas sexuais por apomíticas em nível tetraplóide e o modelo sugerido foi o do controle monogênico com dominância da apomixia sobre a sexualidade (Savidan, 1983). A apomixia em *P. maximum* é freqüentemente facultativa mas com um percentual baixo de sexualidade residual, portanto produzindo poucas progênies segregantes (Savidan, 1982a). Citogenética e embriologia de híbridos foram estudadas em detalhe e descritas por Savidan (1980; 1982a).

11.4 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

O modelo de seleção e melhoramento de forrageiras tropicais, seguindo as fases descritas na Figura 1, vem sendo observado na Embrapa Gado de Corte com o germoplasma de *P. maximum*. O programa visa selecionar, a partir da variabilidade introduzida ou gerada via melhoramento genético, acessos apomíticos para serem liberados comercialmente e, assim, contribuir para uma maior diversificação das pastagens no Brasil (Jank *et al.*, 1997). Tais acessos e híbridos deverão apresentar boa produção forrageira com distribuição da produção mais equilibrada do que a cultivar Colonião, alta produção de sementes, bom valor nutritivo e resistência a pragas e doenças. Outros objetivos incluem a seleção de cultivares apomíticas que associem boa produção forrageira com o hábito estolonífero, presente em alguns acessos de pouco valor agronômico.

Objetivos específicos de melhoramento devem ser estabelecidos mediante uma caracterização detalhada do ambiente e da forma em que se pretende utilizar as cultivares melhoradas, assim como toda a experiência prévia de avaliação do germoplasma natural.

11.5 SELEÇÃO E AVALIAÇÃO AGRONÔMICA

A coleção de *Panicum* da Embrapa Gado de Corte, com 426 acessos, foi avaliada em três campos, em pequenas parcelas, sob cortes periódicos. Os parâmetros avaliados incluíram produção forrageira anual e estacional (matéria verde e seca), porcentagem de folhas, velocidade e densidade de rebrota, produção de sementes, resistência a insetos e doenças, resistência ao frio e teores de proteína bruta. Nas mesmas parcelas em que foram feitas as avaliações agronômicas, fez-se também a descrição morfológica com o objetivo de formar grupos de acessos similares, a fim de facilitar a seleção de genitores para uso em hibridações. Os descritores utilizados, as características morfológicas e agronômicas da coleção foram apresentados por Jank *et al.*(1997). Dos primeiros 156 acessos avaliados em canteiros, 40% apresentaram produções superiores e menor estacionalidade do que a testemunha (cultivar Colonião); a média de produção anual total e de folhas dos dez melhores acessos (44 e 33 t/ha/ano, respectivamente) foi o dobro da apresentada pelo Colonião e a adubação influenciou significativamente a produção (Jank *et al.*, 1994). Uma Rede Nacional de Ensaios avaliou os 25 acessos mais promissores entre 1988 e 1990 (Savidan *et al.*, 1990). Os genótipos selecionados foram capazes de mostrar adaptação a todos ou a alguns dos ambientes estudados (Jank *et al.*, 1993). Paralelamente, foram conduzidos experimentos visando estudar resistência a cigarrinha-das-pastagens, produção de sementes e exigência em fertilidade dos solos (Jank *et al.*, 1997). O efeito do pastejo foi avaliado para os sete melhores acessos na fase seguinte, em piquetes de 1.000 m^2, durante dois anos (Euclides *et al.*, 1995). Três desses passaram aos ensaios para avaliação de desempenho animal e, como resultado desta extensa avaliação, a Embrapa Gado de Corte liberou a cv. Tanzânia-1, em 1990, e a cv. Mombaça, em 1993. Ambas já alcançaram repercussão nacional e sementes vêm sendo exportadas para a América do Sul e Central.

A grande amplitude de variação encontrada na coleção para todos os parâmetros avaliados permite que novas seleções sejam realizadas para identificar outros acessos superiores ao Colonião.

11.6 PROGRAMAS DE CRUZAMENTOS

Vários métodos de hibridação foram testados em *P. maximum* na Costa do Marfim (Savidan, 1982a) e o método mais eficiente demonstrou ser o de blocos de policruzamento, em que uma planta sexual foi plantada no meio de uma parcela do genitor apomítico e híbridos foram produzidos por polinização aberta. Plantas sexuais poliploidizadas eram auto-estéreis, porém os híbridos sexuais mostraram maior autocompatibilidade. Todos os métodos de ensacamento de inflorescências, seja no campo ou na casa de vegetação, favoreceram a autopolinização das espiguetas. Já nos blocos de policruzamento, por polinização, aberta foram recuperadas sementes híbridas nas plantas sexuais.

O melhoramento genético de plantas apomíticas pode ser realizado por meio de cruzamento do tipo: planta sexual x apomítica ou planta apomítica facultativa com alta taxa de sexualidade x apomítica, quando sexualidade não houver sido encontrada.

Métodos de melhoramento para *P. maximum* foram propostos por Smith (1975), envolvendo cruzamentos de plantas apomíticas facultativas por apomíticas. Ele baseou sua proposta em conhecimentos ainda incompletos sobre a variabilidade da espécie ou da biologia da reprodução e, no entanto, exaltou as vantagens da apomixia no melhoramento de plantas: capacidade de fixar genótipos híbridos superiores, vigor híbrido e facilidade de hibridação. Porém, cada ciclo levava três anos: um ano para realizar os cruzamentos, outro para cultivar as progênies e um terceiro para avaliar modo de reprodução e selecionar os apomíticos. Já Savidan *et al.* (1989) de posse de profundos conhecimentos sobre a herança da apomixia nesta espécie, conseguiram realizar um ciclo por ano no Brasil, obtendo sementes em maio, germinando-as em agosto/setembro e plantando-as no início das chuvas para florescerem em abril e terem seu modo de reprodução determinado por estudo dos sacos embrionários em maio do ano seguinte. Além disso, o trabalhoso sistema de polinização artificial mútua proposto por Smith (1975), usando plantas facultativas apomíticas, foi substituído por plantas sexuais auto-incompatíveis, sob polinização aberta, em parcelas do genitor apomítico no Brasil.

Plantas resultantes de autofecundação são facilmente detectadas por apresentarem folhas retorcidas e baixo vigor, como resultado da depressão endogâmica. Savidan *et al.* (1989) propuseram dois esquemas para a transferência de características desejáveis (Figura 6), como por exemplo o hábito estolonífero (HE): um (A) iniciando com planta sexual de alta produção (SP) e outro (B) com apomítica de alta produção (AP).

Como a maior variabilidade está no germoplasma apomítico de *P. maximum*, o esquema A deveria ser mais utilizado do que B. A vantagem de B é que a cada ciclo já é possível selecionar ecótipos apomíticos passíveis de integrarem o esquema de avaliação da Figura 1 e, se incorporaram características superiores, tornarem-se candidatos a uma nova variedade. Uma variação de B vem sendo utilizada na Embrapa Gado de Corte: na expectativa de combinar alta produtividade das plantas sexuais com o hábito estolonífero de cinco apomíticos, os melhores híbridos sexuais são

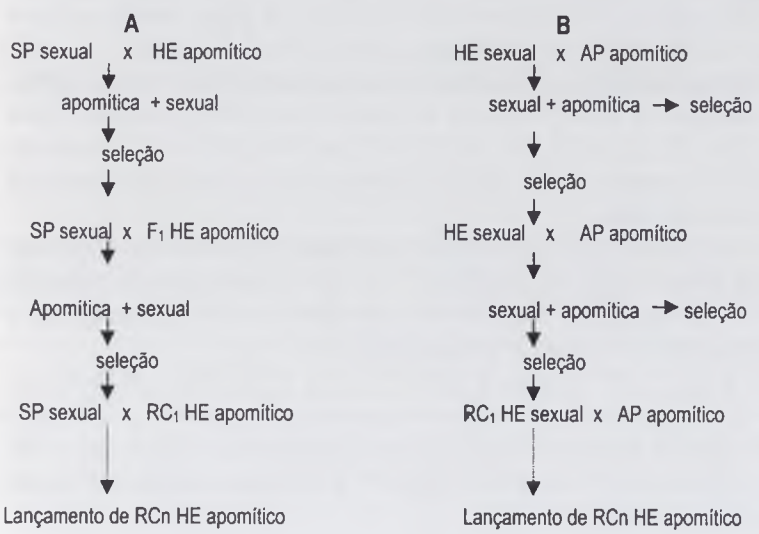


FIGURA 6. Esquemas de cruzamento para transferência de caracteres em *Panicum maximum*.

retrocruzados com o genitor apomítico estolonífero a cada ciclo (Jank, 1995). Os híbridos sexuais são substituídos na parcela do genitor apomítico no campo e a polinização é livre. Problemas de sincronismo de florescimento têm limitado a obtenção de progênies numerosas. Já se dispõe de 98 híbridos selecionados e vários apresentam a característica estolonífera, mas a herança desta característica ainda não foi estudada.

Também no Japão há trabalhos de melhoramento de *P. maximum* com o objetivo de obter cultivares para regiões temperadas e subtropicais, mesmo que para utilização como plantas anuais. Nakajima *et al.* (1979) isolaram plantas sexuais a partir de uma coleção e iniciaram cruzamentos para produção de linhagens sexuais diplóides. A cultivar Natsukaze resultou da seleção em uma população sexual de polinização aberta e é hoje amplamente utilizada para produção de feno (Sato *et al.*, 1993). Uma outra cultivar, cv. Natsuyutaka, foi selecionada a partir de ecótipos apomíticos africanos e é cultivada como planta perene nas ilhas do sudoeste do Japão (Shimizu *et al.*, 1993). No programa japonês estão sendo realizados cruzamentos sexual x apomítico, após duplicação dos diplóides sexuais por colchicina e estudo do controle genético da apomixia.

Assim como no caso de *Brachiaria*, a importância desta espécie para a pecuária brasileira, a riqueza de germoplasma disponível e o conhecimento acumulado justificam plenamente um amplo esforço de equipes multidisciplinares, a fim de culminar no lançamento de variedades melhoradas.

12. MELHORAMENTO GENÉTICO DA ALFAFA

A intensificação dos sistemas de produção de leite gera uma demanda por informações sobre volumosos de alto valor nutritivo para a alimentação do rebanho leiteiro. Esta intensificação vem ocorrendo, notadamente, nas principais bacias leiteiras das Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do País. Nestes sistemas são utilizados animais de maior potencial genético e que, portanto, exigem alimentos volumosos de alta qualidade.

A alfafa é considerada a mais importante forrageira de clima temperado por reunir algumas das mais desejadas características como alto valor nutritivo, elevada produção de massa verde, palatabilidade e digestibilidade (Carvalho & Vilela, 1994). Esta forrageira por apresentar alta qualidade e elevado custo de produção é mais recomendada para vacas de alta produção; sendo que, um dos obstáculos à expansão da cultura no Brasil é a inexistência de cultivares adaptadas às condições tropicais, presentes na maior parte do País.

A obtenção de novas cultivares, mais adaptadas ao ambiente tropical, possibilitará o seu cultivo em outras regiões brasileiras, com conseqüente incremento da área de exploração, assegurando, dessa forma, um alimento de alta qualidade e produtividade nos sistemas intensivos de produção de leite.

Atualmente, a área cultivada com alfafa alcança 32 milhões de hectares, localizados, principalmente, em países de clima temperado. Entretanto, 70% desta área situa-se em três países: Estados Unidos, Rússia e Argentina (Michaud *et al.*, 1988). No Brasil, o cultivo da alfafa ainda é incipiente e está concentrado na Região Sul, sendo explorados cerca de 26.000 ha.

Apesar de reunir algumas das mais importantes características forrageiras, a alfafa vem apresentando uso limitado nas regiões tropicais, possivelmente em decorrência dos seguintes fatores: as gramíneas tropicais são abundantes e normalmente de alta produtividade; ainda não foram desenvolvidas cultivares específicas para as condições tropicais e, comparativamente, o cultivo da alfafa requer maiores cuidados e investimentos do que as gramíneas.

O custo e a qualidade da alimentação constituem os fatores básicos que determinam a possibilidade de incremento da produtividade em animais de elevado padrão genético. Para esses animais, têm sido crescente o interesse pelo uso da alfafa, devido à sua qualidade e resposta econômica em relação a outros tipos de alimentos. As formas mais comuns da sua utilização têm sido o feno, a silagem e o pastejo, existindo cultivares específicas para cada tipo de uso (Carvalho & Vilela, 1994).

Um importante fator que condiciona a adaptação da alfafa é a suscetibilidade a doenças e pragas, cuja incidência é influenciada pela intensidade de chuvas (Melton *et al.*, 1988). As doenças e o ataque de insetos podem ocorrer nas folhas, caules, raízes e sementes (Leath *et al.*, 1988; Manghitz & Ratcliffe, 1988), sendo mais freqüentes sob condições de umidade elevada. O ataque de insetos e doenças, principalmente nas folhas, ocasiona um aumento na relação caule/folha com reflexos negativos na qualidade da forragem, aumentando, conseqüentemente, o teor de fibras e diminuindo a concentração de proteína (Marten *et al.*, 1988).

12.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO

A alfafa (*Medicago sativa*, L.) é uma leguminosa perene, originária, provavelmente, do sudeste da Ásia, e que apresenta uma ampla área de distribuição natural através dos territórios da Turquia, Iraque, Irã, Afeganistão, Pakistão, norte da Índia e região montanhosa do Cáucaso. A espécie foi introduzida na Europa, por meio dos persas, cerca de 490 a.C. e, na América, inicialmente no México, em 1519, pelos espanhóis. Posteriormente, seguiu para o Peru, Chile e Argentina, que é, atualmente, um dos seus principais produtores. No Brasil, foi introduzida no Rio Grande do Sul através de imigrantes europeus e (ou) provenientes do Uruguai e Argentina. Cultivada inicialmente nos vales dos rios das regiões coloniais, posteriormente foi difundida para os Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e, mais recentemente, Minas Gerais, que são os principais produtores desta forrageira no País (Fontes *et al.*, 1994).

A produção brasileira de alfafa é muito pequena, em torno de 180 mil toneladas anuais, não atendendo a demanda atual, que seria pelo menos o dobro, considerando apenas aqueles animais mais valorizados. Isto leva à necessidade de importação de alfafa dos países vizinhos. As dificuldades para expansão do cultivo da alfafa vão desde o desconhecimento da cultura, passando pelos aspectos de fertilidade do solo, manejo, produção de sementes, até a necessidade de seleção de material mais adaptado.

Lesins & Lesins (1979) baseando-se na morfologia das vagens e das sementes, classificaram o gênero *Medicago* em quatro subgêneros: *Medicago, Lupularia, Orbicularia* e *Spirocarpos*. Estes subgêneros compreendem no total 55 espécies das quais 21 são perenes, 33 são anuais e uma é de longevidade variável. O subgênero *Medicago* compreende quatro seções: *Falcago, Arborea, Marinae* e *Suffruticosae*. A

seção *Falcago* comporta quatro subseções: *Falcatae, Rupestres, Daghestanicae* e *Papillosae.* A subseção *Falcatae* compreende cinco espécies: *falcata, sativa, glomerata, glutinosa* e *prostrata.*

Mais da metade das variedades e populações de alfafa cultivadas são originárias do intercruzamento entre *Medicago sativa* ssp. *sativa* e *Medicago sativa* ssp. *falcata.* Devido à alogamia e à estrutura autotetratraplóide das formas cultivadas deste complexo de subespécies, uma grande diversidade genética é encontrada entre populações originárias de diferentes regiões geográficas e também no interior destas populações (Crochemore, 1998).

As espécies anuais de *Medicago* são autógamas, originando progênies uniformes; enquanto que, as perenes são alógamas com diferentes níveis de auto-incompatibilidade. Às vezes é possível ocorrer a autofecundação em algumas espécies perenes alógamas, mas normalmente as plantas apresentam necessidade da presença de insetos para a polinização e fecundação. Devido à sua alogamia, estas espécies são fortemente polimorfas (Quiros & Bauchan, 1988).

12.2 DESCRIÇÃO DA PLANTA E CITOGENÉTICA

Entre todas as forrageiras consideradas de alto valor nutritivo, a alfafa é a mais utilizada em países de pecuária leiteira desenvolvida, sendo empregada sob a forma de feno, pastejo, verde picado ou silagem pré-secada. Sob a forma de feno, a alfafa combina características de alta produção de matéria seca, alto teor de proteína, minerais e vitaminas com grande aceitabilidade pelos animais. Daí, ser o feno de alfafa o volumoso mais popularmente utilizado na alimentação de vacas de alta capacidade produtiva (Vilela, 1998).

Uma das principais características da alfafa é a sua alta capacidade de adaptação a climas e altitudes variados, podendo ser cultivada em quase todo o mundo. Esse fato deve-se à sua ampla variabilidade genética que é devido à alogamia e à estrutura autotetraplóide das formas cultivadas. A alfafa de flor amarela (*M. falcata*), por exemplo, sobrevive a temperaturas inferiores a –26°C no Alasca e, algumas cultivares comuns (*M. sativa*) são cultivadas no Vale da Morte da Califórnia (EUA), com temperaturas de até 54°C (Hanson *et al.*, 1978).

A planta apresenta flores completas, polinização cruzada predominante, sofrendo grande depressão por endogamia (Busbice, 1968; Wilsie, 1968). A polinização é entomófila, praticada principalmente por abelhas. A espécie é autotetraplóide (2n = 4x = 32), com herança complexa de caracteres de importância econômica e, ainda, apresenta mecanismos eficientes de auto-incompatibilidade, que se manifestam pela baixa eficiência dos gametófitos masculinos na autofertilização e pela reduzida capacidade de inibição do crescimento do tubo polínico em situação de autofertilização (Barnes *et al.*, 1972; Viands *et al.*, 1988).

Fundamentalmente, os autotetraplóides diferem dos diplóides quanto ao seu comportamento citogenético em virtude da presença de quatro, em vez de dois, cromossomos homólogos. Bingham (1979), revisando os aspectos teóricos da ocorrência de heterose na alfafa, mostrou que o vigor decresce da condição tetralélica (a_1, a_2, a_3, a_4) para a condição monoalélica (a_1, a_1, a_1, a_1). Assim, o vigor se mostra inversamente proporcional ao nível de endogamia do genótipo individual.

Este aspecto do comportamento genético dos autopoliplóides requer a tomada de cuidados especiais durante as fases do programa de melhoramento, de modo que evite os efeitos indesejáveis da endogamia. Dessa maneira, a criação de uma cultivar superior de alfafa, segundo Rumbaugh *et al.* (1988), pode ser conseguida através do aumento da freqüência dos genes favoráveis para os caracteres de interesse, ao mesmo tempo em que se procura reter uma base genética, suficientemente ampla, de forma a evitar a ocorrência de depressão endogâmica em gerações avançadas.

12.3 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

Na alfafa e em outras espécies forrageiras perenes, normalmente, são buscadas características morfológicas, fisiológicas e agronômicas que promovam o rendimento e a qualidade da forragem e a persistência das plantas, em sistemas de produção. O potencial de rendimento de matéria seca da alfafa cultivada situa-se em torno de 22 t/ha/ano. Este potencial não é atingido, na maioria das situações, por limitações do ambiente, considerado de uma forma ampla.

O programa de melhoramento genético de alfafa da Embrapa Gado de Leite tem os seguintes objetivos gerais: resistência combinada às principais pragas (pulgão verde, azul e negro) e doenças (antracnose e mancha foliar amarela), maior persistência, menor grau de repouso invernal e maior potencial para produção de forragem e sementes.

Os métodos de melhoramento utilizados em alfafa podem ser divididos em duas categorias: melhoramento interpopulacional e intrapopulacional. O melhoramento interpopulacional baseia-se no fluxo de genes entre populações, proporcionado pela polinização livre ou dirigida. Incluem-se nesta categoria desenvolvimento de linhagens, retrocruzamentos, obtenção de sintéticos, cruzamento de linhagens e produção de híbridos. Já no melhoramento intrapopulacional, o que se busca é aumentar a freqüência de genes favoráveis dentro de uma mesma população de plantas (Paim, 1994).

Para espécies autopoliplóides, como a alfafa, um dos métodos de melhoramento interpopulacional que proporciona melhores possibilidades de ampliar a base genética e preservar genes favoráveis é a constituição de populações sintéticas. De acordo com Hanson *et al.* (1972), os sintéticos podem ser considerados como uma fonte de material melhorado e atuam como uma eficiente forma de conservação de genes.

O termo sintético, para designar um composto genético com diferentes contribuições, tem recebido vários tipos de definições. Para Tysdal & Crandal (1948), um sintético de alfafa se origina do cruzamento, compostagem ou plantio conjunto de duas ou mais linhagens ou clones sendo as sementes colhidas e plantadas em *bulk* por gerações sucessivas. O número de gerações recombinantes necessárias para o sintético atingir o equilíbrio pode variar com a espécie e o número de genótipos policruzados.

Rumbauch *et al.* (1988) chamam a atenção para o fato de que, embora a produção de um sintético seja relativamente simples, a etapa de seleção dos genitores para o Sin 0 assume uma importância fundamental, visto que ela determina o potencial genético do mesmo. A decisão sobre quantos e quais genótipos devam ser incluídos fixa ou determina a amplitude da base genética e o grau de endogamia que poderá ser alcançado em gerações sucessivas.

Kehr *et al.* (1960) utilizando sintéticos de alfafa de base genética estreita, em que o número de genótipos variou de dois a seis, demonstraram que a produção de forragem diminui após algumas gerações, especialmente do Sin 1 para o Sin 2. Em outro estudo, Kehr *et al.* (1989) mostraram que a combinação de 100 ou mais clones pode produzir um sintético mais estável em relação àqueles de base estreita.

Uma alternativa prática para obtenção de sintéticos superiores é através do emprego de um número elevado de genótipos com significativo grau de divergência e complementação alélica. Desta maneira, pode-se obter populações com base genética ampla, as quais apresentam maiores possibilidades para o melhoramento.

O método intrapopulacional utiliza diferentes formas de seleção para melhorar características dentro da população. A unidade de seleção pode ser plantas individuais ou famílias de plantas. Os procedimentos intrapopulacionais têm sido eficientes para caracteres com alta herdabilidade como aumento de resistência a pragas e doenças. Vários procedimentos são usados em plantas individuais, e com freqüentes modificações, como: seleção massal, seleção materna, seleção de linhas clonais e testes de progênies. Na seleção de famílias, a diferença para os procedimentos massais é o uso do teste de progênie, com seleção de famílias de meio-irmãos, irmãos completos, seleção dentro das famílias e combinações de seleção dentro e entre famílias, como a seleção de linhas maternas (Paim, 1994).

Em outros países, os ganhos obtidos em rendimento de forragem, através de trabalhos de melhoramento, quando comparados com aqueles obtidos em culturas para grãos, têm sido muito pequenos. Várias são as razões deste lento progresso em rendimento da alfafa. Obviamente, a condição perene é a mais importante, seguida da acumulação de produtos da fotossíntese para sobrevivência durante o inverno.

Em espécies perenes, a necessidade de avaliação, por diversos anos, antes da tomada de decisão quanto ao material a ser selecionado, faz com que os ciclos sejam prolongados. A alfafa já apresenta naturalmente um alto potencial de produção de forragem de boa qualidade, e vários fatores não-genéticos, como manejo de cortes, fertilidade do solo, métodos de colheita e armazenamento, têm contribuído para o aumento da produção de feno. Com os trabalhos de melhoramento, os resultados mais significativos no aumento de produtividade têm sido obtidos com a incorporação de resistência a pragas e moléstias. A resistência muitas vezes representa a diferença entre o fracasso e o estabelecimento de um alfafal produtivo e persistente (Hill *et al.*, 1988).

Outra característica importante para viabilizar o uso de uma cultivar e preservar a sua adaptação, pela interação genótipo-ambiente, é a produção local de sementes. Neste particular, a alfafa Crioula precisa ser melhor estudada, desde o aspecto de manejo até a seleção de tipos melhor adaptados. Atualmente, muitos híbridos entre espécies de *Medicago* têm sido obtidos, outros tantos serão obtidos no futuro, por meios sexuais associados a resgate de embriões ou por via somática com fusão de protoplastos. Estes híbridos serão muito importantes para a transferência de caracteres para alfafa cultivada, ampliando as possibilidades de melhoramento da cultura (McCoy & Bingham, 1988).

12.4 CARACTERÍSTICAS DAS FUTURAS CULTIVARES

As novas cultivares de alfafa deverão apresentar incremento em rendimento e resistência aos diversos fatores bióticos. Ainda, procurar-se-á obter cultivares portadoras

de características especiais que possibilitem sua utilização sob condições específicas de ambiente. Assim, a regionalização das cultivares deverá resultar num melhor desempenho das pastagens.

A alfafa é cultivada nos trópicos basicamente sob dois sistemas de cultivo: corte e pastejo. No programa de melhoramento de alfafa destinado ao sistema de corte, selecionam-se plantas com elevada produção de matéria seca, alta qualidade forrageira, alta capacidade de fixação de nitrogênio, tolerância a pragas e doenças, menor grau de repouso invernal e boa persistência. Já para o sistema de pastejo, adicionam-se a estas características tolerância ao pisoteio e baixa taxa de timpanismo (Basigalup & Hijano, 1995).

Deve-se enfatizar que a utilização de cultivares melhoradas constitui uma das formas mais baratas de aumentar a produtividade, reduzir os custos e preservar o meio ambiente. Ainda, por representar um baixo investimento, as cultivares melhoradas constituem uma tecnologia de fácil acesso à maioria dos produtores, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento sustentado da pecuária nacional.

Apesar do bom desempenho que uma variedade de alfafa pode apresentar quanto à produção de matéria seca, é necessário que demonstre, também, resposta à melhoria do ambiente e previsibilidade. Entretanto, pelo efeito da interação genótipo x ambiente, muitas vezes, uma variedade superior em determinadas condições ambientais pode não manter esta superioridade em outro ambiente. Assim, o estudo pormenorizado do comportamento de uma variedade, ante as variações ambientais, tem sido de grande importância, por permitir a recomendação e utilização mais eficiente do material genético disponível (Cruz & Regazzi, 1994).

13. MELHORAMENTO GENÉTICO DE ESTILOSANTES

O gênero *Stylosanthes* é fonte de várias espécies de bom valor forrageiro (Burt, 1984). O gênero tem uma distribuição natural no trópico e subtrópico de todos os continentes, porém as espécies de maior interesse agronômico como leguminosas forrageiras (*Stylosanthes guianensis; S. scabra; S. hamata; S. humilis; S. capitata; S. macrocephala*) são todas americanas. O valor dessas espécies reside na sua capacidade de produzir abundante forragem de boa qualidade e manter uma efetiva fixação biológica de nitrogênio em condições edáficas de baixa fertilidade e alta acidez, complicada por limitações de seca.

O interesse por *Stylosanthes* como leguminosa forrageira começou no início do século na Austrália, onde os pecuaristas perceberam o valor de *S. humilis*, introduzido acidentalmente e amplamente utilizado no norte de Queensland. Esta espécie foi devastada até a metade da década de 70 por antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A Austrália é o país onde o estilosantes apresenta a maior área cultivada, cerca de meio milhão de hectares, sendo anualmente formados novos 50.000 hectares (Miller *et al.*, 1997).

Nos últimos dez anos, desenvolveu-se no sul da China uma vigorosa indústria de farinha de folhas secas de *S. guianensis* para alimentação de monogástricos – principalmente peixes e aves – (Guodao *et al.*,1997). Na América tropical, apesar de várias décadas de pesquisa em instituições nacionais e internacionais, o uso comercial de estilosantes continua sendo muito limitado (Miles & Lascano, 1997).

TABELA 5. Visão geral dos programas de melhoramento em *Stylosanthes* spp.

País	Espécie	Objetivos específicos	Métodos aplicados	Referências
Austrália	*S. guianensis*	Rendimento de forragem Persistência (tolerância a baixas temperaturas)	Genealógico	Cameron *et al.* (1984)
	S. scabra	Resistência à antracnose, Rendimento de forragem	Genealógico Seleção recorrente	Cameron *et al.* (1997a)
EUA (Flórida)	*S. guianensis*	Persistência Rendimento de forragem	Hibridação natural Seleção natural	Cameron *et al.* (1984) Brolmann (1987)
Colômbia	*S. guianensis*	Resistência à antracnose Rendimento de sementes	Genealógico Seleção massal Seleção natural Seleção recorrente	Cameron *et al.* (1984) Miles & Grof (1997)
Colômbia/ Brasil	*S. capitata*	Rendimento de forragem Rendimento de sementes Resistência à antracnose	Genealógico	Hutton & Grof (1993) Miles & Grof (1997)
Brasil	*S. guianensis*	Rendimento de sementes Resistência à antracnose	Genealógico	Miles & Grof (1997)
	S. capitata S. macrocephala	Rendimento de sementes Resistência à antracnose	Seleção massal Hibridação natural	Miles & Grof (1997)

Diversos programas de coleta de germoplasma de *Stylosanthes* foram conduzidos desde 1962, inicialmente no Brasil, em Matão-SP, pelo IRRI (*International Rice Research Institute*) (Hymowitz, 1971) e depois por outros institutos de pesquisa como Embrapa, EPAMIG e CIAT (Colômbia), com esforços menores em outros países americanos (Schulze-Kraft *et al.*, 1984). Devido ao interesse particular pelo gênero, pesquisadores australianos têm feito várias viagens de coleta nos países da América tropical (Edye & Maass, 1997).

Foram liberadas diretamente das coleções de germoplasma, oito cultivares na América tropical e pelo menos 12 na Austrália. No entanto, muitas destas cultivares não foram amplamente adotadas (Miles & Lascano, 1997).

Devido aos atributos forrageiros de várias espécies de *Stylosanthes* e a percepção de que o sucesso de adoção dependia de superar limitações de ordem biótica (principalmente a antracnose), iniciaram-se vários programas de melhoramento genético desde meados da década de 70 na Austrália, Estados Unidos (Flórida), Brasil e Colômbia (Tabela 5).

Cameron *et al.* (1984) publicaram uma revisão detalhada sobre melhoramento de *Stylosanthes*. Mais recentemente foram publicados outros artigos sobre melhoramento de *Stylosanthes*, com informações mais atualizadas (Cameron *et.al.*, 1997a,b; Miles & Grof, 1997), focalizando especialmente o melhoramento para resistência a antracnose.

13.1 OBJETIVOS

Os objetivos gerais para os diversos programas de melhoramento de estilosantes são os mesmos que para outros programas envolvendo forrageiras: maior rendimento de matéria seca de boa qualidade, persistência (o que inclui resistência a pragas e

doenças); adaptação a diversos fatores do meio ambiente; bom rendimento e qualidade de sementes (Cameron *et al.*, 1997b). O enfoque, talvez equivocado, tem sido o de usar estilosantes como componente de pastagens consorciadas (estilosantes + gramínea), permanentes e utilizadas sob pastejo (Cameron *et al.*, 1984). Muito esforço tem sido dirigido para resistência à antracnose nos programas de melhoramento, visto ser esta doença limitação crítica para a persistência da maioria das espécies de *Stylosanthes* (Cameron *et al.*, 1984; Cameron *et al.*, 1997b; Miles & Grof, 1997).

Para o estabelecimento de objetivos específicos de melhoramento, necessita-se considerar uma caracterização detalhada do ambiente onde se pretende utilizar as cultivares melhoradas, bem como qualquer experiência prévia de avaliação de germoplasma disponível. É recomendada uma prévia avaliação com estilosantes, em diversos ambientes, antes de iniciar um programa de melhoramento. Experiências com cultivares comerciais amplamente utilizadas servem para orientar todo o processo de melhoramento, desde a determinação de objetivos até a escolha do germoplasma para iniciar o programa de hibridações. Porém, nem sempre isto ocorre e a maioria dos programas de melhoramento é desenvolvida sem uma avaliação do estilosantes em situação real de utilização, o que torna ainda difícil identificar as deficiências de adaptação aos sistemas de pastagens.

13.2 GERMOPLASMA

Entre as leguminosas forrageiras tropicais, provavelmente as coleções mais completas sejam as de *Stylosanthes* (Schulze-Kraft *et al.*, 1984). Estas coleções contêm materiais adaptados a uma imensa diversidade de condições, considerando-se a variação inter e intra-específica disponível. A escolha da espécie de *Stylosanthes* com maior potencial, no entanto, não é sempre óbvia. O problema para o melhorista não é a falta de diversidade genética com a qual trabalhar, mas sim como racionalizar a utilização de tanta variabilidade existente nas coleções. São necessários critérios muito claros e metodologias de avaliação muito eficientes para permitir escolher, com certeza, os melhores genitores para iniciar qualquer programa de hibridação.

13.3 CITOGENÉTICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA

As espécies de *Stylosanthes* de interesse comercial incluem diplóides (*S. guianensis*; *S. humilis*; *S.macrocephala*) e alotetraplóides (*S. capitata*; *S.scabra*) (Stace & Camerón, 1984). Em *S. hamata* são reconhecidas raças diplóides e alotetraplóides (Edye & Maass, 1997). O número cromossômico básico do gênero é 10. Para o autotetraplóide *S. scabra*, evidências com base em estudos com marcadores moleculares possibilitou a identificação de dois genitores (Liu & Musial, 1997).

As espécies de estilosantes de valor agronômico são consideradas, em geral, autógamas, apesar de existirem registros de cruzamento natural com freqüência significativa em pelo menos três espécies *S. scabra* (Stace, 1982); *S. guianensis* (Miles, 1985); *S. capitata* (Miles, 1983). A hibridação natural é efetuada por insetos (Noronha *et al.*, 1982) e sua freqüência é muito variável. Na Colômbia observou-se uma diversidade de espécies silvestres de abelhas coletando pólen em *Stylosanthes* (Miles, J.W., dados não publicados). Até mesmo a abelha doméstica (*Apis mellifera)* é, aparentemente, um polinizador efetivo de estilosantes.

As técnicas para conseguir a polinização artificial controlada foram descritas por Cameron *et al.* (1984). A flor de estilosantes é pequena, delicada e difícil de manipular para efetuar a hibridação controlada. Além disso, para cada hibridação com sucesso, o produto é somente de uma ou duas sementes híbridas. Observa-se, portanto, que o rendimento é baixo, tornando-se um obstáculo à capacidade de recombinação que se pode realizar por cruzamentos artificiais em estilosantes (Cameron *et al.*, 1984; Miles, 1985).

13.4 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO

Os diversos programas de melhoramento de estilosantes foram elaborados considerando-se os princípios gerais de melhoramento de plantas e conhecimentos existentes para *Stylosanthes* spp. quanto a biologia reprodutiva e controle genético dos atributos de interesse. O método genealógico (*pedigree*), que normalmente se aplica a culturas anuais autógamas, tem sido utilizado em maior ou menor grau em quase todos os programas de melhoramento de estilosantes (Tabela 1).

Para manipular atributos quantitativos (poligênicos), a seleção recorrente é mais eficiente do que a genealógica. Para superar o obstáculo da difícil manipulação da flor nos cruzamentos e conseguir ampliar a recombinação, Miles (1985) sugeriu aproveitar o cruzamento natural, utilizando marcadores genéticos para identificar e recuperar as poucas plantas recombinantes. Este esquema foi posto em prática em seguida na Austrália (Cameron & Irwin, 1986).

No programa de melhoramento de *S. guianensis*, conduzido no CIAT, tentou-se utilizar dois esquemas inéditos para o gênero: seleção massal e seleção natural sob pastejo. O efeito da seleção massal sobre a precocidade de floração e do aumento no rendimento de sementes foi demonstrado (Miles, J.W., dados não publicados). Não foi possível comparar de forma rigorosa a efetividade relativa destes dois esquemas com o de seleção genealógica convencional.

Na Austrália, trabalhos recentes têm sido desenvolvidos buscando identificar marcadores genéticos para genes de resistência à antracnose, com o objetivo específico de melhorar a eficiência de combinação de distintos genes para resistência a esta doença em uma única linhagem melhorada (Cameron *et al.*, 1997a).

13.5 SITUAÇÃO ATUAL

Dos muitos programas de melhoramento de *Stylosanthes* iniciados nas décadas de 70 e 80, restaram poucos ainda em atividade. Até o momnto, dois programas resultaram na liberação de cultivares melhoradas: *S. guianensis* cv. Savanna na Florida, EUA (Williams *et al.*, 1993), e *S. scabra* cv. Siran, na Austrália (Cameron *et al.*, 1997a). O sucesso destes lançamentos, em termos de adoção das cultivares e comercialização de sementes ainda necessita ser melhor avaliado.

O componente de seleção massal no programa de melhoramento no CIAT continua, mas de forma lenta. Grof isolou algumas linhas com atributos interessantes a partir das populações massais (Miles & Grof, 1997), mas estas não foram extensivamente avaliadas até o presente.

O melhoramento de *S. scabra,* para resistência à antracnose mediante seleção recorrente e combinação de genes de resistência usando marcadores moleculares tem obtido significativos avanços (Cameron *et al.*, 1997a). O aparente insucesso de vários programas de melhoramento de *Stylosanthes*, particularmente na América tropical, foi analisado por Miles & Grof (1997), que concluíram que não seria o caso de falha nos procedimentos de melhoramento aplicado nem a deficiência de diversidade genética com a qual trabalhar, mas sim devido à falta de clareza nos objetivos iniciais resultado do desconhecimento do "por que" da não persistência de estilosantes em pastagens consorciadas.

14. COMENTÁRIOS FINAIS

A integração do Brasil aos mercados internacionais e a crescente busca dos consumidores brasileiros por produtos com menor preço e melhor qualidade têm pressionado os pecuaristas brasileiros para modernização da atividade. Por conseqüência, o grande desafio da pecuária nacional, nos próximos anos, será tornar-se competitiva, capaz de enfrentar a forte concorrência dos mercado externos e, internamente, oferecer produtos com melhor qualidade e baixo custo. Como resposta a este desafio, os produtores deverão concentrar os seus esforços no aumento da produtividade e redução de custos.

Considerando que a alimentação representa o principal elemento de despesa para a produção animal, o uso de cultivares melhoradas poderá contribuir de forma decisiva neste esforço nacional. A participação dos melhoristas de plantas, gerando novas cultivares forrageiras, torna-se de fundamental importância nesse processo, tendo em conta o impacto que o melhoramento pode causar na produtividade e o baixo custo que a adoção de novas cultivares apresenta em relação a diversas práticas de manejo.

A atividade de melhoramento requer o trabalho de equipes multidisciplinares dedicadas à manipulação da variabilidade existente no germoplasma, com base em objetivos bem estabelecidos. Deve-se considerar que o universo das espécies forrageiras é muito vasto e, ainda, pouco explorado. Embora existam milhares de espécies com aptidão forrageira, apenas um pequeno grupo tem sido efetivamente explorado. Esta situação é verdadeira principalmente para as espécies tropicais, já que o germoplasma de muitas delas sequer foi adequadamente coletado. Isto significa que o melhoramento de plantas ainda apresenta enormes desafios no desenvolvimento de espécies forrageiras.

Considerando que muitas espécies encontram-se num estádio de plantas quase "selvagem", o uso de estratégias simples de melhoramento, como a introdução e a seleção massal, podem resultar significativos avanços em produtividade. A associação de métodos clássicos de melhoramento com as modernas técnicas de biotecnologia poderão acelerar, ainda mais, o desenvolvimento de novas cultivares forrageiras, contribuindo de maneira eficaz para o processo de intensificação da produção pecuária do País.

Por fim, o melhoramento de plantas forrageiras representa uma excelente oportunidade para pesquisadores que queiram aceitar o desafio de trabalhar novas espécies e, dessa forma, contribuir para o desenvolvimento sustentado da pecuária nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.

ASKER, S.E.; JERLING, J. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298p.

BARNES, D.K.; BINGHAM, E.T.; AXTELL, J.D.; DAVIES, W.H. The flower, sterility mechanisms, and pollination control. In: ALFALFA science and technology. Madison: ASA, 1972. p.123-141.

BASIGALUP, D. H.; HIJANO, E. H.; Mejoramiento genético de la alfalfa. In: HIJANO, E. H.; NAVARRO, A. **La alfalfa en la Argentina**, 1995. p.39-60.

BINGHAM, E.T. Maximizing heterozigosity in autophyploids. In: LEWIS, W.H. (Ed.) **Polyploidy:** biological relevance. New York: Plenum Press, 1979. p.471-489.

BOGDAN, A.V. **Tropical pastures and fodder crops**. New York: Longman, 1977. 475p.

BOLTON, J.L.; GOPLEN, B.P.; BAENZIGER, H. World distribution and historical developments. In: ALFALFA science and technology. Madison: ASA, 1972. v.15, p.1-34.

BOONMAN, J.G. **East Africa's grasses and fodders:** their ecology and husbandry. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. 343p.

BROLMANN, J.B. Registration of FP-8400 pencilflower germplasm. **Crop Science**, v.27, p.153, 1987.

BRUNKEN, J.N. A systematic study of Pennisetum Sect. Pennisetum (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.64, p.161-176, 1977.

BURT, R.L. Natural variation in *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press, 1984. p.103-123.

BURTON, G.W. African grasses. In: JANICK, J., SIMON, J.E. (Ed.) **New crops**. New York: Wiley, 1993. p.294-298.

BURTON, G.W.; FORBES I. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 7., Reading, 1960. **Proceedings**. p.66-71.

BUSBICE, T.H. Effects of inbreeding on fertility in Medicago sativa L. **Crop Science**, v.8, p.231-234, 1968.

CALDERÓN, M.DE L.A.; AGUDELO CORTÉZ, J. Hibridaciones interespecificas en el genero *Brachiaria*. Palmira: Universidad Nacional de Colômbia, 1990. 89p. Disertación/Maestria

CAMERON, D.F. To breed or no to breed. In: MCIVOR, J.G.; BRAY R.A. (Ed.) **Genetic resources of forage plants**. East Melbourne: CSIRO, 1983. p.237-250.

CAMERON, D.F.; HUTTON, E.M.; MILES, J.W.; BROLMANN, J.B. Plant breeding in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press, 1984. p.589-606.

CAMERON, D.F.; IRWIN, J.A.G. Use of natural outcrossing to improve the anthracnose resistance of *Stylosanthes guianensis*. In: DSIR Plant Breeding Symposium. New Zealand: Agronomy Society, 1986. p.224-227. (Special Publication, 5).

CAMERON, D.F.; TREVORROW, R.M.; LIU, C.J. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*: II. Approaches to breeding for anthracnose resistance in *Stylosanthes* in Australia. **Tropical Grasslands**, v.31, p.424-429, 1997a.

CAMERON, D; CHARCHAR, M.J.; FERNANDES, C.D.; KELEMU,S.; CHAKRABORTY, S. Biodiversity, epidemiology and virulence of Colletotrichum gloeosporioides: III. Field evaluation of Stylosanthes species for anthracnose resistance in their centre of diversity. **Tropical Grasslands**, v.31, p.402-407, 1997b.

CARVALHO, L.A.; VILELA, D. Produção artificial de feno de alfafa (*Medicago sativa* L.) e seu uso na alimentação animal. In: CARVALHO, L.A.; VILELA, D. (Ed.) **Cultura da alfafa:** estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático. Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p.13-20.

CLAYTON, W.D.; RENVOIZE.S.A. **Genera *Graminum***. London: HMSO, 1986. 389p.

CLEMENTS, R.J. Developing persistent pasture legume cultivars for Australia. In: MARTEN, G.C.; MATCHES, A.G.; BARNES, R.F.; BROUGHAM, R.W.; CLEMENTS, R.J.; SHEATH, G.W. (Ed.) **Persistence of forage legumes**. Madison: ASA, 1989. p.505-519.

COMBES, D; PERNÉS, J. Variations dans le nombre chromosomiques du *Panicum maximum* Jacq. en relation avec le mode de reproduction. **Comptes Rendus Academie des Sciences**, Serie D, v.270, p.782-785, 1970.

CROCHEMORE, M.C. **Variabilidade genética da alfafa:** marcadores agromorfológicos e moleculares. Londrina: IAPAR, 1998. 59p. (Boletim Técnico, 58).

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa: UFV, 1994. 390p.

CRUZ, R.; MILES, J.W.; ROCA, W.; de la CRUZ, G. Apomixis y sexualidad en *Brachiaria*: 2. Estudios citoembriologicos. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, v.23, p.307-312, 1989

DAHER, R.F.; MORAES, C.F.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.V.; XAVIER, D.F. Diversidade morfológica e isoenzimática em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.255-264, 1997.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955.

DE WET, J.M.J.; HARLAN, J.R. Apomixis, poliploidy and speciation in Dichanthium. **Evolution**, v.24, p.270-277, 1970.

DERESZ, F. Capim-elefante manejado em sistema rotativo para produção de leite e carne. In: PASSOS. L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E; BRESSAN, M.; PEREIRA, A.V. (Ed.) **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.161-172.

DIZ, D.A. Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploids hybrids. Gainesville: University of Florida, 1994. 118p. Thesis, Ph.D.

DUJARDIN, M.; HANNA, W.W. Citology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploides x Pennisetum squamulatum triespecific hybrids. **Journal of Heredity**, v.76, p.382-384, 1985.

EDYE, L. A.; MAASS, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*: I. The biogeography of *Stylosanthes hamata*, *S. scabra* and "*Stylosanthes seabrana*". **Tropical Grasslands**, v.31, p.417-423, 1997.

ENCONTROS PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 1., Nova Odessa, 1987. **Anais**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. 312p.

ENCONTROS PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 2., Nova Odessa, 1991. **Anais**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1991. 342p.

ESPERANCE, M.; DIAZ, D. Valor nutritivo y producción de leche en los ensilajes sin miel de guinea likoni, pasto estrella y king grass. **Pastos y Forages**, v.8, p.297-305, 1985.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de ecótipos de *Panicum maximum* sob pastejo em pequenas parcelas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., Brasília, 1995. **Anais**. Brasília: SBZ, 1995. p.97-99.

FERGUSON, J.E.; L.V. CROWDER. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Crop Science**, v.14, p.893-895, 1974.

FONTES, P.C.P.; VILELA, D.; MARTINS, C.E. Estabelecimento da cultura de alfafa. In: CARVALHO, L.A.; VILELA, D. (Ed.) **Cultura da alfafa**: estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático. Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p.1-11.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.R.; MADDOX, J.M.; AYRES, N.M.; SHARMA, D.P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow citometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v.220, p.1049-1051, 1983.

GOBBE, J., LONGLY, B., LOUANT, B.P. Apomixie, sexualité et amélioration des graminées tropicales. **Tropicultura**, v.1, p.5-9, 1983.

GONSALEZ, B.; HANNA, W.W.. Morphological and fertility responses in isogenic triploid and hexaploid pearl millet x napiergrass hybrids. **Journal of Heredity**, v.72, p.382-384, 1985.

GRANATO, L.O. **Capim-elefante** (***Pennisetum purpureum*** **Schum.)**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, 1924. 96p.

GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; ESPINOSA, E.; PEROTTI, E.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D.; SAVIDAN, Y.H. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Trypsacum*: one gene or several genes? **Heredity**, v.80, p.33-39, 1998.

GUODAO, L.; PHAIKAEW, C.; STÜR, W. Status of *Stylosanthes* development in other countries: II. *Stylosanthes* development and utilisation in China and south-east Asia. **Tropical Grasslands**, v.31, p.460-466, 1997.

HACKER, J.B. Sexuality and hybridization in signalgrass, *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, v.22, p.139-144, 1988.

HACKER, J.B.; JANK, L. Breeding tropical and subtropical. In: CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. (Ed.) **Grass for dairy cattle**. Cambridge: CABI Publishing, 1998. p.49-72.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X alloploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, v.21, p.123-126, 1981.

HANNA, W.W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS. L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E; BRESSAN, M.; PEREIRA, A V. Ed.) **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.17-28.

HANNA, W.W.; DUJARDIN, M. Cytogenetics of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, v.26, p.499-553, 1986.

HANNA, W.W.; GAINES, T.P.; GONSALEZ, B.; MONSON, W.G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, v.76, p.969-971, 1984.

HANSON, C. H.; TYSDAL, H. M.; DAVIS, R. L.. Alfalfa. In: HUGLES, H.D.; HEALTH, M.E.; METCALFE, D.S. **Forrages**: la ciência de la agricultura baseada en la producción de pastos. México: Continental, 1978. cap.12, p.151-162.

HANSON, C.H.; BUSBICE, T.H.; HILL. JR., R.R.; HUNT, O.J.; OAKES, A.J. Directed mass selection for developing multiple pest resistance and conserving germoplasm of alfalfa. **Journal of Environment Quality**, v.1, p.106-111, 1972.

HARLAN, J.R. The scope for collection and improvement of forage plants. In: MCIVOR, J.G.; BRAY R.A. (Ed.) **Genetic resources of forage plants**. East Melbourne: CSIRO, 1983. p.3-14.

HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, v.20, p.509-517, 1971.

HARLAN, J.R.; BROOKS, M.H.; BORGAONKAR D.S.; DE WET J.M.J.. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. **Botanical Gazette**, v.125, p.41-44, 1964.

HARLAN,J.R. **Crops and man**. Madison: ASA, CSSA, 1975. 295p.

HILL, J.R.; SHENK, J.S.; BARNES, R.F. Breeding for yield and quality. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.809-825.

HOJITO, S.; HORIBATA, T. **Plant exploration, collection and introduction from África**. Japan: Tropical Agriculture Research Center. 1982. p.1-20. (Nekken Shiryo, 58)

HYMOWITZ, T. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian forage legumes. **Tropical Agriculture**, v.48, p.309-315, 1971.

IBGE. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1996.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., Piracicaba,1995. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1995.

JANK, L.; CALIXTO, S.; COSTA, J.C.G.; SAVIDAN, Y.H.; CURVO, J.B.E. **Catálogo de caracterização e avaliação de germoplasma de *Panicum maximum*: descrição morfológica e comportamento agronômico**. Campo Grande: EMBRAPA, CNPGC, 1997. 53p. (Documentos, 68).

JANK, L.; COSTA, J.C.G.; SAVIDAN, Y.H.; VALLE, C.B.DO. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., Palmerston North, 1993. **Proceedings**. Palmerston North: New Zealand Grassland Association, 1993. p.509-511.

JANK, L.; SAVIDAN, Y.H.; SOUZA. M.T.; COSTA, J.C.G. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido da África: 1.Produção forrageira. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.23, p.433-440, 1994.

JAUHAR, P.P. **Citogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York: Alan R. Liss, 1981. 289p.

JAUHAR, P.P. Inter and intra-genomal chromosome pairing in a inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, v.39, p.360-370, 1968.

JONES, R.J.; JONES, R.M. The ecology of Siratro based pastures. In: WILSON, J.R. (Ed.) **Plant relations in pastures**. East Melbourne: CSIRO, 1978. p.353-367.

KATIVU, S.; MITHEN, R. *Pennisetum* in Southern Africa. **Plant genetic resources newsletter**, v.73/74, p.1-8, 1987.

KELEMU, S.; MILES, J.W.; BONILLA, X.P.; BADEL, J.L. Sources of resistance in species of Brachiaria to foliar blight disease caused by Rhizoctonia solani. **Tropical Grasslands**, v.29, p.257-262, 1995.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. do (Ed.) *Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.16-42.

KEHR, W.R.; BARNES, D.K.; BROWN, D.E.; ELGIN JR., J.H.; SOTENSEN, E.L. Seeds yields from breeder and foundation seed of eight alfalfa cultivars. **Crop Science**, v.23, p.256-258, 1989.

KEHR, W.R.; GAUMANN, H.O.; LOW, C.C.; GARDNER, C.O. **The performance of alfalfa syntetics in the first and advanced generations**. s.l.: Nebraska Agricultural Experimental Station, 1960. (Bulletin, 200).

LEATH, K.T.; ERWIN, C.D.; GRIFFIN, N.D. Diseases and nematodes. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p. 622-662.

LEBLANC, O.; ARMSTEAD, I.; PESSINO, S.; ORTIZ, J.P.A.; EVANS, C.; VALLE, C.; HAYWARD, M.D. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of Brachiaria hybrids derived from B.brizantha, an apomictic tropical forage. **Plant Science**, v.126, p.49-58, 1997.

LENNÉ,J.M.; CALDERÓN, M.A. Disease and pest problems in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.;EDYE, L.A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p.279-293.

LESINS, K.; LESINS, I. **Genus Medicago (Leguminosae)**: a taxogenetic study. Junk: Hague, 1979. 228p.

LETERIELLO, G.; VALLE, C.B. do; PENTEADO, M.I. de O. Análise citogenética em híbridos interespecíficos de *Brachiaria*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.21, p.168, 1997.

LIU, C.J.; MUSIAL, J.M. *Stylosanthes* sp. aff. *S. scabra*: a putative diploid genitor of *Stylosanthes scabra* (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.208, p.99, 1997.

MAASS, B.L.; TORRES, A.M. Off-types indicate natural outcrossing on five tropical forage legumes in Colombia. **Tropical Grasslands**, v.32, p.124-130, 1998.

MAIRE, R. **Flore de l'Afrique du Nord**. Paris: Paul Lechevalier, 1952. 276p.

MANARA, N.T.F. Citogenética de variedades de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1973. 63p. Dissertação, Mestrado.

MANGHITZ, G.R.; RATCLIFFE, R.H. Insecto and mites. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.671-695.

MARTEN, G.C.; BUXTON, D.R.; BARNES, R.F. Feeding value (forage quality). In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.465-484.

McCOY, T.J.; BINGHAM, E.T. Cytology and cytogenetics of alfalfa. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.737-776.

MELTON, B.; MOUNTRAY, J.B.; BOUTON, J.H. Geografic adaptation and cultivar selection. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.596-618.

MICHAUD, R.; LEHMAN, W.F.; RUMBAUGH, M.D. World distribuition and hitorical development. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.25-91.

MILES, J.W., VALLE, C.B do. Germoplasma y mejoramiento genético de plantas forrajeras tropicales. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FORRAGICULTURA, 1994; REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., Maringá, 1994. **Anais**. Maringá: SBZ, 1994. p.119-139.

MILES, J.W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of outcrossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.36, p.259-265, 1985.

MILES, J.W. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grasslands**, v.17, p.114-117, 1983.

MILES, J.W.; CLEMENTS,R.J.; GROF, B.; SERPA, A. Genetics and breeding of *Centrosema*. In: SCHULZE-KRAFT, R.; CLEMENTS, R.J. (Ed.) **Centrosema**: biology, agronomy and utilization. Cali: CIAT, 1990. p.245-270.

MILES, J.W.; GROF, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*: III. *Stylosanthes* breeding approaches in South America. **Tropical Grasslands**, v.31, p.430-434, 1997.

MILES, J.W.; LASCANO, C.E. Status of *Stylosanthes* development in other countries: I. *Stylosanthes* development and utilization in South America. **Tropical Grasslands**, v.31, p.454-459, 1997.

MILES, J.W.; VALLE C.B do. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.164-177.

MILES, J.W.; VALLE, C.B. do. Avances en el mejoramiento de Brachiaria en América Tropical. **Pasturas Tropicales**, v.19, p.50-52, 1997.

MILES,J.W.; ESCANDÓN, M.L. Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. **Canadian Journal of Plant Science**, v.77, p.105-107, 1997.

MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. (Publication, 259)

MILLER, C.P.; RAINS, J.P.; SHAW, K.A.; MIDDLETON, C.H. Commercial development of *Stylosanthes* pastures in northern Australia: II. *Stylosanthes* in the northern Australian beef industry. **Tropical Grasslands**, v.31, p.509-514, 1997.

NAKAJIMA, K.; KOMATSU, T.; MOCHIZUKI, N.; SUZUKI, S. Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Japanese Journal of Breeding**, v.93, p.228-238, 1979.

NDIKUMANA, J. Étude de l'hybridation entre espèces apomitiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Louvain-La-Neuve: Université de Louvain, 1985. 210p. These, Doctorat.

NGENDAHAYO, M.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LOUANT, B.P. Self-incompatibility studies in *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard, *Brachiaria decumbens* Stapf, and *Brachiaria brizantha* (Hoechst) Stapf and their interspecific hybrids. **Phytomorphology**, v.38, p.47-51, 1988.

NORONHA, M. R. P.; GOTTSBERGER, I. S.; GOTTSBERGER, G. Biologia floral de *Stylosanthes* (Fabaceae) no cerrado de Botucatú, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, v.42, p.595-605, 1982.

PAIM, N. R. Melhoramento de plantas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 4., Piracicaba, 1977. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1977. p.53-82.

PAIM, N.R. Utilização e melhoramento da alfafa. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS, Juiz de Fora, 1994. **Anais**. Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p.141-147.

PARSONS, J. Spread of African pasture grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**, v.25, p.12-17, 1972.

PENTEADO, M.I.de O.; PRESTES, A.C.R.; SANTOS, A.C. dos; VALLE, C.B.do. Variação no conteúdo de DNA em Brachiaria brizantha determinado por citometria de fluxo. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA , 44., Goiania, 1997. **Brazilian Journal of Genetics**, v.21, p.168, 1997.

PEREIRA, A.F.; ALCÂNTARA, P.B. Fatores antinutricionais com Leucaena leucocephala. In: SIMPÓSIO SOBRE USOS MÚLTIPLOS DE LEGUMINOSAS ARBUSTIVAS E ARBÓREAS, Nova Odessa, 1993. **Anais**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1993. p.183-202.

PEREIRA, A.V. Melhoramento genético de plantas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Lavras, 1998. **Anais**. Lavras: UFLA/FAEP, 1998. p.135-162.

PEREIRA, A.V. Escolha de variedades de capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 10., Piracicaba, 1992. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.45-62.

PEREIRA, A.V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). In: PASSOS. L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E; BRESSAN, M.; PEREIRA, A V. (Ed.) **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.1-16.

PEREIRA, A.V.; BARRA, R.B.; ABREU, J.C.; FREITAS, V. SOUZA, J.A.G. Protoginous interval in elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.). In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 18., Winnipe, 1997. **Proceedings**. Winnipeg, 1997. v.3, p.123-126.

PESSINO, S.; EVANS, C.; ORTIZ, J.P.A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C.B. do; HAYWARD, M.D.A. Genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, v.128, p.153-158, 1998.

PESSINO, S.; ORTIZ, J.P.A.; VALLE, C.B.; HAYWARD, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.439-444, 1997.

PIZARRO,E.A.; VALLE, C.B. do; KELLER-GREIN,G.; SCHULZE-KRAFT, R.; ZIMMER, A.H. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical America – savannas. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.225-246.

PORZECANSKI, I.S. Melhoramento genético e perspectivas de lançamento de cultivares de leguminosas forrageiras no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v.3, p.123-133, 1981.

QUARIN, C.L.; NORRMANN, G.A. Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo en el género Paspalum. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BOTANICA, 4., Bogotá, 1987. p.25-34.

QUIROS, C.F.; BAUCHMAN, G.R. The genus Medicago and the origin of the Medicago sativa complex. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.93-124.

RENVOIZE, S.A.;CLAYTON, W.D.; KABUYE, C.H.S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.1-15.

RODRIGUES-OTUBO, B.M.; PENTEADO, M.I. de O.; NOGUEIRA, D.P.I.; VALLE, C.B. do. Regeneração de plantas a partir de calos de embriões imaturos em *Brachiaria* spp. **Brazilian Journal of Genetics**, v.21, p.388, 1997a.

RODRIGUES-OTUBO, B.M.; PENTEADO, M.I. de O.; VALLE, C.B. do. Comportamento in vitro de hibridos interespecificos de *Brachiaria* spp. **Brazilian Journal of Genetics**, v.21, p.388, 1997b.

RUMBAUGH, M.D.; CADEL, J.L.; ROWE, D.E. Breeding and quantitative genetics. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.777-808.

SANTOS FILHO, L.S. Seed production: perspectives from the Brazilian private sector In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.141-146.

SATO, H.; SHIMIZU, N.; NAKAGAWA, H.; NAKAJIMA, K.; OCHI, M. A new registered cultivar "Natsukaze" guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Bulletin of the Kyushu National Agricultural Experiment Station**, v.27, p.417-437, 1993.

SAVIDAN, Y.H. Chromosomal and embryological analyses in sexual x apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. **Theoretical and Applied Genetics**, v.57, p.153-156, 1980.

SAVIDAN, Y.H. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum*. **Crop Science**, v.22, p.467-469, 1982a.

SAVIDAN, Y.H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 14., Lexington, 1981. **Proceedings**. Westview: Press Boulder, 1983. p.182-184.

SAVIDAN, Y.H. Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq.. Paris: ORSTOM, 1982b. 159p. (ORSTOM. Travaux et Documents, 153).

SAVIDAN, Y.H.; JANK, L.; PENTEADO, M.I.de O. **Introdução, avaliação e melhoramento de plantas forrageiras tropicais no Brasil**: novas propostas de *Modus operandi*. Campo Grande: EMBRAPA, CNPGC, 1985. 36p. (Documentos, 24).

SAVIDAN, Y.H; JANK, L.; COSTA, J.C.G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande: EMBRAPA, CNPGC, 1990. 68p. (Documentos, 44).

SAVIDAN, Y.H; JANK, L.; COSTA, J.C.G.; VALLE, C.B. do. Breeding *Panicum maximum* in Brazil: 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. **Euphytica**, v.41, p.107-112, 1989.

SCHANK, S.C. Propagação vegetativa e sexual do capim-elefante. In: PASSOS. L.P.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, C.E; BRESSAN, M.; PEREIRA, A V. (Ed.) **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p.63-82.

SCHANK, S.C.; CHYNOWETH, D.P. The value of triploid, tetraploid and hexaploid napiergrass derivatives as biomass and (or) forage. **Tropical Agriculture**, v.70, p.83-87, 1993.

SCHANK, S.C.; DIZ, D.A.; BATES, D.B.; THOMPSON. K.E. Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, v.5, p.35-40, 1993.

SCHULTZE-KRAFT, R.; REID, R.; WILLIAMS, R.J.; CORADIN, L. The existing *Stylosanthes* collections. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press Australia, 1984. p.125-146.

SERRÃO, E.A.S.; SIMÃO NETO, M.S. **Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazonia**: B. *decumbens* Stapf e B. *ruziziensis* Germain et Evrard. Belém: IPEAN, 1971. 31p. (Série Estudos sobre Forrageiras na Amazônia, 1).

SHERWOOD, R.T.; BERG, C.C.; YOUNG, B.A. Inheritance of apospory in buffelgrass. **Crop Science**, v.34, p.1490-1494, 1994.

SHIMIZU, N.; NAKAGAWA, H.; SATO, H.; NAKAJIMA, K. A new registered cultivar 'Natsuyutaka' guineagrasss (*Panicum maximum* Jacq.). **Bulletin of the Kyushu National Agricultural Experiment Station**, v.27, p.439-458, 1993.

SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11., Piracicaba, 1994. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1994. 325p.

SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., Piracicaba, 1995. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1995. 345p.

SMITH, R.L. Breeding *Panicum maximum* Jacq. **Proceedings of the Soil and Crop Science Society of Florida**, v.34, p.103-106,1975.

STACE, H.M. Breeding systems of *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.33, p.87-96, 1982.

STACE, H.M.; CAMERON, D.F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L.A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. North Ryde: Academic Press, 1984. p.49-72.

STAPT, O.; HUBBARD, C. E. *Pennisetum*. In: PRAIN, D. (Ed.) **Flora of tropical Africa**. Ashford: Reeve, 1934. v.9, p.954-1070.

SWENNE, A; LOUANT, B.P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotétraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminées). **Agronomie Tropicale**, v.36, p.134-141, 1981.

TCACENCO, F.A.; BOTREL, M. de A. Identificação e avaliação de acessos e cultivares de capim-elefante. In:. CARVALHO, M.M.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; CARVALHO, L. de A. (Ed.) **Capim-elefante**: produção e utilização. Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p.1-30.

THOME, J.; PALACION, N.; LENIS, S.; ROCA, W. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.196-295.

TYSDAL, H.M.; CRANDAL, B.H. The policross progeny performance as an index of the combining ability of alfalfa clones. **Journal of the America Society of Agronomy**, v.40, p.193-306, 1948.

VALÉRIO, J.R.; LAPOINTE, S.L.; KELEMU, S.; FERNANDES, C.D.; MORALES, F.J. Pests and diseases of Brachiaria species. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) ***Brachiaria***: biology, agronomy, and improvement . Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.87-105.

VALLE, C.B. do. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT**: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande: EMBRAPA, CNPGC, 1990. (Documentos, 46).

VALLE, C.B. do; MILES, J.W. Melhoramento de gramíneas do gênero Brachiaria. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 11., Piracicaba, 1994. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1994. p.1-23.

VALLE, C.B. do; MILES, J.W. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) **Brachiaria**: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT; EMBRAPA, 1996. p.164-177.

VALLE, C.B. do; SAVIDAN Y.; JANK L. Apomixis and sexuality in *Brachiaria decumbens* Stapf. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 6., Nice, 1988. **Proceedings**. Nice: Association Française de Prodution Fourragère, 1989. v.1, p.407-408.

VALLE, C.B. do; SAVIDAN Y.H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE C.B. do. (Ed.) **Brachiaria**: biology, agronomy, and improvement. Cali: CIAT, EMBRAPA, 1996. p.147-163.

VALLE, C.B.; VALÉRIO, J.R.; CALIXTO, S.; BARCELLOS, A.O. Characteristics of selected genotypes of Brachiaria for Brazilian pastures. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 18., Winnipeg, 1997.

Proceedings. Winnipeg: Canadian Forage Council, 1999. v.1, seccion 1, p.1/81-1/82. /CD-ROM/

VALLS, J.F.M.; MAASS, B.L.; LOPES, C.R. Genetic resources of wild Arachis and genetic diversity. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. **Biology and agronomy of forage *Arachis***. CIAT: Cali, 1994. p.28-42.

VALLS, J.F.M.; PIZARRO, E. A. Collection of wild Arachis germplasm. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali: CIAT, 1994. p.19-27.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. Taxonomy, natural distribution. And attributes of Arachis. In: KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali: CIAT, 1994. p.1-18.

VIANDS, D.R.; SUN, P.; BARNES, D.K. Pollination control: mechanical and sterility. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA, 1988. p.931-960.

VILELA, D. **Intensificação da produção de leite**: 2. estabelecimento e utilização da alfafa. Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 1998. 28p. (Documentos, 69).

VILELA, D. Utilização do capim-elefante na forma de forragem conservada. In: CARVALHO, M.M.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; CARVALHO, L. de A. (Ed.) **Capim-elefante**: produção e utilização. Coronel Pacheco: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p.117-164.

WALTON, P.D. **Production & management of cultivated forages**. Reston: Reston Publishing, 1983. 336p.

WILSIE, C.P. Effect of inbreeding on fertility and vigor of alfalfa. **Agronomy Journal**, v.50, p.182-185, 1968.

XAVIER, D.F.; DAHER, R.F.; BOTREL, M.A .; PEREIRA, J.R. Poder germinativo de sementes de capim-elefante. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, p.565-571, 1993.

19

HIBRIDAÇÃO NO MELHORAMENTO

JOSÉ B. MIRANDA FILHO[1]
LUCIANO LOURENÇO NASS[2]

[1]Depto. Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.
[2]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos da hibridação em espécies vegetais foram investigados e descritos por Köelreuter – 1766, Knight – 1799 e Gärtner – 1849, conforme citações de Hallauer & Miranda Filho (1995). Entretanto, a primeira interpretação correta da hibridação em milho deve-se a uma carta escrita por Cotton Mather em 1716. Darwin (1877) foi o primeiro a conduzir experimentos, comparando plantas autofecundadas com plantas cruzadas em milho. Darwin também observou os efeitos da hibridação em outras espécies e os termos **vigor de híbrido** e **luxúria** foram usados para designar a superioridade das plantas obtidas de hibridação; tais efeitos, porém eram observados visualmente, sem qualquer mensuração quantitativa.

Beal (1880) conduziu experimentos de hibridação em milho utilizando-se de cruzamentos entre variedades de polinização aberta. O autor utilizou uma variedade como fêmea (emasculada), plantada lado a lado com outra variedade usada como macho (polinizador), constatando, após a experimentação, que as sementes híbridas colhidas nas linhas emasculadas produziram 51% a mais em relação às variedades originais. Os resultados de Beal foram posteriormente confirmados por Sanborn – 1890, McClure – 1892, Morrow & Gardner – 1893 e Weber – 1900, 1901, conforme citações apresentadas por Hallauer & Miranda Filho (1995). A superioridade do híbrido em relação aos pais, mensurada quantitativamente, foi mais tarde designada de **heterose** (Shull, 1912). Com o advento do milho híbrido, factível pelas descobertas de Shull (1908, 1909) sobre o sistema endogamia-hibridação e de Jones (1918) sobre a utilização do híbrido duplo, a utilização de sementes híbridas expandiu-se rapidamente despertando interesse e estimulando pesquisas visando à utilização de híbridos em outras espécies.

A heterose pode ser expressada de três maneiras: a) **heterose em relação à média dos pais** – desempenho do híbrido (F_1) em relação à média dos pais; b) **heterose em relação ao pai superior ou heterobeltiose** – desempenho do híbrido (F_1) em relação ao genitor de maior média para o caráter em questão; c) **heterose padrão** – desempenho do híbrido (F_1) em relação a uma cultivar considerada padrão para a cultura em questão. Obviamente, em termos práticos, a heterose padrão é aquela que merece maior atenção por parte dos melhoristas visando ao desenvolvimento de híbridos superiores para os agricultores.

2. EFEITOS DA HIBRIDAÇÃO

Todas as populações de polinização cruzada são constituídas de híbridos, considerando o termo na sua forma mais ampla. Os indivíduos em tais populações existem em um alto grau de heterozigose e, sendo populações de reprodução sexuada, exibem grande variabilidade dos caracteres. Esta variabilidade é mantida naturalmente nas populações panmíticas, graças à polinização cruzada. Portanto, o efeito de hibridação nestes casos é o de manter a variabilidade da população, bem como manter a condição de alta heterozigose nos indivíduos. Vê-se, portanto, que a hibridação pode

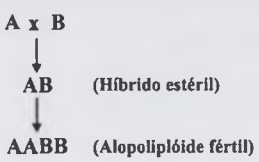
manter e criar variabilidade e este aspecto tem grande importância do ponto de vista de evolução, uma vez que a seleção só pode ser efetiva em populações que apresentem variabilidade genética. Também, com a hibridação está implícita a *recombinação*, que é uma das três forças (mutação, seleção e recombinação) que conduzem à evolução. Este efeito pode ser visualizado mais facilmente se forem tomadas duas populações de autofecundação da mesma espécie, ou mesmo dois indivíduos completamente homozigotos. Observa-se que em gerações mais avançadas ocorre recombinação (cromossômica e gênica) e a população resultante se torna bastante variável.

Em uma população qualquer de cruzamento completamente ao acaso, a estrutura genética da população ou a freqüência dos diversos genótipos depende da freqüência gênica, a qual se mantém inalterável na ausência de mutação, seleção, migração e deriva genética causada por redução do tamanho da população. Nestas condições, diz-se que a população entra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, quando as freqüências genotípicas se mantêm constantes de uma para outra geração. Uma forma comum de quebrar o equilíbrio é através da migração, que pode ser genotípica (migração de indivíduos) ou gamética (contaminação por grãos de pólen). Em última análise, a migração resulta em transferência de genes de uma população para outra, exercendo desta forma um papel importante sob o ponto de vista evolucionário, pois age como causa da estrutura genética da população via hibridação entre populações.

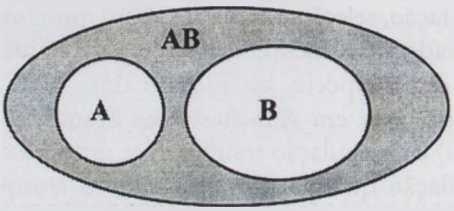
A **hibridação interespecífica** ocorre com muito menos freqüência na natureza, mas seu significado para a evolução pode ser igualmente importante. Geralmente os híbridos interespecíficos são estéreis ou parcialmente estéreis, dependendo da distância filogenética entre as espécies. Segundo alguns biologistas, que adotam o conceito de espécie com base no isolamento reprodutivo, as espécies diferentes não se cruzariam e, portanto, nunca se conseguiriam híbridos interespecíficos. Como o conceito de espécie é um tanto subjetivo, melhor seria referir-se a cruzamentos entre indivíduos ou populações mais ou menos relacionados geneticamente.

De qualquer forma a hibridação, mesmo nesses casos mais extremos, tem grande importância no processo evolutivo, pois refere-se também ao fluxo gênico de uma para outra população. Também, o efeito da hibridação depende das condições em que ela ocorre. Se ocorrer entre duas populações perfeitamente adaptadas em um ambiente relativamente estável, a hibridação não terá efeito notável. Por outro lado, o significado da hibridação pode ser muito maior se ocorrer em um ambiente instável entre populações em vias de adaptação.

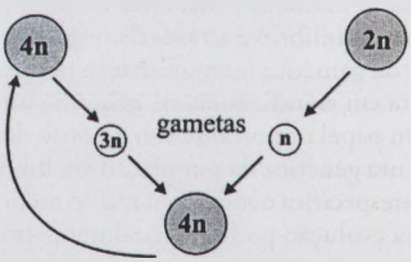
Como já mencionado, os híbridos interespecíficos apresentam esterilidade, a qual geralmente é mantida também nos descendentes de gerações posteriores. Entretanto, existem casos em que pode haver recuperação da fertilidade nos descendentes de híbridos. Exemplos: *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus coccineous*, *Triticum durum* x *Triticum timopheesi*. O produto da hibridação interespecífica também pode se manter através da poliploidia. Exemplo:



Além disso, de duas populações adaptadas em uma área com amplitude definida, pode resultar um poliplóide com amplitude de adaptação maior. Exemplo: *Dactylis glomerata*



Ainda com relação aos poliplóides, existem populações diplóides (2n) e tetraplóides (4n) que se mantêm isoladas na natureza. Entretanto, há casos em que é possível a transferência de genes de uma para outra população. Exemplo: *Laelia* sp.



3. IMPORTÂNCIA DA HIBRIDAÇÃO NA AGRICULTURA

3.1 GENERALIDADES

A hibridação artificial em plantas tem sido feita há muito tempo, pois de algum modo o homem tem procurado aproximar os métodos de melhoramento dos processos biológicos que imperam na natureza. Voltando à hibridação interespecífica, Winge (1917) foi o primeiro a dar importância à hibridação como causa de origem de novas espécies poliplóides a partir de diplóides. O primeiro híbrido estéril entre trigo (*Triticum*) e centeio (*Secale*) foi reportado por Wilson em 1876; o primeiro híbrido fértil foi relatado mais tarde por Rimpau em 1891, mas a sua análise citogenética foi feita por Müntzing (1936). Clausen & Goodspeed, citados por Clausen (1951), cruzaram *Nicotiana glutinosa* (n=12) com *Nicotiana tabacum* var. *purpurea* (n=24) e obtiveram um F_1 (2n=36) e um F_2 alopoliplóide com 2n = 72. Muitas das espécies de plantas cultivadas são alopoliplóides originados de hibridação interespecífica (Tabela 1). Alguns mecanismos utilizados na produção de semente híbrida em diversas espécies são mostrados na Tabela 2. A importância da hibridação em plantas cultivadas também pode ser relativa e depende da finalidade da cultura. Sob este aspecto, pode-se dividir as espécies cultivadas em quatro grupos:

- grandes culturas e forrageiras
- espécies frutíferas
- espécies hortícolas
- espécies ornamentais

TABELA 1. Algumas espécies alopoliplóides e seus respectivos ancestrais diplóides.

Espécie	Ploidia	Espécie	Ploidia
Algodão		**Fumo**	
Gossypium arboreum	13	*Nicotiana tomentosa*	12
Gossypium thurberi	13	*Nicotiana sylvestris*	12
Gossypium hirsutum	26	*Nicotiana tabacum*	24
Gossypium barbadense	26	**Sorgo**	
Aveia		*Sorghum versicolor*	5
Avena brevis	7	*Sorghum vulgare*	10
Avena strigosa	7	*Sorghum halepense*	20
Avena barbata	14	**Trigo**	
Avena fatua	21	*Aegilopsis squarroza*	7
Avena sativa	21	*Aegilopsis speltoides*	7
Avena byzantina	21	*Triticum monococcum*	7
		Triticum vulgare	21

TABELA 2. Mecanismos utilizados na produção de semente híbrida.

Mecanismos genéticos ou induzidos	Propagação	Espécies vegetais
Apomixia	semente	citrus em geral
Hibridação controlada ou casual	clone	cana-de-açúcar, batata, seringueira
Esterilidade citoplasmática (sem restauração)	semente	cebola, beterraba
Esterilidade citoplasmática (com restauração)	semente	milho, sorgo
Monoicia com emasculação manual	semente	milho
Dioicia	semente	aspargo
Esterilidade induzida (DDT)	semente	cevada
Emasculação e polinização manuais	semente	tomate, berinjela
Auto-incompatibilidade	semente	repolho, couve-flor

Dentre estas classes, a hibridação tem maior importância nas espécies ornamentais. Na maioria destas espécies, tais como rosas, tulipas, orquídeas etc., a novidade é sempre desejável e a hibridação tem há muito tempo despertado o interesse dos floricultores pela possibilidade de gerar novas variantes genéticas. Em seguida, vem o grupo das frutíferas em ordem de importância. Por exemplo, as espécies de maçã, ameixa, pêssego, uva, citrus e banana são de origem híbrida. Outras como mamão e abacate têm origem de uma única espécie. Nas frutíferas, as hibridações são entre membros da mesma seção ou subgênero, enquanto que nas ornamentais a hibridação entre membros de diferentes subgêneros e gêneros é mais freqüente.

Nas grandes culturas (cereais, algodão, linho, fumo) e forrageiras (gramíneas forrageiras, alfafa etc.) a hibridação entre espécies tem sido menos freqüente. Trigo, algodão e fumo são poliplóides de origem híbrida, mas a ocorrência de tais hibridações é espontânea e não orientada pelo homem. O melhoramento destas espécies tem sido via cruzamento intervarietal seguido de seleção. Hibridação interespecífica só tem sido utilizada para transferência de genes específicos e não para fins de seleção.

Finalmente, a hibridação é menos importante no grupo das hortaliças. As espécies de hortaliças mais importantes (cenoura, beterraba, nabo, rabanete, aspargo, aipo, espinafre, alface, feijão-vagem e tomate) têm origem de espécie única, diplóide, ou de um grupo de "espécies" taxonômicas interférteis, como no caso das Brássicas (repolho, couve-flor, couve-brócolos etc.) e Cucurbitáceas (abóbora, melancia). Nestas culturas, mesmo a hibridação com a finalidade de transferência de genes específicos por retrocruzamento, tem sido pouco utilizada, com exceção de algumas espécies de tubérculos (batata e batata-doce).

As relações de importância entre os quatro grupos citados podem se resumir como segue:

Importância relativa da hibridação em quatro grupos de espécies vegetais

Ornamentais	>	Frutíferas	>	Grandes culturas	>	Hortaliças
<exigência		>exigência		<exigência		>exigência

Estas diferenças entre grupos com respeito à hibridação pode ser explicada segundo dois pontos de vista: a) a hibridação tem maior valor em plantas que usualmente são propagadas por meios vegetativos e menos valor nas que se reproduzem por sementes; b) o valor da hibridação entre espécies é comparativamente alto nas culturas em que a "quantidade" da produção é o principal objetivo e se tornam de menor valor a medida em que aumenta a exigência por qualidade. A primeira observação explica porque a hibridação é mais importante em plantas ornamentais e frutíferas em comparação com os cereais e hortícolas. Isso é devido à possibilidade de propagação vegetativa, não sendo necessário um longo tempo para seleção e purificação genética. Qualquer híbrido de interesse pode ser perpetuado indefinidamente como uma nova variedade. As diferenças em exigência para qualidade explica a diferença da importância da hibridação nas plantas ornamentais comparadas com as frutíferas e das grandes culturas comparadas com as hortícolas. De fato, em floricultura a qualidade é importante mas não é para uma qualidade particular, a não ser o valor estético; a novidade é desejável e esta é uma característica de qualidade que pode ser obtida facilmente por hibridação. Por outro lado, a exigência por qualidade dos frutos é mais pronunciada, principalmente com relação a sabor, suculência, odor, conservação etc. Obter todas estas características de um único genótipo, a partir de um híbrido interespecífico, torna-se pouco provável.

Considerações semelhantes podem ser feitas para as grandes culturas comparadas com as hortícolas. Entre as primeiras, somente algumas (algodão, trigo, arroz, feijão) têm certa exigência de qualidade, mas em outras como o milho, cevada, aveia, sorgo etc., o interesse maior é por quantidade de produção. Por outro lado, a maioria das plantas hortícolas foi selecionada de um certo número de formas diferenciadas, justamente pelas suas características de sabor, odor, suculência etc., e o melhorista que trabalha com tais culturas tem como preocupação manter tais características. Se estas culturas forem produzidas por sementes, a hibridação interespecífica traria um desvio muito grande em relação ao tipo exigido.

Novamente, aqui existe um grande paralelo com a evolução orgânica. Se a adaptação de uma espécie ao seu ambiente é de caráter amplo, como um tipo geral

em que muitas combinações gênicas são igualmente adaptativas, então existe grande chance de que algum segregante resultante de hibridação interespecífica tenha valor seletivo, com resultado positivo na seleção. Mas, se o tipo de adaptação da espécie é muito específico, como a estrutura floral de orquídeas, então o produto da hibridação certamente será não adaptativo e este processo representa pouca influência na evolução.

Também no melhoramento de espécies florestais e gramíneas forrageiras, existe analogia com a evolução orgânica e a hibridação interespecífica tem importância (Ex: *Populus*, *Pinus*, *Eucalyptus*). No caso da cana-de-açúcar que é do grupo das grandes culturas, a hibridação interespecífica tem grande importância no melhoramento, devido à possibilidade de propagação vegetativa. De fato, a hibridação interespecífica tem sido amplamente utilizada para a incorporação na espécie nobre (*Saccharum officinarum*) de genes de resistência a doenças provenientes de *S. spontaneum* e *S. robustum*.

3.2 HIBRIDAÇÃO NO MELHORAMENTO

A hibridação no sentido mais amplo também tem sido de interesse no melhoramento de grande parte das espécies cultivadas, tanto para a exploração do vigor de híbrido na geração F_1 como para promover o aparecimento de variabilidade genética em populações. Os métodos de melhoramento não serão abordados nesse capítulo, pois são discutidos em detalhes em outros capítulos desse livro.

3.2.1 ESPÉCIES AUTÓGAMAS

Nas espécies autógamas a seleção de plantas individuais ou seleção massal pode ser efetiva se a população base apresentar suficiente variabilidade genética. Entretanto, como os indivíduos existem em alto grau de homozigose, a variabilidade pode ser limitada e comprometer os progressos subseqüentes. Johannsen em seu trabalho clássico com feijão, verificou que a seleção em uma população variável conduzia à fixação de "linhas puras". Assim, a seleção continuada entre as linhas puras resulta em limitação do progresso genético. Progressos adicionais só podem ser esperados com o aumento da variabilidade genética, via hibridação. A hibridação em espécies autógamas baseia-se no cruzamento entre duas (ou mais) variedades ou linhagens previamente escolhidas pelo grau de complementação de caracteres importantes, seguido de seleção da população segregante utilizando-se dos diversos métodos de melhoramento disponíveis para as espécies autógamas:

- Método genealógico ou *pedigree* – iniciando-se a seleção em plantas individuais na geração F_2 e depois entre e dentro de linhas F_3, F_4 etc., até atingir o grau de homozigose desejado.
- Método da população ou *bulk* – pelo qual as gerações segregantes F_2 , F_3, F_4 etc., são conduzidas sem seleção até que as plantas atinjam alto grau de homozigose, quando se inicia a seleção entre linhas puras.
- Método do retrocruzamento – referindo-se a um processo de introgressão, pelo qual as plantas híbridas são retrocruzadas com um dos genitores, geralmente visando à incorporação de uma ou mais características do pai doador.
- Método da semente única (*SSD – single seed descent*) – semelhante ao método massal no que diz respeito à condução da população até completa homozigose sem seleção; porém, apenas uma semente de cada planta é tomada em cada geração.

3.2.2 ESPÉCIES ALÓGAMAS

Nas populações alógamas, a hibridação entre indivíduos constitui o mecanismo natural de reprodução e tem o efeito de manter a variabilidade na população e a condição de alta heterozigose nos indivíduos. Em populações com alta variabilidade, a seleção massal ou individual pode ser efetiva como método de melhoramento. De outra maneira, a variabilidade pode ser restaurada ou criada mediante hibridação entre variedades diferentes ou pela síntese de sintéticos de linhagens ou compostos de variedades. Wellhausen (1965) já recomendava a síntese de compostos para a introgressão de germoplasma exótico de milho nos Estados Unidos.

Outros tipos de cruzamentos controlados também são utilizados no melhoramento de espécies alógamas para a obtenção de progênies ou famílias:

- Família de meios-irmãos: cruzando-se um indivíduo com toda a população
- Família de irmãos germanos: cruzamento biparental (planta a planta)
- Família *topcross*: cruzamentos de genótipos com um testador comum
- Seleção recíproca: em duas populações cruzam-se genótipos de cada uma com a população contrastante.

4. EXEMPLOS DA UTILIZAÇÃO DE HÍBRIDOS NA AGRICULTURA

Nas espécies autógamas, o uso do vigor de híbrido é bastante limitado, devido às dificuldades de emasculação e polinização e também porque muitas delas produzem somente uma semente por flor, o que inviabiliza a utilização da semente híbrida pela reduzida quantidade de semente obtida por hibridação. Assim, a utilização de semente híbrida fica limitada a algumas espécies. Por exemplo, existem limitações ao uso de híbridos nas espécies de trigo, aveia, cevada e algumas leguminosas (soja, feijão, ervilha).

Nas espécies alógamas, o uso do vigor de híbrido é mais generalizado porque a polinização cruzada é o sistema natural de reprodução. Entretanto, para a produção de semente híbrida o cruzamento controlado e a emasculação são necessários e aí reside grande parte das dificuldades.

Na seqüência, são apresentados alguns dos exemplos mais notáveis da utilização de híbridos na agricultura.

- **Sorgo** (*Sorghum bicolor*)

O sorgo é uma espécie autógama, com cerca de 6% de cruzamento entre plantas em linhas adjacentes, de modo que as primeiras cultivares se constituíam de linhas puras. Entretanto, a expressão da heterose em cruzamentos estimulou a produção de semente híbrida. As primeiras comparações de híbridos com variedades no Texas (EUA), mostraram que o híbrido RS 610 produziu 26% mais do que Martin, a variedade local mais cultivada na época (Quinby & Schertz, 1970).

Com a descoberta da macho-esterilidade genético-citoplasmática foi possível implementar a produção de semente híbrida. Isto foi possível porque o sorgo apresenta uma inflorescência exposta e ocorre ampla disseminação do pólen pelo vento e por insetos. Assim, para a produção da semente híbrida, tem-se que dispor de duas linhagens (A e R) previamente selecionadas para expressão de uma combinação híbrida desejável, incluindo heterose na produtividade.

macho — fêmea

(N) RfRf *fértil* x (S) rfrf *estéril*

híbrido

(S) Rfrf *fértil*

Representando por [N] e [S] os citoplasmas normal e estéril, por *Rf* o gene dominante que confere restauração da fertilidade e por *rf* o seu alelo recessivo que não restaura a fertilidade, são identificas três tipos de linhagens: [S] *rfrf*: linhagem A; [N] *rfrf*: linhagem B; e [N] *RfRf*: linhagem R (restauradora). A semente híbrida comercial é obtida do cruzamento A x R, ou seja, [S] *rfrf* x [N] *RfRf*, resultando o híbrido [S]*Rfrf* que deverá apresentar fertilidade masculina no campo do agricultor (Figura 1). A linhagem B é muito semelhante geneticamente à linhagem A, diferindo apenas pelo citoplasma; é utilizada no esquema de produção somente para manutenção da linhagem A, pois A x B ⇒ A, ou seja [S] *rfrf* x [N] *rfrf* ⇒ [S] *rfrf*.

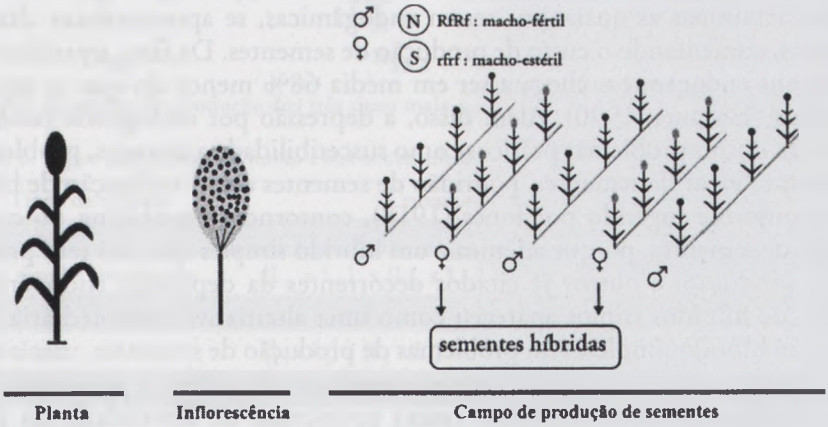


FIGURA 1. Esquema de produção de sementes híbridas em sorgo.

• Milho (*Zea mays*)

Este é, sem dúvida, o exemplo mais notável da utilização da heterose na geração F_1 e foi a primeira cultura que permitiu o estabelecimento de companhias especializadas na produção de semente híbrida. Também devido ao sucesso do milho híbrido, houve interesse dos melhoristas em pesquisar a possibilidade do uso do vigor de híbrido em outras culturas. Os primeiros trabalhos de Beal (1880) sobre híbridos intervarietais, de Shull (1908, 1909) que estabeleceu o sistema de endogamia-hibridação e de Jones (1918) que sugeriu a utilização de híbridos duplos para viabilizar a comercialização da semente híbrida, foram as grandes contribuições iniciais para o sucesso do milho híbrido. Posteriormente, desenvolveram-se novas metodologias de melhoramento de populações e de linhagens, exploraram-se novas fontes de germoplasma e ampliou-se a abrangência de ambientes e a dimensão dos esquemas de experimentação. Todas estas iniciativas formaram um forte conjunto de ações de

pesquisa que contribuíram para o grande avanço da exploração do milho híbrido em todo o mundo.

Sendo o milho uma espécie monóica, com ambos os sexos na mesma planta porém em órgãos separados, e também devido ao tamanho da planta e da inflorescência, o processo de emasculação, que faz parte do sistema de produção da semente híbrida, torna-se relativamente fácil. Assim, os híbridos são produzidos plantando-se linhas de macho (polinizador) e linhas de fêmea (emasculadas ou despendoadas artificialmente) em proporção variável (1:2, 1:3, 1:4, 2:4, 2:6 etc.) em campos isolados para evitar contaminação por pólen estranho. Existem diversos tipos de híbridos, mas em qualquer caso, o esquema de plantio pareado macho:fêmea é utilizado (Figura 2). As sementes híbridas são colhidas nas fêmeas e os machos são destruídos logo após a polinização.

Os diversos tipos de híbridos em milho são mostrados na Tabela 3. Os híbridos simples, envolvendo cruzamento de apenas duas linhagens, foram os primeiros concebidos no início da história do milho híbrido com os trabalhos de Shull (1908, 1909). Entretanto, não foi possível utilizar este tipo de híbrido para a produção comercial de sementes. O principal entrave era a baixa produção de sementes nas linhagens femininas as quais, por serem endogâmicas, se apresentavam altamente depressivas, aumentando o custo de produção de sementes. De fato, a produtividade de linhagens endogâmicas chega a ser em média 68% menor do que os tipos não endógamos (Hallauer, 1990). Além disso, a depressão por endogamia também se revelava em outros problemas práticos como suscetibilidade a doenças, problemas de acamamento, vigor de sementes, podridão de sementes etc. A utilização de híbridos duplos, conforme sugerido por Jones (1918), contornou o problema do custo de produção de sementes, porque a fêmea é um híbrido simples que não tem problema de baixa produção, e outros já citados decorrentes da depressão endogâmica. A utilização de híbridos triplos apareceu como uma alternativa intermediária, pois a fêmea é um híbrido simples, sem problemas de produção de sementes, mas o macho é uma linhagem cuja única finalidade é a produção de pólen; a utilização de um macho endogâmico também pode trazer problemas de debilidade da planta, acamamento e deficiência na produção de pólen, que podem resultar em limitações de ordem prática (Figura 3).

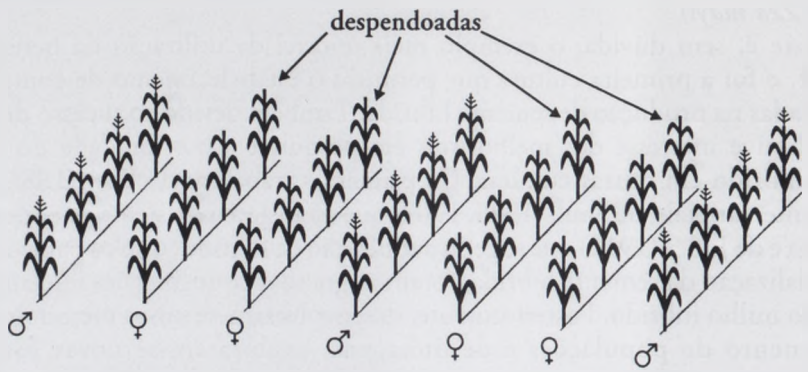


FIGURA 2. Esquema de um campo de produção de sementes híbridas de milho na proporção de 1 macho: 2 fêmeas.

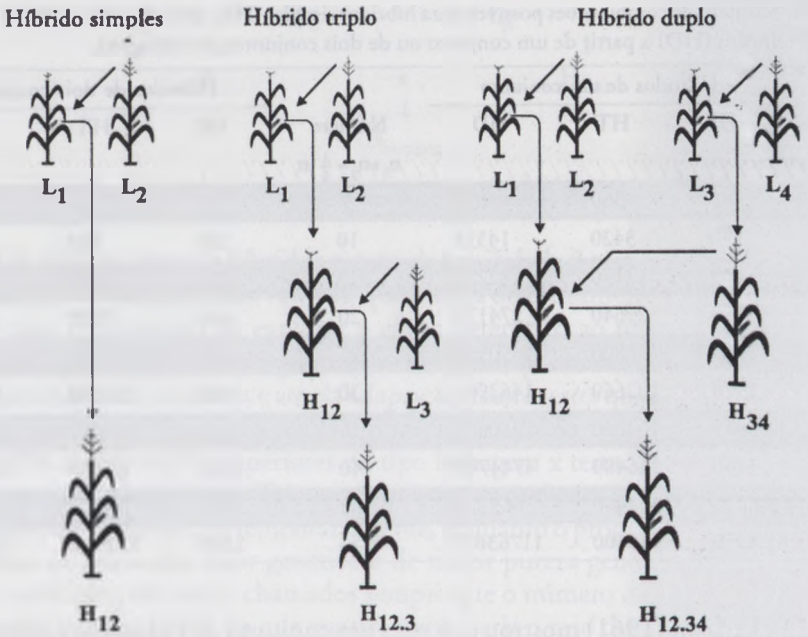


FIGURA 3. Esquema de produção dos três tipos mais comuns de milho híbrido.

TABELA 3. Tipos de híbridos de milho e sua constituição em termos de cruzamento.

Tipos de híbrido	Cruzamento[✓]	Simbologia
Híbrido simples	$L_1 \times L_2$	H_{12}
Híbrido simples modificado	$[L_{11} \times L_{12}] \times [L_{21} \times L_{22}]$	$H_{11.22}$
Híbrido triplo	$[L_1 \times L_2] \times L_3$	$H_{12.3}$
Híbrido duplo	$[L_1 \times L_2] \times [L_3 \times L_4]$	$H_{12.34}$
Híbrido topcross	$L_1 \times$ variedade ou população	$H_{1.V}$
Híbrido múltiplo	$[(L_1 \times L_2) \times L_3] \times [(L_4 \times L_5) \times L_6]$	$H_{123.456}$
Híbrido de famílias	MI x MI, IG x IG, $S_1 \times S_1$ etc.	H_{MI}, H_{IG}, $H_{S_1 S_1}$ etc.
Híbrido intervarietal	$V_1 \times V_2$	$H_{V1.V2}$

[✓] L_1, L_2, ... : linhagens endogâmicas; V_1, V_2, ...: variedades ou populações; MI: família de meios-irmãos; IG: família de irmãos germanos; S_1, S_2 ...: famílias de autofecundação.

A partir de um determinado conjunto com n linhagens endogâmicas, podem ser feitos híbridos simples, híbridos triplos e/ou híbridos duplos. Os números de combinações possíveis em cada caso são $N_{HS} = C_n^2 = \frac{1}{2}\, n(n-1)$, $N_{HT} = 3\, C_n^3 = \frac{1}{2}\, n(n-1)\,(n-2)$ e $N_{HD} = 3\, C_n^4 = \frac{1}{8}\, n(n-1)\,(n-2)\,(n-3)$. Há situações em que se combinam linhagens provenientes de duas populações contrastantes (A e B) com padrão heterótico conhecido. Assim, tomando-se n_1 e n_2 linhagens das populações A e B, os números de combinações possíveis em cada caso são: $N_{HS} = n_1 n_2$, $N_{HT} = n_1\, C_{n2}^2 + n_2\, C_{n1}^2 = \frac{1}{2}\, n_1\, n_2\, (n_2-1) + \frac{1}{2}\, n_1\, n_2\, (n_1+n_2-2)$, $N_{HD} = C_{n1}^2 \cdot C_{n2}^2 = \frac{1}{4}\, n_1\, n_2\, (n_1-1)\,(n_2-1)$ (Hallauer & Miranda Filho, 1995). Na Tabela 4 são mostrados os números de combinações possíveis para os três tipos de híbridos, considerando um ou dois conjuntos de linhagens.

TABELA 4. Número de combinações possíveis para híbridos simples (HS), híbridos triplos (HT) e híbridos duplos (HD) a partir de um conjunto ou de dois conjuntos de linhagens.

	Híbridos de um conjunto				Híbridos de dois conjuntos		
Número (n)	HS	HT	HD	Número $n_1=n_2=\frac{1}{2}n$	HS	HT	HD
10	45	360	630	5	25	100	100
20	190	3420	14535	10	100	900	2025
30	435	12180	82215	15	225	3150	11025
40	780	29640	274170	20	400	7600	36100
50	1225	58800	690900	25	625	15000	90000
60	1770	102660	1462905	30	900	26100	189225
70	2415	164220	2750685	35	1225	41650	354025
80	3160	246480	4744740	40	1600	62400	608400
90	4005	352440	7665570	45	2025	89100	980100
100	4950	485100	11763675	50	2500	122500	1500625

Cockerham (1961) mostrou que para um conjunto de linhagens endogâmicas, os híbridos simples, triplos e duplos que podem ser feitos expressam variâncias na seguinte ordem de magnitude: $\sigma^2_{HS} > \sigma^2_{HT} > \sigma^2_{HD}$. Na ausência de dominância, σ^2_{HS} pode ser até duas vezes σ^2_{HD}, indicando que a seleção entre híbridos simples pode levar a resultados mais promissores do que a seleção entre híbridos duplos, a partir de um mesmo conjunto de linhagens. Quando se trata de dois conjuntos de linhagens, os híbridos são identificados ao nível interpopulacional, ou seja, os híbridos simples formados por uma linhagem de cada conjunto e os híbridos duplos formados por um híbrido simples de cada conjunto. Nos híbridos triplos existem duas alternativas de cruzamento: híbrido simples do conjunto A x linhagem de B ou híbrido simples do conjunto B x linhagem de A, que levam a resultados geneticamente diferentes; estes dois tipos são designados de HT_{12} e HT_{21}, respectivamente.

O híbrido simples modificado (HSm) foi uma alternativa concebida para contornar parcialmente o problema de produção de semente híbrida, com o mínimo de perda da potencialidade genética do híbrido simples. O HSm é obtido a partir de quatro linhagens, à semelhança do híbrido duplo. Porém, os dois híbridos simples parentais (macho e fêmea) são obtidos pelo cruzamento de linhagens irmãs que são muito parecidas geneticamente, mas com um grau de divergência suficiente para garantir um mínimo de vigor, tal que possa assegurar a produção de sementes. As linhagens irmãs são oriundas de uma mesma planta original (S_0), mas são diferentes geneticamente porque elas são selecionadas em uma geração segregante (S_1, S_2, S_3, ...). Elas são tanto mais semelhantes quanto mais avançada estiver a geração onde a genealogia é aberta (Figura 4).

As quatro linhas utilizadas na formação do híbrido simples modificado podem então ser simbolizadas por L_{11} e L_{12} (linhas irmãs) do lado feminino e L_{21} e L_{22} (linhas irmãs) do lado masculino, ou vice-versa. O sistema de cruzamento é como representado a seguir.

L_{11} x L_{12} L_{21} x L_{22}

↓ ↓

$H_{11.12}$ x $H_{21.22}$

↓

$H_{1112.2122}$

Híbrido simples modificado

Os demais tipos de híbridos mostrados na Tabela 3 têm sido menos utilizados na agricultura. O híbrido intervarietal, que resulta do cruzamento de duas variedades, também tem o propósito de explorar o efeito heterótico ao nível interpopulacional. Ainda é utilizado em algumas regiões do Brasil, principalmente pela rusticidade, baixo custo de produção de sementes e ampla adaptação, fatores estes que atendem à agricultura menos tecnificada. O híbrido *topcross* pode ser utilizado nas situações em que são identificadas combinações superiores do tipo linhagem x testador na fase de avaliação das linhagens endogâmicas. Tais combinações promissoras podem ser exploradas comercialmente, pelo menos temporariamente, enquanto o programa ainda não dispuser de híbridos de mais alto valor genético e de maior pureza genética dos genitores. Os híbridos múltiplos são assim chamados sempre que o número de linhagens envolvidas nos cruzamentos for maior do que quatro. Assim seria o caso do cruzamento entre dois híbridos triplos ou entre um híbrido simples e um híbrido triplo.

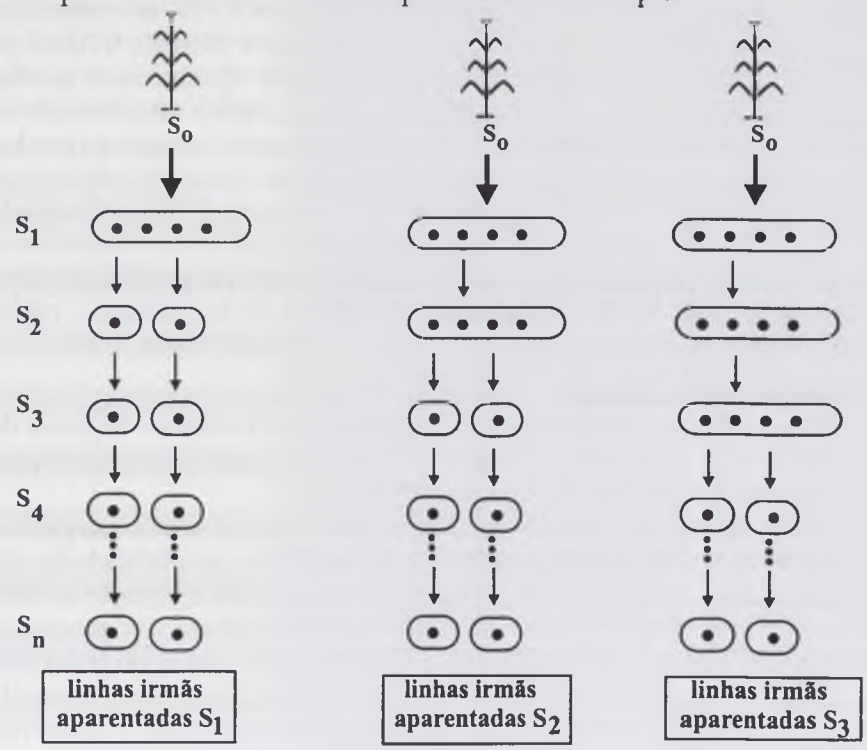


FIGURA 4. Esquema mostrando linhagens irmãs com separação da genealogia em diferentes gerações de endogamia.

Os híbridos de famílias são obtidos pelo cruzamento entre famílias de meios-irmãos, de irmãos germanos ou de autofecundação (S_1, S_2 etc.). Em qualquer caso, a multiplicação das famílias para serem usadas como parentais em gerações sucessivas, equivale a uma redução do tamanho efetivo populacional cuja conseqüência é o aumento do grau de homozigose em decorrência da endogamia. As famílias assim conduzidas devem resultar em graus intermediários de endogamia ($0<F<1$; sendo F o coeficiente de endogamia de Wright), com valores esperados de $\frac{1}{8}$ para meios-irmãos, $\frac{1}{4}$ para irmãos germanos, $\frac{1}{2}$ para S_1, $\frac{3}{4}$ para S_2 e assim por diante. A utilização de famílias ou subpopulações com níveis mais brandos de endogamia têm a vantagem de facilitar e diminuir o custo de produção de sementes, mas com possibilidades de exploração de combinações genéticas específicas de alto padrão. Porém, os híbridos de famílias tiveram pouco interesse por parte de pesquisadores e produtores de sementes devido à dificuldade de manter com segurança a identidade das famílias ou subpopulações parentais e também por questões de segurança no que diz respeito à proteção de cultivares. Os híbridos de famílias também são chamados de híbridos intermediários devido ao grau de endogamia dos pais que fica na faixa intermediária entre um genitor totalmente endógamo (linha pura) e uma população ou variedade não endógama.

Na produção de qualquer dos tipos de híbridos de milho, a semente híbrida é colhida na fêmea, que é emasculada artificialmente. Entretanto, da mesma maneira que no sorgo, existe possibilidade de utilizar a macho-esterilidade genético-citoplasmática para facilitar e diminuir o custo de produção de sementes. O sistema é semelhante ao do sorgo, sendo (S)rfrf a constituição de uma linha estéril e (N)RfRf, (N)Rfrf, (N)rfrf, (S)RfRf ou (S)Rfrf as constituições de um genótipo fértil. O esquema de produção de sementes seria semelhante ao já mostrado para o sorgo. Após a descoberta da macho-esterilidade em milho, este sistema passou a ser amplamente utilizado na produção de semente híbrida. O tipo de citoplasma mais utilizado na época era o denominado de citoplasma T, por ter sido descoberto no Texas. Entretanto, em 1970 nos Estados Unidos e em 1971 no Brasil ocorreram epidemias causadas pelo fungo *Helminthosporium maydis*, causando grandes prejuízos. O uso de citoplasma estéril foi abolido do sistema de produção de sementes mas ainda existem perspectivas de sua utilização, explorando tipos de citoplasma diferentes da fonte T (Miranda Filho & Viégas, 1987).

• Girassol (*Helianthus annuus*)

O nome vulgar desta espécie faz referência à característica da planta de girar sua inflorescência, seguindo o movimento do sol, até a antese, quando se posiciona na direção leste (Castiglioni & Oliveira, 1999a).

A importância do girassol ao nível mundial deve-se ao seu alto potencial de produção de óleo, facilidade de extração e qualidade de óleo, possibilidade de utilização na alimentação humana e animal, tolerância a seca e ampla adaptação às condições ambientais (Ungaro, 1993). O óleo de girassol apresenta sabor suave e aroma neutro, sendo considerado uma excelente fonte de ácido linoléico, um ácido graxo essencial; possui também baixo teor de ácido linolênico. Castiglioni & Oliveira (1999a) salientaram que a sua composição lhe garante maior estabilidade e conservação do sabor original durante o processamento ou em situações adversas de armazenamento. Os autores também destacaram a importância do melhoramento genético, o qual já disponibilizou cultivares com alto teor de ácido oléico (80%).

O girassol cultivado apresenta número cromossômico 2n = 34. Esta espécie é alógama com ocorrência de protandria e auto-incompatibilidade, sendo esta do tipo esporofítica. As plantas apresentam flores completas e perfeitas, com graus de auto-incompatibilidade variando de 0 a 100% (Castiglioni & Oliveira, 1999b). A polinização é principalmente entomófila, sendo as abelhas consideradas o principal agente polinizador; a polinização pelo vento é dificultada em função do peso do grão de pólen (Castiglioni & Oliveira, 1999a).

A hibridação é usualmente empregada nos programas de melhoramento de girassol. Basicamente envolve duas etapas: a) emasculação – que pode ser manual, química com ácido giberélico e uso de auto-incompatibilidade; b) polinização. Detalhes mais específicos sobre o processo são apresentados por Miller (1987) e Castiglioni & Oliveira (1999a).

O uso de macho-esterilidade é comum nos programas de melhoramento de girassol. O sistema mais empregado atualmente é a macho-esterilidade genético-citoplasmática, relatado por Leclercq (1969) a partir de um cruzamento interespecífico de *H. petiolaris* Nutt e *H. annuus* L., a qual vem sendo amplamente utilizada nos programas de melhoramento ao nível mundial (Castiglioni & Oliveira, 1999a). Várias fontes de macho-esterilidade têm sido reportadas por diversos pesquisadores (Marinkovic & Miller, 1995). Castiglioni & Oliveira (1999a) relataram que o uso de macho-esterilidade na produção de híbridos de girassol é o método mais seguro, menos trabalhoso e de menor custo. Alguns programas de melhoramento têm-se utilizado de cruzamentos interespecíficos conforme indicado na Tabela 5. As metodologias comumente empregadas no melhoramento do girassol são discutidas detalhadamente por Miller (1987) e Castiglioni & Oliveira (1999b).

TABELA 5. Possibilidades de cruzamentos interespecíficos com *Helianthus annuus* (n = 17).

Possibilidade de cruzamento	Espécie	Cromossomos (n)
Cruzamento em condições naturais	*H. petiolaris*	17
	H. giganteus	17
	H. maximiliani	17
	H. grosseratus	17
	H. ruderalis	17
	H. debilis	17
	H.	17
	H. mollis	17
	H.	34
	H. strumosuss	51
	H. tuberosus	51
	H. rigidus	51
Cruzamento em determinadas condições	*H. divaricatus*	17
	H. scabeimus	34
Ausência de cruzamento	*H.*	17
	H. nutallii	17
	H. hirsitus	17
	H. orginalis	17
	H.	17
	H. salicifolius	17

Fonte: Adaptado de Castiglioni & Oliveira (1999a)

• **Arroz** (*Oryza sativa*)

Abordagens sobre a classificação botânica, origem e domesticação, além da descrição e aplicação dos métodos utilizados no melhoramento do arroz podem ser encontradas em McKenzie *et al.* (1987),Guimarães (1999) e Castro *et al.* (1999).

De acordo com Castro *et al.* (1999) arroz cultivado se diferencia em dois grupos – *indica* e *japonica* – os quais apresentam certa semelhança. Os autores relataram também que as cultivares *japonica* ocorrem nos trópicos até as zonas temperadas, enquanto as *indica* encontram-se nas regiões tropicais e subtropicais; as cultivares *japonica* mostram-se mais tolerantes ao frio que as *indica*. Guimarães (1999) ressaltou que, em geral, as variedades adaptadas ao sistema de cultivo de sequeiro pertencem ao grupo *japonica* e as de cultivo irrigado ao grupo *indica*. No Brasil, ocorrem quatro espécies silvestres do gênero *Oryza*, sendo uma diplóide e as demais tetraplóides (Morishima, 1994), sendo que o potencial dessas espécies para o melhoramento foi enfatizado por Ando & Rangel (1994), com destaque para *O. glumaepatula*.

Dentre as espécies autógamas, o arroz merece destaque na exploração comercial do vigor de híbrido. McKenzie *et al.* (1987) relataram que por volta de 1970, Loung-Ping Yuan, considerado o idealizador do arroz híbrido, encontrou uma fonte de macho-esterilidade citoplasmática em um arroz selvagem na China. Em 1973, Yuan desenvolveu os três tipos de linhagens necessárias para a produção do arroz híbrido (sistema ABR), onde: a linhagem A é macho-estéril citoplasmática; a linhagem B é a mantenedora; e a linhagem R é a restaurador da fertilidade.

A identificação de linhagens com macho-esterilidade determinada pelas condições ambientais (*Environmental sensitive genic male sterility* – EGMS) possibilitou a obtenção de híbridos a partir de duas linhagens. Essa metodologia é mais simples e mais eficiente quando comparada com o sistema ABR (Xinggui *et al.*, 1998).

A expressão da esterilidade é influenciada por fatores ambientais, podendo ser de dois tipos (Virmani *et al.*, 1997):

a) PGMS (*Photoperiod sensitive genic male sterility*) – macho-esterilidade por sensibilidade ao fotoperíodo, o qual inclui as linhagens macho-estéreis que alternam o comportamento do pólen entre estéril e fértil em resposta ao fotoperíodo. Assim, a maioria das linhagens PGMS permanece estéril sob condições de dias longos (>13h), revertendo para a condição de fertilidade em condições de dias curtos (<13h).

b)TGMS (*Thermosensitive genic male sterility*) – macho-esterilidade por termossensibilidade, a qual inclui as linhagens macho-estéreis que alternam seu comportamento entre fertilidade e esterilidade dependendo da temperatura. Assim, a maioria das linhagens TGMS permanece estéril sob condições de altas temperaturas e reverte para a condição de fertilidade parcial em baixas temperaturas. O ponto crítico entre fertilidade e esterilidade é variável de genótipo para genótipo.

Yuan & Fu (1995) e Virmani *et al.* (1997) ressaltaram algumas vantagens do sistema de híbridos com duas linhagens (EGMS), entre elas:

- Não há necessidade de usar a linhagem mantenedora (B), isso simplifica o esquema de obtenção de híbridos e também reduz o custo da semente híbrida.
- Sob condições de dias curtos e baixas temperaturas as linhagens PGMS e TGMS, respectivamente, revertem seu comportamento para uma situação de fertilidade quase normal, sendo então possível multiplicá-las por autofecundação.
- Genes que conferem PGMS e TGMS podem ser facilmente transferidos para quase todas as cultivares de arroz, gerando novas fontes de linhagens macho-estéreis para os diversos programas de melhoramento.
- Qualquer linhagem fértil pode ser utilizada como genitor masculino. Conseqüentemente, a freqüência de híbridos heteróticos é maior entre híbridos oriundos de duas linhagens (simples) do que de três linhagens (triplos). Como não há necessidade de genes restauradores no genitor masculino no sistema de híbridos com duas linhagens, este sistema é considerado ideal para o desenvolvimento de híbridos *indica* x *japonica*, uma vez que a maioria das linhagens *japonica* não apresenta genes restauradores.

Yuan & Fu (1995) salientaram que para áreas tropicais as linhagens TGMS são mais úteis que as PGMS, pois o comprimento do dia é relativamente mais curto e a temperatura é mais elevada, ao passo que as linhagens PGMS são mais indicadas para altas latitudes.

Outro aspecto que tem sido investigado pelos melhoristas de arroz é a ocorrência e a utilização da apomixia; nesse caso, apenas uma linhagem elite seria utilizada (Yuan & Fu, 1995; Virmani *et al.*, 1998).

- **Triticale** (*X Triticosecale*)

De acordo com Baier (1999a) triticale é uma espécie sintética – híbrido interespecífico entre *Triticum* spp. L. e centeio *Secale cereale* L. – que combina a qualidade e a produtividade do trigo com a rusticidade e a resistência às doenças do centeio. Há muita controvérsia em relação ao nome científico do triticale, sendo que Varughese *et al.* (1996) sugeriram o emprego genérico de *X Triticosecale* Wittmack.

A partir do cruzamento de trigo comum (*Triticum aestivum* L.) com centeio (*Secale cereale* L.) são obtidos triticales octoplóides (28 pares de cromossomos); o cruzamento de trigo tetraplóide (*T. turgidum* L.) com centeio produzem triticales hexaplóides (21 pares de cromossomos). Dentre os vários tipos a forma hexaplóide apresenta o maior potencial agronômico, principalmente na alimentação de animais (Baier, 1999b).

Quando o triticale é derivado diretamente do cruzamento entre as espécies ancestrais, ou seja trigo e centeio, ele é dito primário, e é considerado secundário, quando é resultante do cruzamento entre primários ou destes com outros secundários. Além disso, são ditos completos os hexaplóides que contêm todos os sete pares de cromossomos dos genomas A e B – do trigo – e R do centeio; são considerados substituídos aqueles hexaplóides em que um ou mais cromossomos de centeio foram substituídos por cromossomos de trigo (Baier *et al.*,1994).

Os métodos utilizados para as espécies autógamas são rotineiramente empregados no melhoramento do triticale, principalmente a hibridação entre

genótipos de triticale hexaplóide com características complementares e posterior seleção dos indivíduos que expressem características desejáveis (Baier, 1999a).

No Brasil os principais objetivos que norteiam o melhoramento de triticale são: aumento da produtividade, resistência às doenças e à germinação pré-colheita, melhor qualidade nutricional e maior adaptação aos solos ácidos (Baier *et al.*, 1994). O desenvolvimento de triticale com dupla aptidão – forragem e grão – principalmente para cultivo em rotação com soja e milho no verão, apresenta elevado potencial de utilização no sul do Brasil (Baier & Gustafson, 1996). Além disso, constitui-se em excelente opção na diversificação dos cultivos de inverno, pois apresenta uma base genética distinta em relação às principais doenças dos cereais de inverno (Baier, 1999b).

• Cebola (*Allium cepa*)

A inflorescência da cebola é uma umbela, composta de inúmeras flores, que pode produzir de 50 a 300 sementes. A flor é completa com 6 estames. A produção de sementes via reprodução sexuada requer a ocorrência de florescimento. Entretanto, o florescimento em cebola requer um período de baixa temperatura por pelo menos dois meses. A temperatura adequada depende do ambiente, sendo de 7°C a 12°C em Pernambuco e cerca de 15°C em Minas Gerais; também pode variar de acordo com a variedade. No Brasil, somente no Rio Grande do Sul existem condições favoráveis para o florescimento natural; o bulbo é colhido em novembro-dezembro e plantado em junho-julho, passando por um choque natural de temperatura, florescendo em novembro-dezembro. A semente é colhida em período quente e seco.

No Estado de São Paulo, o florescimento da cebola só ocorre mediante choque artificial de temperatura, segundo um processo conhecido por **vernalização** ou **frigorificação**. Trata-se de um processo bianual: no primeiro ano produz-se o bulbo, o qual deve passar pela vernalização e florescer no plantio do segundo ano. A vernalização é realizada em dois períodos: no primeiro período (dezembro a março) a temperatura fica em torno de 1°C e no segundo período (até abril) entre 8°C e 12°C, para plantio em maio. Para fins de produção de sementes, a câmara frigorífica deve estar em torno de 70% de umidade.

Durante o armazenamento do bulbo é que ocorre o desenvolvimento do primórdio floral. O bulbo tem vários pontos vegetativos e para que todos os primórdios florais se desenvolvam, é necessário que a temperatura se mantenha baixa. Se houver um aumento de temperatura, pode ocorrer a "desvernalização" e os primórdios se desenvolvem em bulbo.

Para fins de melhoramento, os cruzamentos artificiais são feitos mediante emasculação. Na flor que vai ser utilizada como fêmea, arranca-se todas as flores que já abriram e deixa-se cerca de 50 flores por umbela. As anteras são arrancadas com uma pinça e, devido à ocorrência de protandria, não há perigo de autofecundação. As plantas feminina (emasculada) e masculina (polinizadora) são colocadas em vasos, lado a lado, e protegidas conjuntamente com tela ou saco. Insetos são introduzidos na proteção e se encarregam de promover a polinização. Naturalmente a cebola é procurada por abelhas, moscas e vespas, que promovem a polinização cruzada.

A emasculação artificial não tem rendimento suficiente para a produção de semente híbrida comercial. Para esse fim, utiliza-se a macho-esterilidade citoplasmática. Uma planta com citoplasma (S) que confere esterilidade masculina é utilizada como

fêmea. Uma outra linhagem ou variedade com citoplasma normal (N) é utilizada como polinizadora (Figura 5). O sistema de polinização com insetos (moscas ou abelhas) pode ser utilizado, plantando-se as plantas femininas e masculinas sob um telado protegido. As sementes colhidas nas fêmeas serão híbridas.

Jones & Emsweller, citados por Jones & Clark (1943), foram os primeiros a dar atenção ao uso da macho-esterilidade, encontrada na variedade Italian Red, na produção de híbridos comerciais de cebola. Jones & Clarke (1943) estudaram a herança da macho-esterilidade e constataram que era devido a um fator citoplasmático (S) cuja expressão depende da interação com o gene *ms*, sendo os tipos macho-estéreis de constituição (S) *msms*. A presença do gene dominante *Ms* confere fertilidade na planta com citoplasma (S). Portanto, plantas férteis podem ser do tipo (N)*msms*, (S)*MsMs* ou (S)*Msms* e as plantas macho-estéreis só podem ser do tipo (S)*msms*.

As sementes híbridas herdam o citoplasma (S) da mãe e, portanto, quando florescerem deverão ser macho-estéreis se o macho for do tipo (N)*msms*. Entretanto, o plantio comercial visa a produção de bulbos (parte vegetativa da planta) e não sementes, de modo que a condição de macho-esterilidade nas plantas híbridas é irrelevante.

A potencialidade de utilização de sementes híbridas em cebola pode ser confirmada por dados de produtividade em variedades e híbridos (Tabela 6).

Resultados de pesquisas recentes têm mostrado um grande potencial produtivo de variedades, equivalentes aos dos melhores híbridos, justificando o uso de variedades pelo menor custo de produção de sementes.

TABELA 6. Produtividade (kg de bulbo/ parcela de 40 plantas)* em variedades e híbridos.

Variedades	kg/parcela	Híbridos	kg/parcela
BAIA PIRACICABA	7,768	BAIA PIRACICABA x BARREIRO	10,118
BARREIRO	9,260	BAIA PIRACICABA x TEXAS GRANO 502	10,390
TEXAS GRANO 502	6,325	BAIA PIRACICABA x EXCEL	10,060
EXCEL	7,140	BAIA PIRACICABA x ECLIPSE	9,195
ECLIPSE	5,835	BAIA PIRACICABA x RED CRIOULE	8,022
RED CRIOULE	7,685	EXCEL x BARREIRO	11,958
Média	7,336	Média	9,957

*Fonte: Disciplina Melhoramento de Hortaliças (Dr. Marcílio Dias). Departamento de Genética, ESALQ/USP.

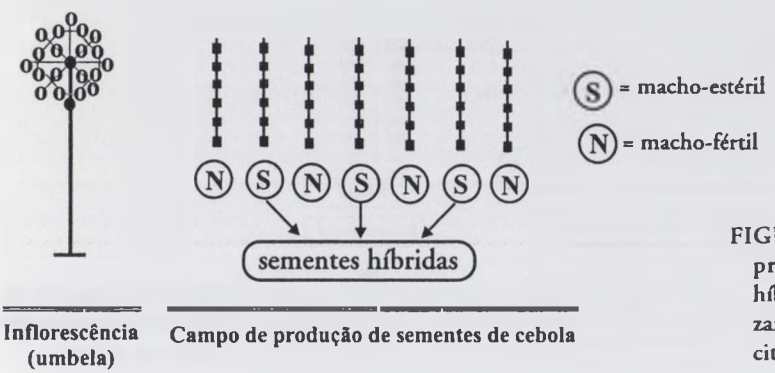


FIGURA 5. Esquema de produção de sementes híbridas de cebola utilizando macho-esterilidade citoplasmática.

• Coco (*Coccus nucifera*)

O coqueiro comum é uma palmácea que foi introduzida no Brasil após o descobrimento e espalhou-se por uma vasta área litorânea da região Nordeste, onde é identificado pelo nome vulgar de 'coco-da-baía'. O fruto destina-se ao consumo *in natura* ou à indústria. Tradicionalmente a produção do coco no Brasil tem sido pela exploração das populações naturais locais. Trata-se de uma espécie alógama, com as flores masculinas e femininas na mesma inflorescência (cacho), porém separadas espacialmente, ou seja, com localização das flores femininas na base e das masculinas na extremidade do cacho. Por ser espécie alógama, existe grande variabilidade genética dentro de populações naturais, mas há também marcante diferenciação entre populações. Na exploração comercial das populações naturais a variabilidade entre plantas representa um inconveniente por dificultar a produção de amêndoas com tamanho e peso padronizados.

A exploração de híbridos no Brasil já se iniciou há mais de duas décadas e tem apresentado a vantagem de maior produtividade e uniformidade dos frutos. No programa de hibridação, busca-se inicialmente determinar a capacidade de combinação entre populações brasileiras e introduzidas, sendo estas principalmente da Costa do Marfim (África) e também de Taiti, Índia, Malásia, Filipinas, Indonésia e outros países ou regiões tropicais.

Nas populações de coqueiro se destacam duas categorias: 'Gigante' e 'Anão'; as populações do tipo 'Anão' são autógamas e se diferenciam em dois grupos distinguidos pela cor do fruto: verde e amarelo.

Uma vez identificadas as combinações mais promissoras entre populações, o segundo passo é a identificação de genótipos dentro de populações que apresentem boa capacidade de combinação com a população contrastante. Para esse fim, tem-se utilizado um esquema de cruzamento recíproco (Figura 6) que se assemelha ao método de seleção recorrente recíproca delineado por Comstock *et al.* (1949).

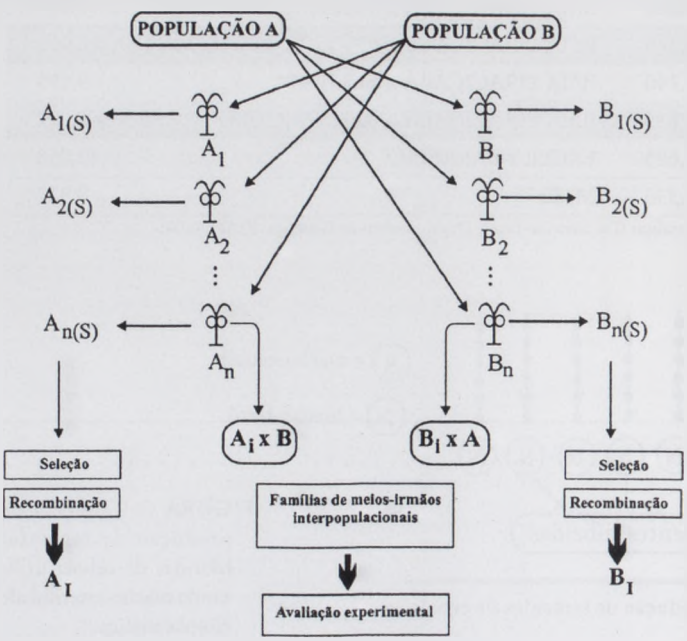


FIGURA 6. Esquema de cruzamento recíproco utilizado em coco.

No esquema, plantas individuais da população A são emasculadas e cruzadas com uma mistura de pólen da população B, e vice-versa. Destes cruzamentos resultam famílias de meios-irmãos ao nível interpopulacional, A_1 x B e B_1 x A. As famílias são avaliadas experimentalmente para a identificação dos melhores genótipos de A que cruzam bem com B, e vice-versa. As plantas individuais que participam dos cruzamentos são também autofecundadas simultaneamente, dando origem a sementes S_1. As sementes S_1 correspondentes aos genótipos selecionados com base nas famílias de cruzamento são plantadas em lotes isolados para recombinação, sendo um para cada população. As sementes colhidas nos lotes de recombinação, representam as respectivas populações de primeiro ciclo (A_1 e B_1).

As sementes S_1 dos melhores genótipos de cada população são também multiplicadas por cruzamento fraternal (dentro da linha). As linhas endogâmicas assim multiplicadas deverão ser avaliadas em cruzamentos específicos com linhagens da população contrastante, com vistas à identificação de combinações híbridas específicas superiores.

O esquema apresentado também pode ser utilizado quando de um dos lados tem-se uma linhagem endogâmica em vez de uma população. Neste caso, a seleção é feita só de um lado simplificando o esquema de cruzamento e a avaliação.

• **Dendê** (*Elaeis guineensis*) e **Caiaué** (*Elaeis olerifera*)

O dendê e o caiaué, duas importantes espécies das palmáceas, apresentam elevado potencial de produção de óleo vegetal. O dendê é originário da África e foi introduzido no Brasil na época da escravatura. Como espécie monóica e de polinização cruzada, ocorreu uma expansão de variabilidade que se diversificou em populações naturais. Além das populações brasileiras, outras fontes de germoplasma provêm de Angola, Malásia, Costa do Marfim, Nova Guiné, Camarões, Indonésia, Nigéria e outros países.

Para fins de seleção, o fruto do dendê é dividido em três partes: casca, mesocarpo e amêndoa ou palmiste. O objetivo da seleção é a maior produção de óleo por hectare e, portanto, a elevação da espessura do mesocarpo e do seu teor de óleo se fazem necessárias. A espessura da casca do fruto é controlada por um loco com dois alelos (D,d) que resultam nos seguintes genótipos: DD: Dura, Dd: Tenera e dd: Pisífera. Estes três tipos são representados no esquema abaixo.



Em geral os híbridos de interesse são do tipo Dura x Tenera e Dura x Pisífera. A inflorescência (cacho) contém flores femininas na base e masculinas na extremidade. A hibridação se faz mediante emasculação das plantas tomadas como femininas, seguindo-se a polinização com pólen coletado nas plantas masculinas.

O caiaué (*E. oleifera*) pertence ao mesmo gênero do dendê mas seu centro de origem é a bacia Amazônica, onde está representado por um grande número de

populações que cobrem grande área e diversos países. As fontes de germoplasma mais importantes provêm da própria Amazônia brasileira e seleções desenvolvidas na Costa Rica, Colômbia, Panamá, Nicarágua e Suriname.

Tanto para o dendê como para o caiaué, o esquema de seleção utilizado tem semelhança ao esquema de seleção recorrente recíproca sugerido por Comstock *et al.* (1949). O esquema geral de cruzamento e seleção assemelha-se ao do coqueiro, já apresentado anteriormente. Investigações recentes têm mostrado um grande potencial para aproveitamento do híbrido interespecífico *Elaeis guineensis* x *Elaeis olerifera* e, para esse fim, estratégias de intercâmbio de germoplasma de caiaué do Brasil e outros países produtores de dendê têm sido incrementadas.

• Repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Existe uma grande variação entre os híbridos intervarietais de repolho com relação ao rendimento, maturação, qualidade etc. A produção de híbridos em repolho torna-se possível graças à existência de um sistema de alelos múltiplos (S_1, S_2, S_3, ...) que conferem auto-incompatibilidade (tipo esporofítica). Assim, um genótipo S_1S_2 não se autofecunda e tampouco cruza com outra planta do mesmo genótipo. O primeiro passo em um programa de obtenção de híbridos é a identificação de linhas (obtidas por autofecundação no estágio de botão), que diferem quanto aos genes de incompatibilidade (ex: S_1S_2 x S_3S_4). O cruzamento se dá naturalmente entre duas linhas auto-incompatíveis, sendo que ambas as linhas produzem sementes híbridas (Figura 7). No Brasil já se cultivaram híbridos de origem japonesa (ex. Matsumaki-Riso e Shikidori) e híbridos intervarietais locais (ex. Repolho Louco x var. Sebastião Garcia).

Resultados sobre o potencial de híbridos e variedades de repolho com potencial para o cultivo de verão foram apresentados por Ikuta *et al.* (1965) e são resumidos na Tabela 7. O peso médio de cabeças variou de 464g (Tokinashi-Riso) a 3.222g (Sabauna). Outras características como precocidade e resistência a doenças (*Xanthomonas* sp. e *Pseudomonas* sp.) foram avaliadas e também mostraram grande variabilidade.

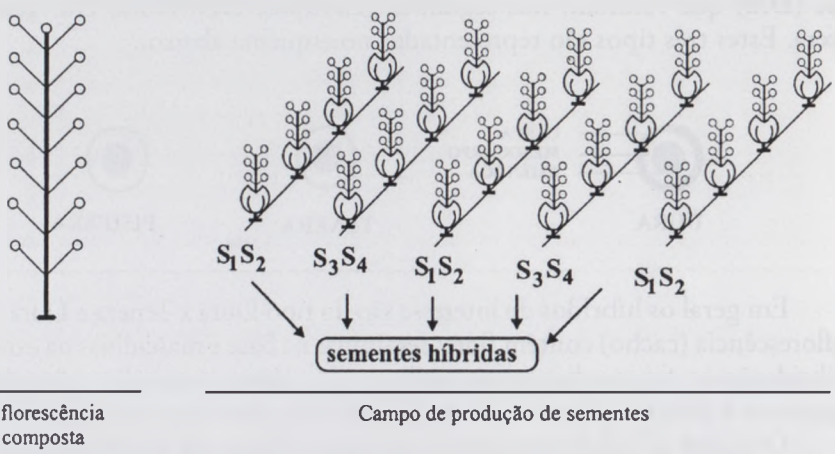


FIGURA 7. Ilustração de um campo de produção de sementes híbridas em repolho.

TABELA 7. Peso médio (g) de cabeças de variedades e híbridos de repolho.

Cultivar	Tipo	Peso*	Cultivar	Tipo	Peso*
BANCHU-RISO	H	630	AKIMAKI-CHU-SOSEI	H	1176
SOSEI-RISO	H	850	AKI-SOSEY	H	1096
SHIKI-RISO	H	474	LOUCO MOGI DAS CRUZES	VB	1414
UJI-ICHIGO	H	1442	UJI-MIDORI	H	1226
NATSUMAKI-BANSHUM	H	978	HAIATORI-GUMARI	H	1538
NATSUMAKI-RISO	H	764	ICHIGO	H	1732
BANKAMARI-SHIGATSUDORI	H	1052	YOSHIN-1	H	1278
SHIKIDORI	H	678	OITA-SHOKAMIAKI-ICHIGO	VJ	1214
NATSUMAKI-NIGATSUDORI	H	660	YOSHIN-2	VJ	1300
CHUSEI	H	1310	HATSUAKI-TORI	H	1952
TOKINASHI-RISO	H	464	OITA-SHOKAMAKI-NIGO	VJ	1324
TOKUSHIN	VJ	974	YOSHIN-3	VJ	1384
KUROBA-CHUSEI-B	H	812	SABAUNA	VJ	3222
YOSHUM	H	936	NAMBU-WAKAGOMA	VJ	1258
AKIMAKI-CHUSEI	H	1222	KUKO-109	H	1494
TOP	H	1524	GOMARU	H	1260
MIYOSHI-KAHO	VJ	1214	HAYATORI-GOGO	H	1516
KUKAMOTO-NATSUMAKI	H	1412	AKIMAKI-SOSEI	H	1160
NEW TOP	H	1578	KUKO-103	H	1114
LOUCO-PIRACICABA	VB	1226	KUKAMOTO-KATSUMAKI	H	1048
EKO	H	878	C.M.	H	678
SHINSHU	H	1244	SIM-YOSHIN	VJ	1078
KUROBA-CJUSEI-A	H	808	SOSEI-MARU	H	648
ROKUMARU	H	1424	SOSEI	H	1412
CABBAGE	H	1048	KUKAMOTO-KATSUMAKI-2	H	960
HIGH-CROP	H	1654	YOSHIN-4	H	1390
SHOISHU	H	1402	YOSHIN-5	VJ	1696

H – híbridos de origem japonesa; VJ – variedades de origem japonesa; VB – variedades brasileiras.
*Peso médio de parcelas com 20 plantas em três repetições. Fonte: Ikuta *et al.* (1965)

• **Couve-flor** (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)

Da mesma maneira que o repolho, a couve-flor apresenta sistema de auto-incompatibilidade, o que possibilita a produção de semente híbrida. Pela utilização de plantas auto-incompatíveis, a produção de semente híbrida torna-se um processo economicamente viável pelo seu alto rendimento. Os cruzamentos ocorrem naturalmente nos campos de produção de sementes, as quais são colhidas em ambos os genitores. Na Tabela 8 são apresentados resultados de avaliação de variedades e híbridos de couve-flor.

TABELA 8. Peso médio de "cabeças" (inflorescência) e porcentagem de cabeças boas (CB: tipo aceitável no mercado) em variedades e híbridos de couve-flor.

População	%CB	Peso médio (g)
YAMAGUSHI x PIRACICABA	97,1	871
CAMPINAS x PIRACICABA	90,1	1142
TERESÓPOLIS x PIRACICABA	89,9	936
NAKAMURA x PIRACICABA	88,9	1099
HORÁCIO NEVES x PIRACICABA	84,1	1026
YAMADA x PIRACICABA	66,7	569
PIRACICABA	63,8	400
HOMJO x PIRACICABA	32,0	927

*Fonte: Disciplina Melhoramento de Hortaliças (Dr. Marcílio Dias). Departamento de Genética, ESALQ/USP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, A.; RANGEL, P.H.N. Agronomical viewpoints. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. (Ed.) **Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with the emphasis on the genus *Oryza*.** São Paulo: Monbusho; FAPESP, 1994. p.77-78. (Report from 1992/1993 Amazon Project)

BAIER, A.C. Hibridação em triticale. In: BORÉM, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999a. p.499-516.

BAIER, A.C. Melhoramento do triticale. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999b. p.573-588.

BAIER, A.C.; GUSTAFSON, J.P. Breeding strategies for triticale. In: GUEDES-PINTO, H.; DARVEY, N.; CARNIDE, V.P. (Ed.) **Triticale:** today and tomorrow. Dordrecht: Kluwer, 1996. p.563-569. (Developments in Plant Breeding, 5)

BAIER, A.C.; NEDEL, J.L.; REIS, E.M.; WIETHÖLTER, S. **Triticale:** cultivo e aproveitamento. Passo Fundo: EMBRAPA, CNPT, 1994. 72p. (Documentos, 19).

BEAL, W.J. Indian Corn Report Mich. Board Agric. v.19, p.279-289, 1880.

CASTIGLIONI, V.B.R.; OLIVEIRA, M.F. Hibridação em girassol. In: BORÉM, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999a. p.295-306.

CASTIGLIONI, V.B.R.; OLIVEIRA, M.F. Melhoramento do girassol. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999b. p.351-384.

CASTRO, E.M.; BRESEGUELLO, F.; RANGEL, P.H.N.; MORAES, O.P. Melhoramento do arroz. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999. p.95-130.

CLAUSEN, J. **Stages in the evolution of plant species**. Ithaca: Cornell University Press, 1951.

COCKERHAM, C.C. Implications of genetic variances in a hybrid breeding program. **Crop Science**, v.1, p.47-52, 1961.

COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H.F.; HARVEY, P.H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. **Agronomy Journal**, v.41, p.360-367, 1949.

DARWIN, C. **The effects of cross and self-fertilization in the vegetable kingdom**. New York: Appleton, 1877.

GUIMARÃES, E.P. Hibridação em arroz. In: BORÉM, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999. p.101-119.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, v.35, p.1-16, 1990.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1995. 468p.

IKUTA, H.; KAWASAKI, S.; VENCOVSKY, R. Ensaio de variedades e híbridos de repolho para o verão. Piracicaba: USP/ESALQ, Depto. de Genética, 1965. 6p. (Publicação Didática)

JONES, D.F. The effects of inbreeding and crossbreeding upon development. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, v.207, p.5-100, 1918.

JONES, H.A.; CLARKE, A.E. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.43, p.189, 1943.

KIHARA, H. Triploid watermelon. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.58, p.217-230, 1951.

LECLERCQ, P. Une stérileté cytoplasmique chez le tomesol. **Annales de l' Amelioration des Plantes**, v.19, p.99-106, 1969.

MARINKOVIC, R.; MILLER, J.F. A new cytoplasmic male sterility source from wild *Helianthus annuus*. **Euphytica**, v.82, p.39-42, 1995.

McKENZIE, K.S.; BOLLICH, C.N.; RUGTER, J.N.; MOLDENHAUER, K.A.K. Rice. In: FEHR, W.R. (Ed.) **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan Publishing, 1987. v.2, p.487-532.

MILLER, J.F. Sunflower. In: FEHR, W.R. (Ed.) **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan Publishing, 1987. v.2, p.626-668.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, P.V. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (Ed.) **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.277-340.

MORISHIMA, H. American wild rice as compared with Asian relatives. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. (Ed.) **Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with the emphasis on the genus *Oryza***. São Paulo: Monbusho; FAPESP, 1994. p.52-57. (Report from 1992/1993 Amazon Project)

MÜNTZING, A. The evolutionary significance of autopoliploidy. **Hereditas**, v.21,p.263-378, 1936.

QUINBY, J.R.; SCHERTZ, K.F. Sorhum genetis, breeding, and hybrid seed production. In: WALL, J.S.; ROSS, W.M. (Ed.) **Sorghum production and utilization**. Westport: Avi Publishing, 1970.

SHULL, A.F. The influence of inbreeding on vigor in *Hydatina senta*. **Biological Bulletin**, v.24, p.1-13, 1912.

SHULL, G.H. The composition of a field of maize. **American Breeders Association Report**, v.4, p.296-301, 1908.

SHULL, G.H. A pure-line method of corn breeding. **American Breeders Association Report**, v.5, p.51-59, 1909.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A.; DIAS, R.C.S. Melancia sem sementes: desenvolvimento e avaliação de híbridos triplóides experiemntais de melancia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.9, p.90-95, 1999.

UNGARO, M.R.G. Estrutura genética de subpopulações (controle e irradiada) em girassol (*Helianthus annuus* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1993. 133p. Tese, Doutorado.

VARUGHESE, G.; PFEIFFER, W.H.; PEÑA, R.J. Triticale: a successful alternative crop: Part 1. **Cereal Foods World**, v.41, p.474-482, 1996.

VIRMANI, S.S.; VIRAKTAMATH, B.C.; CASAL, C.L.; TOLEDO, R.S.; LOPEZ, M.T.; MANALO, J.O. **Hybrid rice breeding manual**. Los Baños: Inetrnational Rice Research Institute, 1997. 151p.

VIRMANI, S.S.; SIDDIQ, E.A.; MURALIDHARAN, K. (Ed.) Advances in hybrid rice technology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HYBRID RICE, 3., Hyderabad, Índia, 1996. **Proceedings**. Manila: International Rice Research Institute, 1998. 443p.

WELLHAUSEN, E.J. Exotic germplasm for improvement of Corn Belt maize. In: ANNUAL HYBRID CORN INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 20., Chicago, 1965. **Proceedings**. Washington, American Seed Trade Association, 1965. p.31-45.

WINGE, O. The chromosomes, their numbers and general importance. **Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg**, v.13, p.131-276, 1917.

XINGGUI, L.; VIRMANI, S.S.; RENCUI, Y. Advances in two-line hybrid rice breeding. In: VIRMANI, S.S.; SIDDIQ, E.A.; MURALIDHARAN, K. (Ed.) **Advances in hybrid rice technology**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HYBRID RICE, 3., Hyderabad, Índia, 1996. **Proceedings**. Manila: International Rice Research Institute, 1998. p.89-98.

YUAN, L.P.; FU, X.Q. **Technology of hybrid rice production**. Rome: FAO, 1995. 84p.

20

ENDOGAMIA OU CONSANGÜINIDADE

JOSÉ B. MIRANDA FILHO

Depto. Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.

1. GENERALIDADES

Endogamia é o cruzamento entre indivíduos aparentados e pode ocorrer naturalmente em muitos organismos. As chamadas espécies **autógamas** (ex: feijão, soja, arroz) apresentam o máximo grau de endogamia que é a autofecundação, a qual literalmente representa o cruzamento de um indivíduo com ele mesmo, o que reflete o máximo grau de parentesco. Por outro lado, a endogamia ocorre com muito menor intensidade nas chamadas espécies **alógamas**, com taxa de cruzamento >95%. Algumas espécies de plantas (ex: algodão e sorgo) apresentam taxas intermediárias de endogamia. De qualquer modo, a autofecundação só pode ocorrer nos organismos bissexuados, tais como as plantas hermafroditas – órgãos masculino e feminino na mesma flor – e as monóicas – órgãos masculino e feminino na mesma planta porém em órgãos separados (Figura 1).

Nas espécies dióicas (plantas dióicas e animais em geral) a reprodução só se processa por cruzamento e não há possibilidade de autofecundação. Nestas espécies a endogamia só pode ocorrer por cruzamento direto de indivíduos aparentados ou cruzamentos continuados em populações pequenas. Em populações pequenas existe maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos aparentados. Entretanto, em espécies de plantas panmíticas nas quais a polinização é ao acaso, as plantas são polinizadas por uma nuvem de pólen que provém literalmente de toda a população, mas não se identifica exatamente cada um dos pais doadores de pólen. Neste caso, talvez seja impróprio referir-se a cruzamento entre parentes, pois o parentesco não é revelado; entretanto, o parentesco está implícito, desde que há probabilidade de um indivíduo (fêmea) receber genes que provêm de um ancestral comum, que, em última análise, é o que define endogamia.



Flor hermafrodita Planta monóica

FIGURA 1. Representação esquemática de uma flor (planta) hermafrodita e de uma planta monóica.

A endogamia é considerada, em muitos casos, como indesejável, principalmente nas populações panmíticas. Isto porque a endogamia conduz à homozigose e, nestas populações, existem genes recessivos **deletérios** que, quando em homozigose, causam prejuízo à fisiologia da planta ou do animal, diminuindo o seu valor fenotípico. Os genes deletérios são genes defectivos que diminuem ou bloqueiam passos metabólicos importantes para a fisiologia do organismo. Em casos extremos, tais genes podem ser **semiletais** (os indivíduos se desenvolvem mas perecem antes do tempo normal) ou **letais** (morte do indivíduo na fase inicial). Um exemplo de gene letal é o albinismo em milho, causado pelo gene recessivo *a*, sendo que uma planta homozigota (*aa*) é completamente desprovida de pigmento (clorofila); as folhas são brancas e a plântula sobrevive somente por uns poucos dias, enquanto houver reservas da semente.

Por outro lado, em muitos esquemas de melhoramento a endogamia é necessária ou mesmo um processo auxiliar para se atingir o objetivo desejado. Nas espécies autógamas tais como o trigo, a soja e o feijão, o objetivo do melhoramento é quase sempre a obtenção de **linhas puras** (homozigóticas). Nestes casos, a endogamia é natural pois as plantas se autofecundam naturalmente. Nas espécies de plantas alógamas, os tipos endogâmicos podem ser utilizados de diversas formas no melhoramento, tal como a utilização de progênies S_1 (obtidas de uma autofecundação), como unidade de seleção e/ou unidade de recombinação nos esquemas de seleção recorrente; ou a utilização de linhas puras, obtidas por autofecundação artificial sucessiva, para a obtenção de híbridos de linhagens (Figura 2).

Em animais, a endogamia também pode ser de interesse do melhoramento. Por exemplo, no desenvolvimento de uma nova raça, predominantemente homozigótica e com características definidas, pode-se utilizar endogamia branda para atingir-se o grau de homozigose desejada.

Em resumo, o melhoramento de plantas e de animais busca a obtenção de genótipos desejáveis e quando tais genótipos são os homozigóticos (linhas puras em plantas, raças em animais) ou requerem homozigose em uma fase intermediária (seleção recorrente com endogamia, obtenção de híbridos de linhagens) então a endogamia tem o seu papel.



FIGURA 2. Representação do porte da planta de milho na população não endógama (S_0) e em gerações sucessivas de autofecundação (S_1, S_2, ...).

2. COEFICIENTE DE ENDOGAMIA

Quando estudamos a endogamia ou a utilizamos no melhoramento, não é suficiente apenas entender o seu significado, mas é também importante saber quantificá-la e conhecer os seus efeitos sobre os indivíduos e as populações.

A medida mais comum da endogamia é o **coeficiente de endogamia** (F) introduzido por Sewal Wright em 1922 e reparametrizado por Malécot em 1949. A definição de Wright se baseia no conceito de correlação entre gametas que se unem e que provêm de pais consangüíneos, sendo o indivíduo um membro da população sob análise. A definição de Malécot expressa o coeficiente de endogamia em termos de probabilidade e se aplica a um único indivíduo.

Coeficiente de Endogamia: Wright

Coeficiente de endogamia (F) de um indivíduo na população é o coeficiente de correlação entre gametas que se unem

Coeficiente de Endogamia: Malécot

Coeficiente de endogamia (F) é a probabilidade de dois alelos em um determinado loco serem idênticos por descendência

Dois alelos são considerados idênticos por descendência se eles forem cópias idênticas de um gene que existia em um ancestral comum. Para melhor compreensão da definição dada por Malécot, considere-se o seguinte esquema genealógico (Figura 3):

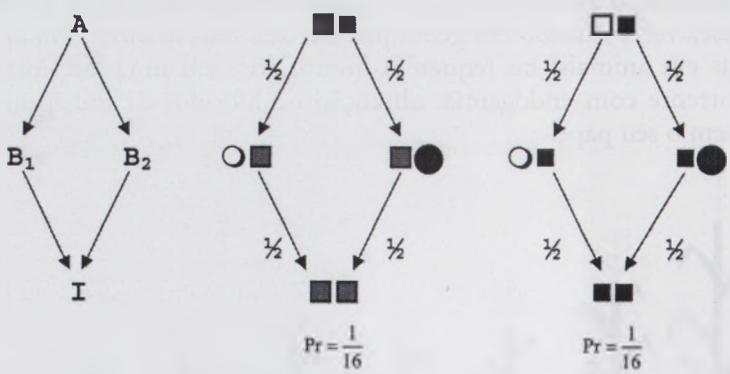


FIGURA 3. Esquema genealógico do cruzamento de meios-irmãos (B_1 e B_2) com ancestral comum em A, originando o indivíduo I com probabilidade Pr de homozigose por descendência.

No esquema acima (ver figura à esquerda), os indivíduos B_1 e B_2 não são endógamos, mas são parentes (meios-irmãos). O cruzamento B_1 x B_2 é que resulta na endogamia ou consangüinidade; o indivíduo I, que representa a descendência daquele cruzamento, é endógamo. Na figura ao centro, representa-se a probabilidade de o indivíduo I ser portador de dois alelos (cinza) que são cópias idênticas de um alelo

que existia em um ancestral comum (A); o valor $\frac{1}{2}$ que acompanha cada seta representa a probabilidade de um ascendente (ex. A) passar aquele alelo (cinza) para o descendente (ex. B_1). Multiplicando-se todas as probabilidades, verifica-se que a probabilidade de o indivíduo I ser homozigoto (por descendência) para o alelo cinza é de $(\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$. Aplica-se o mesmo raciocínio na figura à direita e verifica-se que a probabilidade de o indivíduo I ser homozigoto (por descendência) para o alelo preto é de $(\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$. Portanto a probabilidade de o indivíduo I ser homozigoto (por descendência) para qualquer dos alelos é $\frac{1}{16} + \frac{1}{16} = \frac{1}{8} = (\frac{1}{2})^3$. Neste exemplo, o coeficiente de endogamia (F) é $\frac{1}{8} = 0{,}125$, significando que a probabilidade de o indivíduo I ser homozigoto (por descendência) é de 12,5%. Conseqüentemente, a probabilidade de o indivíduo não ser homozigoto por descendência é de $\frac{7}{8}$. Nesta probabilidade incluem-se heterozigotos e outros homozigotos que não por descendência, sendo estes chamados de **homozigotos em estado**; por exemplo, o indivíduo pode ter o genótipo AA mas os dois alelos não provêm de um mesmo ancestral comum.

O expoente 3 na equação tem um significado prático: ele representa o número de ancestrais no esquema genealógico. Assim, para esquemas simples a fórmula do coeficiente de endogamia é expressa por $F_I = (\frac{1}{2})^n$. Esta fórmula é válida quando o ancestral comum não é endógamo ($F_A = 0$) ; nos casos em que $F_A > 0$, ou seja, o ancestral comum já exibe um certo grau de endogamia, esta probabilidade é adicionada na descendência. A fórmula geral é

$$F_I = (\tfrac{1}{2})^n (1+F_A); \text{ sendo } 0 \leq F_A \leq 1.$$

Note-se que, para que haja possibilidade de um indivíduo ser homozigoto por descendência, ele deve receber genes que provêm de um ancestral comum por dois caminhos diferentes. No esquema onde se utilizam setas para representar um esquema genealógico, o ancestral comum é o indivíduo onde a seta muda de sentido (do sentido horário para o anti-horário, ou vice-versa). O ancestral comum mais os outros ancestrais que completam o esquema genealógico perfazem um *percurso*. Em cada percurso só existe um ancestral comum, mas um ancestral comum pode participar em mais de um percurso. Deste modo, em um complexo esquema de cruzamentos para se chegar ao indivíduo I, podem existir vários percursos, cada um com o seu ancestral comum. Exemplo (Figura 4):

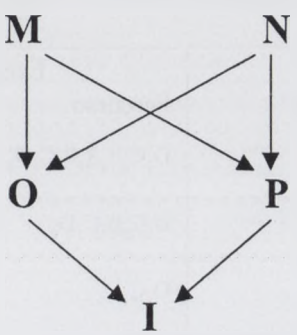


FIGURA 4. Genealogia do indivíduo endógamo (I) com dois ancestrais comuns (M e N).

Neste caso, existem dois ancestrais comuns: M e N; significa que I pode ser homozigoto para alelos que vêm de M ou para alelos que vêm de N. As respectivas probabilidades são calculadas separadamente:

$F_I = \left(\frac{1}{2}\right)^3 (1+F_A) = \frac{1}{8}$, para o percurso PMO

$F_I = \left(\frac{1}{2}\right)^3 (1+F_A) = \frac{1}{8}$, para o percurso PNO

Portanto, $F_I = \frac{1}{8} + \frac{1}{8} = \frac{1}{4} = 0{,}25$

Em geral para se determinar F em um sistema genealógico, segue-se o roteiro seguinte:

a) Identificar os ancestrais comuns; podem ser sublinhados para sua fácil visualização.
b) Estabelecer os percursos que passam por cada um dos ancestrais comuns; um mesmo percurso não pode passar duas vezes por qualquer ancestral.
c) Determinar o número n_i (número de ancestrais) em cada percurso.
d) Conhecer o coeficiente de endogamia (F_{Ai}) de cada um dos ancestrais comuns.
e) Aplicar a fórmula: $F_I = \sum_i \left(\frac{1}{2}\right)^{n_i} (1 + F_{Ai})$

Os exemplos da Figura 5 mostram os passos para o cálculo do coeficiente de endogamia.

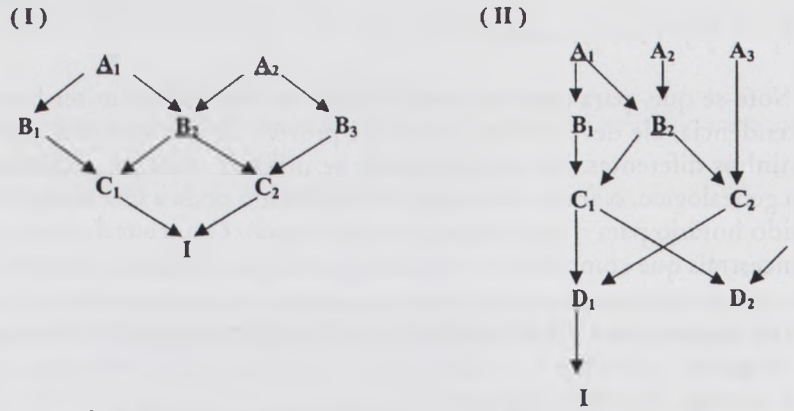


FIGURA 5. Exemplos de esquemas genealógicos em sistema irregular de endogamia.

Exemplos:

Exemplo (I):		Exemplo (II):	
Percurso	Probabilidade	Percurso	Probabilidade
$C_1B_1\underline{A_1}B_2C_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^5 = \frac{1}{32}$	$D_1C_2B_2\underline{A_1}B_1C_1D_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^7 = \frac{1}{128}$
$C_1B_2\underline{A_2}B_3C_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^5 = \frac{1}{32}$	$D_1C_2\underline{B_2}C_1D_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^5 = \frac{1}{32}$
$C_1\underline{B_2}C_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^3 = \frac{1}{8}$	$D_1\underline{C_1}D_2$	$\left(\frac{1}{2}\right)^3 = (1+F_{C1}) = \frac{1}{8}\left(1+\frac{1}{8}\right) = \frac{9}{64}$
$\therefore F_I = \frac{1}{32} + \frac{1}{32} + \frac{1}{8} = \frac{3}{16} = 0{,}1875$		$\therefore F_I = \frac{1}{128} + \frac{1}{32} + \frac{9}{64} = \frac{23}{128} = 0{,}1797$	

Para melhor compreensão da definição de Wright para o coeficiente de endogamia, considere-se uma população panmítica com as freqüências alélicas p(A) e q(a). A população em equilíbrio terá o seguinte arranjo genotípico: $(pA + qa)^2 = p^2$ AA + 2pq Aa + q^2 aa. Esta é a população **base** ou população **de referência**, na qual não existe endogamia. Suponha-se que nesta população não endógama passe a ocorrer endogamia (cruzamento não ao acaso) com um coeficiente de endogamia médio de F. A nova estrutura da população, agora sob endogamia, é delineada do seguinte modo: se a probabilidade de um indivíduo possuir um alelo A é p e se a probabilidade de este indivíduo possuir dois alelos idênticos por descendência é F, então a probabilidade de os dois alelos idênticos por descendência serem A é Fp. A probabilidade de dois alelos de um indivíduo não serem idênticos por descendência é 1- F, sendo p^2 : 2pq : q^2 a proporção esperada para os genótipos AA, Aa e aa, respectivamente. Portanto, a estrutura da população sob endogamia será:

$$F(pAA + qaa)+(1 - F)(p^2 AA + 2pq\ Aa + q^2aa) = (p^2 + Fpq)AA + 2(1\text{-}F)pq\ Aa + (q^2 + Fpq)\ aa$$

O coeficiente de endogamia (F) para a população foi denominado por Wright de *índice de fixação* (de onde vem o símbolo F). Do mesmo modo, a proporção 1-F = P foi denominada de *índice de panmixia.*

Na população endógama ocorre um aumento de homozigose e uma diminuição de heterozigose, em comparação com a população panmítica. O decréscimo de heterozigose ocorre na proporção de P = 1-F e a população totalmente endogâmica (F=1) se reduz a uma mistura de linhas puras AA e aa nas proporções $(p^2+pq)= p(p+q)= p$ e $(q^2+pq) = q(p+q)=q$, respectivamente. Porém, uma geração de panmixia remove o acúmulo de homozigose.

Tome-se X e Y como variáveis aleatórias representando os gametas masculinos e femininos na população, com valores arbitrários de 1 para ocorrência do alelo A e 0 para ocorrência do alelo a. A união dos gametas sob endogamia resulta na seguinte estrutura populacional:

	Y	A	a	Total
X		(1)	(0)	
A	(1)	p^2 + Fpq	(1 - F)pq	p
A	(0)	(1 - F)pq	q^2 + Fpq	q
	Total	p	q	1

Deste quadro, obtêm-se:

Médias ..... $m_X = m_Y = p(1) + q(0) = p$

Variâncias..... $\sigma_X^2 = \sigma_Y^2 = p - p^2 = p(1-p) = pq$

Covariância..... $COV_{XY} = p^2 + Fpq - p^2 = Fpq$

Coeficiente de correlação..... $\rho_{XY} = \dfrac{COV_{XY}}{\sqrt{\sigma_X^2.\sigma_Y^2}} = F$

Observação:

As fórmulas de média, variância e covariância são aquelas apropriadas para dados classificados, ou seja, $m_y = \Sigma f_i Y_i$; $\sigma^2_Y = \Sigma f_i Y_i^2 - m^2_Y$; $cov_{XY} = \Sigma f_i X_i Y_i - m_X m_Y$

3. SISTEMAS DE ENDOGAMIA

Os exemplos até agora apresentados referem-se ao cálculo do coeficiente de endogamia em qualquer sistema genealógico; podem, assim, ser chamados de **sistemas irregulares de endogamia**. Quando se utiliza a endogamia de maneira sistemática, repetindo-se a cada geração o mesmo sistema de cruzamento da geração anterior, então pode-se denominar de **sistemas regulares de endogamia**. Dentre estes, alguns serão apresentados neste capítulo.

3.1 SISTEMA DE AUTOFECUNDAÇÕES SUCESSIVAS

Este é o sistema natural de reprodução nas espécies autógamas, mas pode ser aplicado artificialmente em algumas espécies alógamas bissexuadas como o milho. No caso específico da autofecundação, como sistema de endogamia, a população atinge rapidamente um alto grau de homozigose, conforme se pode verificar pelo diagrama da Figura 6 que mostra o efeito de autofecundações sucessivas a partir de um indivíduo heterozigoto para um dado loco.

O diagrama da Figura 6 mostra que, por exemplo, com duas autofecundações, 75% das plantas serão homozigóticas (**BB** ou **bb**), para um determinado loco; ou que uma determinada planta deve apresentar cerca de 75% de seus genes em homozigose. O diagrama mostra também que a proporção de heterozigotos diminui pela metade em cada geração de autofecundação e tende a zero para um número crescente de gerações. Se considerarmos dois locos, vemos que após uma autofecundação, a população apresentará 25% de indivíduos completamente homozigóticos.

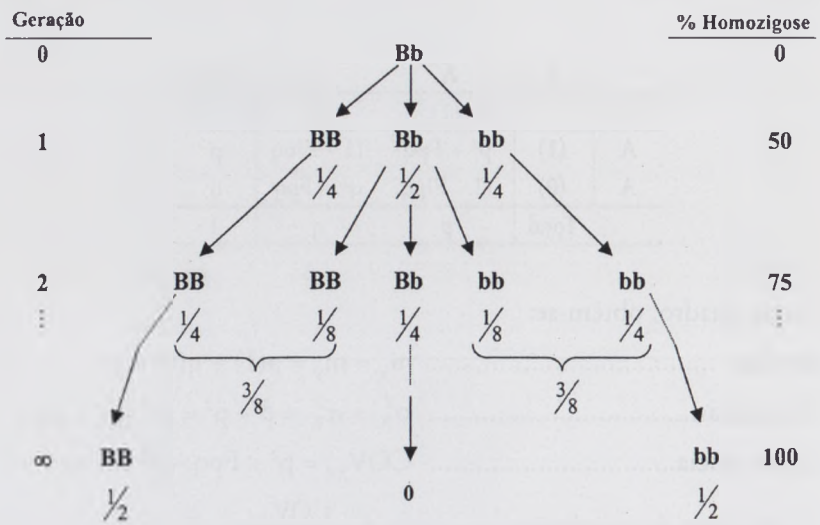


FIGURA 6. Efeito da autofecundação na freqüência de homozigotos e heterozigotos.

Para um número qualquer (n) de locos inicialmente em heterozigose, depois de m gerações de autofecundação a proporção esperada de indivíduos completamente homozigóticos é dada por $[1-(\frac{1}{2})^m]^n$. A Tabela 1 mostra a probabilidade de homozigose para um número variável de locos após sucessivas autofecundações.

A Figura 7 mostra graus de homozigose na população em diferentes gerações de autofecundação.

Os valores percentuais na Figura 7 representam 100 (1-F), sendo F os valores mostrados na Tabela 6.

Pela Tabela 1 verifica-se claramente que a autofecundação conduz uma população rapidamente à homozigose, mesmo para um grande número de locos inicialmente em heterozigose. O resultado final é que a autofecundação conduz a uma população homozigótica, mas não geneticamente homogênea, pelo fato de que populações assim obtidas são constituídas por diferentes tipos de homozigotos, ou diferentes **linhas puras**.

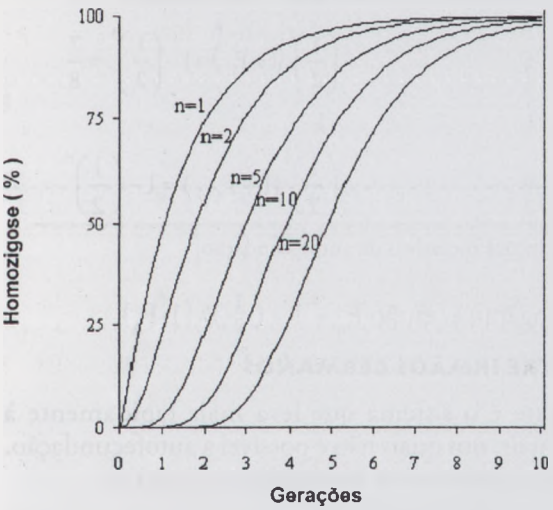


FIGURA 7. Proporção de homozigose na população para diversos números (n) de locos em sucessivas gerações de autofecundação.

A proporção de homozigose esperada por autofecundações sucessivas a partir de um indivíduo heterozigoto, equivale ao coeficiente de endogamia (F), por definição (ver Figura 8).

TABELA 1. Probabilidade* de homozigose em todos os locos para diferentes números de locos (n) e de gerações de autofecundação (m).

Nº de gerações	Número de locos segregantes								
	1	2	3	4	5	10	20	...	n
1	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	0,1	<10-4		$[1-(\frac{1}{2})]^n$
2	75,0	56,3	42,2	31,6	23,7	5,6	0,3		$[1-(\frac{1}{2})^2]^n$
3	87,5	76,6	67,0	58,6	51,3	26,3	6,9		$[1-(\frac{1}{2})^3]^n$
4	93,8	87,9	82,4	77,2	72,4	52,4	27,5		$[1-(\frac{1}{2})^4]^n$
5	96,9	93,8	90,9	88,1	85,3	72,8	53,0		$[1-(\frac{1}{2})^5]^n$
10	99,9	99,8	99,7	99,6	99,5	99,0	98,1		$[1-(\frac{1}{2})^{10}]^n$
⋮									⋮
m	$[1-(\frac{1}{2})^m]$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^2$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^3$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^4$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^5$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^{10}$	$[1-(\frac{1}{2})^m]^{20}$	...	$[1-(\frac{1}{2})^m]^n$

*Probabilidade expressa em percentagem; fórmulas nas marginais devem ser multiplicadas por 100.

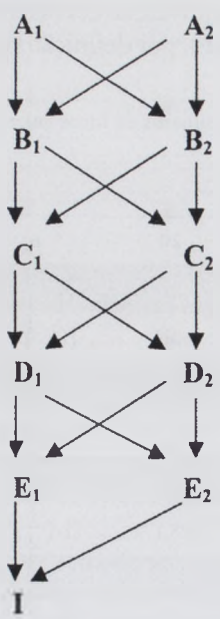
Indivíduos	Geração de autofecundação	F % homozigose
A	0	0
B	1	$\left(\frac{1}{2}\right)^1(1+F_A)=1-\left(\frac{1}{2}\right)^1=\frac{1}{2}$
C	2	$\left(\frac{1}{2}\right)^2(1+F_B)=1-\left(\frac{1}{2}\right)^2=\frac{3}{4}$
D	3	$\left(\frac{1}{2}\right)^3(1+F_C)=1-\left(\frac{1}{2}\right)^3=\frac{7}{8}$
⋮	⋮	⋮
	n	$\left(\frac{1}{2}\right)^1(1+F_{n-1})=1-\left(\frac{1}{2}\right)^n$

FIGURA 8. Coeficientes de endogamia em gerações sucessivas de autofecundação.

Se a planta original já for endogâmica, então $F_n = 1 - (\frac{1}{2})^n [1-F_A]$

3.2 CRUZAMENTOS SUCESSIVOS ENTRE IRMÃOS GERMANOS

Depois da autofecundação, este é o sistema que leva mais rapidamente à homozigose. Pode ser aplicado em animais, nos quais não é possível a autofecundação. O esquema de cruzamento entre irmãos germanos é mostrado na Figura 9.



Pais ..... F = 0

Irmãos germanos..... F = 0

$$F_1=\left(\frac{1}{2}\right)^3+\left(\frac{1}{2}\right)^3=\frac{1}{8}+\frac{1}{8}=\frac{1}{4}=0{,}25$$

$$F_2=4\left(\frac{1}{2}\right)^5+2\left(\frac{1}{2}\right)^3=\frac{3}{8}=0{,}375$$

⋮

$$F_t=\frac{1}{4}[1+2F_{t-1}+F_{t-2}]$$

FIGURA 9. Coeficientes de endogamia em gerações sucessivas de cruzamento entre irmãos germanos.

A equação de F para cruzamento entre irmãos germanos também pode ser representada como segue:

Geração	Código (t)
A	0
B	1
C	2
D	3
E	4
F	5

$$F_t = \sum_{k=2}^{t} \frac{1}{2^k} (1+F_{t+k}) \qquad k = 2,3,\ldots, t$$

3.3 CRUZAMENTOS SUCESSIVOS ENTRE MEIOS-IRMÃOS

Trata-se de um sistema pouco utilizado na prática, mas viável teoricamente. O esquema de cruzamentos entre meios-irmãos é mostrado na Figura 10.

A fórmula geral para endogamia gerada por cruzamentos entre meios irmãos é:

$$F_t = \frac{1}{8}[1 + 6F_{t-1} + F_{t-2}]$$

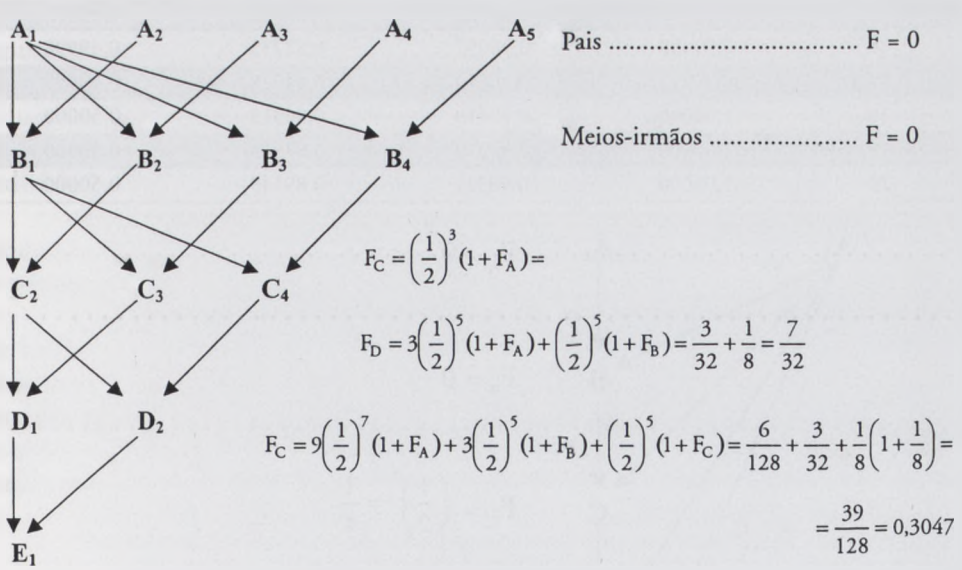


FIGURA 10. Coeficientes de endogamia em gerações sucessivas de cruzamento entre meios-irmãos.

3.4 RETROCRUZAMENTOS SUCESSIVOS

Sucessivos retrocruzamentos também conduzem à homozigose (ver Figura 11).

A fórmula geral para o coeficiente de endogamia em retrocruzamentos sucessivos é:

$$F_t = \frac{1}{4}(1 + 2F_{t-1}) = \frac{2^k - 1}{2^{k+1}}$$

Para os quatro sistemas regulares de endogamia até agora vistos, os coeficientes de endogamia para as gerações subseqüentes são dados na Tabela 2.

TABELA 2.Coeficientes de endogamia em gerações subsequentes sob quatro sistemas de endogamia.

Geração	Autofecundação	Irmãos germanos	Meios-irmãos	Retrocruzamento
1	0,50000	0,00000	0,00000	0,00000
2	0,75000	0,25000	0,12500	0,25000
3	0,87500	0,37500	0,21875	0,37500
4	0,93750	0,50000	0,30469	0,43750
5	0,96875	0,59375	0,38086	0,46875
6	0,98438	0,67188	0,44873	0,48438
7	0,99219	0,73438	0,50916	0,49219
8	0,99609	0,78516	0,56296	0,49609
9	0,99805	0,82617	0,61086	0,49805
10	0,99902	0,85938	0,65352	0,49902
11	0,99951	0,88623	0,69150	0,49951
12	0,99976	0,90796	0,72531	0,49976
13	0,99988	0,92554	0,75542	0,49988
14	0,99994	0,93976	0,78223	0,49994
15	0,99997	0,95126	0,80610	0,49997
16	0,99998	0,96057	0,82735	0,49998
17	0,99999	0,96810	0,84628	0,49999
18	1,00000	0,97419	0,86313	0,50000
19	1,00000	0,97912	0,87813	0,50000
20	1,00000	0,98311	0,89149	0,50000

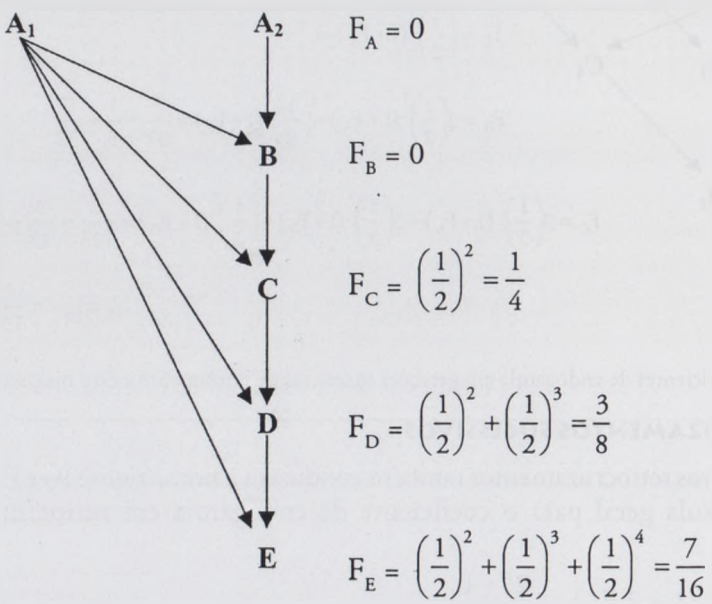


FIGURA 11. Coeficientes de endogamia em gerações sucessivas de retrocruzamento.

É importante ressaltar que o coeficiente de endogamia é calculado a partir de uma determinada geração onde se considera ausência de endogamia (F=0). Deste modo, a geração ou população de referência deve ser estabelecida para cálculos de coeficientes de endogamia. Por exemplo, a geração F_2 do cruzamento de duas linhagens pode ser considerada endogâmica (F=0,5) em relação à geração F_1; mas não endogâmica (F=0) em relação a ela mesma, sendo ela própria a população de referência onde as freqüências dos homozigotos obedecem as relações do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4. IMPORTÂNCIA E CONSEQÜÊNCIAS DA ENDOGAMIA

Como já exposto, o coeficiente de endogamia indica a probabilidade de um indivíduo ser homozigoto por descendência; portanto, equivale à probabilidade mínima de ele ser simplesmente homozigoto. Assim, considerando apenas um loco e toda a população, F indica a proporção esperada de indivíduos (plantas ou animais) homozigóticos naquele loco. Por exemplo, em uma geração F_2, sob autofecundação F=0,5, indicando que existe 50% de probabilidade de um indivíduo ser homozigótico para o loco em questão; ou, espera-se, em média que 50% dos indivíduos sejam homozigóticos. Ao mesmo tempo, F também indica a proporção de homozigose esperada no indivíduo. Por exemplo, um reprodutor com F = 0,20 significa que entre todos os seus genes, espera-se que 20% estejam em homozigose. Um outro reprodutor com valor fenotípico semelhante e com F = 0,80 seria preferível ao primeiro porque, sendo mais homozigótico, teria uma progênie mais uniforme. Esta situação é ilustrada na Tabela 3, comparando-se a progênie de um reprodutor para um gene favorável em homozigose e em heterozigose, quando em cruzamento com fêmeas individuais ou em cruzamento ao acaso com a população.

A ilustração na Tabela 3 serve para mostrar que a descendência de um reprodutor é mais heterogênea para os locos em heterozigose e daí a razão de esperar-se progênie mais uniforme nos reprodutores com maior coeficiente de endogamia.

Já foi mencionado que a endogamia pode ser utilizada para o desenvolvimento de linhas puras (homozigóticas) para fins de desenvolvimento de híbridos. A endogamia por si não promove nenhum melhoramento, mas simplesmente causa uma reorganização na população, permitindo o aparecimento dos tipos homozigóticos os quais podem ser mais ou menos desejáveis; a seleção deve ser aplicada para fins de melhoramento. Exemplo com dois locos:

AaBb ⇒ autofecundações sucessivas ⇒ AABB : AAbb : aaBB : aabb

TABELA 3. Proporção genotípica na progênie de um reprodutor macho para o caso de um gene favorável dominante em homozigose (*AA*) e em heterozigose (*Aa*), em cruzamento com fêmeas individuais ou cruzamento ao acaso com a população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo do macho	Genótipo na fêmea			Proporção gamética na população	
	AA	*Aa*	*aa*	p(*A*)	q(*a*)
AA	*AA*	*AA+Aa*	*Aa*	p (*AA*)	q (*Aa*)
Aa	*AA+Aa*	*AA+Aa+aa*	*Aa+aa*	p (*AA*) + p(*Aa*)	q (*Aa*) + q(*aa*)

Observa-se que, por autofecundação, são geradas diferentes linhas puras. A endogamia também pode ser utilizada como teste de progênie nos esquemas de melhoramento. Em plantas, podem ser utilizadas progênies endogâmicas (S_1 , S_2, ...) nos esquemas de seleção recorrente. Em animais, pode-se provocar a endogamia para fins de detecção de genes indesejáveis nos reprodutores. Por exemplo, um gene recessivo letal (*a*) pode ocorrer com freqüência muito baixa e o seu aparecimento em homozigose na população também será raro. Deste modo, um reprodutor heterozigoto (*Aa*) dificilmente revelará que é portador do gene letal em cruzamentos ao acaso na população. Porém, em cruzamento com suas próprias filhas, aumenta a chance de aparecimento do homozigoto letal.

Pai	Fêmeas	Filhas	Netas (Pai x Filhas)
Aa	*AA*	*AA*	*AA+ AA+Aa+Aa*
	AA	*AA*	*AA+ AA+Aa+Aa*
	AA	*Aa*	*AA+Aa+ Aa +aa*
	AA	*AA*	*AA+ AA+Aa+Aa*
	AA	*Aa*	*AA+Aa+ Aa +aa*
	AA	*Aa*	*AA+Aa+ Aa +aa*

Neste esquema, aparecem $\frac{1}{8}$ ou 3 letais (aa) em 24 descendentes.

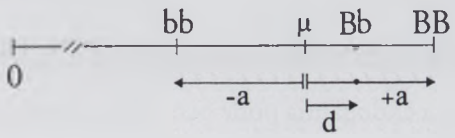
5. DEPRESSÃO POR ENDOGAMIA

O fenômeno conhecido como **depressão por endogamia** ocorre universalmente nos reinos animal e vegetal. A depressão propriamente dita é uma diminuição na expressão de caracteres quantitativos, em decorrência do aumento de homozigose causado pela endogamia.

Já foi comentado que existem genes recessivos deletérios que, em homozigose, causam forte redução na expressão de caracteres. Alguns genes recessivos podem ter efeitos ainda mais drásticos, como são os genes letais e os subletais que causam a morte do indivíduo. Os primeiros estudos sobre endogamia admitiam que a depressão era causada por aqueles genes deletérios que, individualmente, causam grande efeito no fenótipo. Mais tarde, foi reconhecido que a depressão também é causada pela homozigose de genes recessivos de efeitos pequenos e quantitativos e que não são reconhecidos visualmente por seus efeitos individuais, mas sim pelo resultado conjunto. Assim sendo, a ocorrência da depressão não necessariamente significa a presença de genes deletérios de efeitos fortes, embora a sua presença sempre contribua para reforçar a depressão. O exemplo a seguir ilustra a presença de depressão em gerações sucessivas de autofecundação.

Genótipos	Valor genotípico	Freqüências genotípicas S_0	S_1	S_2	...	S_∞	
BB	10	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{8}$	$\frac{7}{16}$	➡	$\frac{1}{2}$	Freqüência dos heterozigotos tende a zero
Bb	10	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	➡	0	
bb	2	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{8}$	$\frac{7}{16}$	➡	$\frac{1}{2}$	
	Média:	8,0	7,0	6,5		6,0	
		➡ ➡ ➡ ➡ DEPRESSÃO ➡ ➡ ➡ ➡					

A depressão por endogamia também pode ser melhor compreendida segundo um modelo biométrico, como o seguinte:



No modelo considera-se um loco com os seus efeitos de homozigotos e do heterozigoto; μ equivale à média dos dois homozigotos (**bb** e **BB**); **a** é a metade da diferença dos dois homozigotos; d é um desvio do heterozigoto em relação à média e mede o efeito de dominância. Sob ausência de dominância d = 0 e os efeitos genéticos são estritamente do tipo aditivo. O efeito de dominância pode se manifestar em diversos níveis: dominância parcial (0 <d <a), dominância completa (d = a) ou sobredominância (d > a).

Para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a média populacional referente a um loco é: $m_o = \mu + (p-q)a + 2pqd$, sendo p e q as freqüências dos alelos **B** e **b**, respectivamente. A quantidade (p–q)a é a contribuição líquida dos homozigotos como desvios da média (m) e a quantidade 2pqd representa a contribuição dos heterozigotos. A representação para um caráter quantitativo controlado por muitos genes fica:

$$m_o^* = \mu^* + a^* + d^*$$

sendo μ^* um referencial para a média dos homozigotos de todos os locos; $a^* = \sum_i (p_i - q_i)\, a_i$ e $d^* = 2 \sum_i p_i q_i d_i$; o índice refere-se ao loco i. Sob endogamia, a contribuição dos heterozigotos diminui na proporção de F (coeficiente de endogamia) e a média da população endogâmica é representada por

$$m_s^* = \mu^* + a^* + (1\text{-}F)d^*$$

de tal maneira que para F=1 (população totalmente homozigótica) a contribuição dos heterozigotos é nula e, portanto, d* representa a total depressão por endogamia. Para F = 1, $m_\infty^* = \mu^* + a^*$, representa a média esperada de uma amostra aleatória de linhagens totalmente homozigóticas extraídas da população.

Com uma geração de autofecundação, a média populacional para $F = \frac{1}{2}$ é

$$m_1^* = \mu^* + a^* + \frac{1}{2}\, d^* .$$

Assim, dispondo-se das médias da população não endógama (m_o^*) e da população com uma geração de autofecundação (m_1^*), podem ser estimadas as quantidades

$$\mu^* + a^* = 2\, m_1^* - m_o^* \qquad \text{e} \qquad d^* = 2\,(m_o^* - m_1^*)$$

Estas quantidades podem ser estimadas para qualquer nível de endogamia, ou seja:

$$\mu^* + a^* = -[\, m_s^* - (1-F)\, m_o^* \,] \qquad e \qquad d^* = -(\, m_o^* - m_s^* \,)$$

6. ENDOGAMIA DEVIDA AO TAMANHO DE POPULAÇÕES

Nas populações, a endogamia pode ocorrer em conseqüência de duas causas:

a) população não 100% panmítica, mas sob uma certa taxa de autofecundação natural;
b) tamanho reduzido de população conduz à endogamia como conseqüência da deriva genética.

A estrutura de populações, segundo o princípio de Hardy-Weinberg, pode ser delineada como mostra a Tabela 4.

Nas populações naturais existe uma relação direta do coeficiente de endogamia (F) com a taxa de cruzamento. Assim, sendo w a taxa de endogamia (autofecundação), tem-se:

$$F = \frac{w}{2 - w}$$

Por exemplo, para 50% de autofecundação natural, tem-se F = 0,5/(2-0,5)= 0,33; ou seja, a população entra em equilíbrio com 33% de homozigose.

Quando se reduz o tamanho da população de uma para outra geração, perde-se a representatividade da população original, porque as freqüências gênicas não representam convenientemente as freqüências originais por uma mera deficiência de amostragem (ver Figura 12).

Nota-se que as freqüências gênicas variam nas subpopulações e a este fenômeno se chama **deriva genética** e é conseqüência da redução do tamanho nas subpopulações. É claro que se as subpopulações tivessem tamanho suficientemente grande, as freqüências gênicas seriam quase iguais às da população original e daí não haveria deriva. A deriva se quantifica pela variância da freqüência gênica (σ_p^2) que mede a dispersão da freqüência gênica em torno da freqüência original. Como a freqüência gênica segue a distribuição binomial, tem-se

$\sigma_p^2 = \frac{p(1-p)}{n}$, sendo n o tamanho da amostra; para n suficientemente grande, tem-se $\sigma_p^2 \approx 0$.

TABELA 4. Estrutura genética de uma população para um loco com dois alelos (B,b) sob diferentes situações de endogamia.

	Freqüências genotípicas		
Genótipos	Não endógama	Parcialmente endógama	100% endógama
BB	p^2	$p^2 + Fpq$	$p^2 + pq = p$
Bb	2pq	2pq - 2Fpq	---
bb	q^2	$q^2 + Fpq$	$q^2 + pq = q$

Nos três casos a população pode permanecer em equilíbrio nas respectivas freqüências

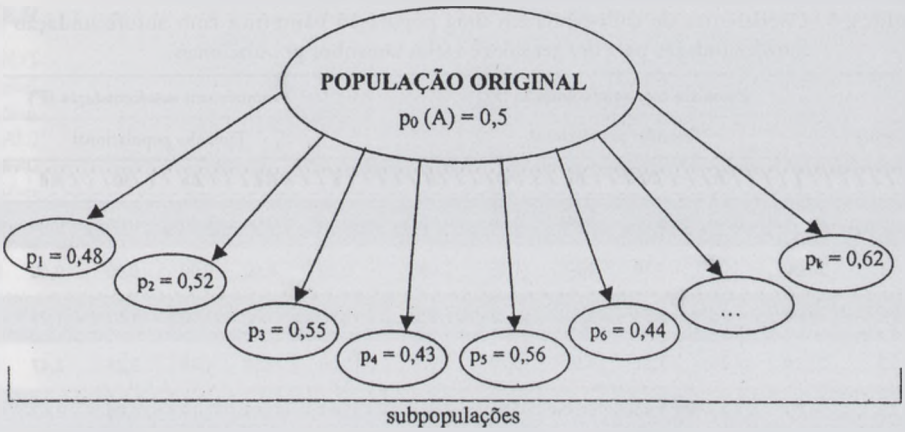


FIGURA 12. Representação esquemática da oscilação da freqüência gênica (números hipotéticos) entre subpopulações derivadas de uma mesma população.

7. TAMANHO EFETIVO POPULACIONAL

Quando se reestrutura uma população totalmente panmítica em subpopulações de tamanho N, duas conseqüências são inevitáveis: a **deriva genética**, caracterizada pela variação da freqüência gênica entre as subpopulações; e a **endogamia**, caracterizada pelo aumento na freqüência dos homozigotos, em média nas subpopulações, em relação à população original. O aumento na freqüência dos homozigotos, em conseqüência da redução do tamanho populacional, é medido pelo coeficiente de endogamia (F), o qual tem relação direta com o tamanho nas subpopulações, ou seja, $F = \frac{1}{2N}$. Por exemplo, tomando-se uma amostra aleatória de subpopulações de tamanho N=5, espera-se, em média, um aumento de homozigose equivalente a F= 0,10.

Se o tamanho reduzido nas subpopulações permanecer durante várias gerações, a endogamia é cumulativa, ou seja a freqüência de homozigotos aumenta continuamente segundo a relação

$$F_t = \frac{1}{2N} + [1 - \frac{1}{2N}]F_{t-1}$$, sendo t a geração sob consideração.

Tais situações são válidas somente para um sistema de reprodução totalmente penmítico, onde uma certa taxa de autofecundação é esperada. Nos esquemas de seleção recorrente, emprega-se a recombinação dos indivíduos selecionados através de intercruzamento. No caso de indivíduos monóicos são possíveis N(N-1) combinações entre os N indivíduos, evitando-se a autofecundação. O coeficiente de endogamia sob intercruzamento sem autofecundação é (Li, 976):

$$F_{t+1} = \frac{1}{2N} [1 + 2 (N-1) F_t + F_{t-1}]$$

Os valores do coeficiente de endogamia, F e F', para populações panmíticas com e sem autofecundação, respectivamente, são mostrados na Tabela 5 para dez gerações para vários tamanhos populacionais.

TABELA 5. Coeficientes de endogamia em uma população panmítica com autofecundação e sem autofecundação para dez gerações e vários tamanhos populacionais.

Gerações	Panmixia com autofecundação (F)						Panmixia sem autofecundação (F')					
	Tamanho populacional						Tamanho populacional					
	5	10	20	30	40	50	5	10	20	30	40	50
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	10,00	5,00	2,50	1,67	1,25	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	19,00	9,75	4,94	3,31	2,48	1,99	10,00	5,00	2,50	1,67	1,25	1,00
3	27,10	14,26	7,31	4,92	3,70	2,97	18,00	9,50	4,88	3,28	2,47	1,98
4	34,39	18,55	9,63	6,50	4,91	3,94	25,40	13,80	7,19	4,86	3,67	2,95
5	40,95	22,62	11,89	8,06	6,10	4,90	32,12	17,90	9,46	6,42	4,86	3,91
6	46,86	26,49	14,09	9,59	7,27	5,85	38,24	21,80	11,66	7,96	6,04	4,86
7	52,17	30,17	16,24	11,10	8,43	6,79	43,80	25,51	13,82	9,46	7,20	5,80
8	56,95	33,66	18,33	12,58	9,57	7,73	48,86	29,05	15,92	10,95	8,34	6,74
9	61,26	36,98	20,38	14,04	10,70	8,65	53,47	32,42	17,97	12,41	9,47	7,66
10	65,13	40,13	22,37	15,47	11,82	9,56	57,66	35,63	19,97	13,84	10,59	8,57

F e F': expressos em porcentagem.

Uma população sob completa panmixia, como uma população de milho em que os gametas femininos nas espigas se unem ao acaso com gametas masculinos de uma nuvem de pólen produzida por toda a população, é denominada de população **idealizada**, e tem o propósito de servir como referência nos casos em que os cruzamentos não são totalmente ao acaso. Por exemplo, considere-se uma população com 50 plantas, das quais 40 são tomadas como fêmeas e 10 como machos. A descendência deste cruzamento não será a mesma, ou não terá a mesma representatividade, em comparação com a situação de cruzamento totalmente ao acaso (panmixia) das 50 plantas. Sob completa panmixia, um conjunto de subpopulações de tamanho N=50 resultaria em uma certa variância da freqüência gênica (σ_p^2) e em um certo grau médio de endogamia ($F = \frac{1}{100} = 0,01$). No esquema de cruzamento tomado como exemplo, repetido inúmeras vezes, produziria um conjunto de subpopulações onde σ_p^2 e F não são os mesmos em relação à completa panmixia. Assim, o **tamanho efetivo populacional** é definido como o número de indivíduos que, em sistema de completa panmixia, resultaria nos mesmos valores de σ_p^2 e F que o sistema de cruzamento em consideração. No exemplo, cruzando-se 10 machos x 40 fêmeas, resultaria em σ_p^2 e F do mesmo valor de 32 indivíduos sob completa panmixia. Diz-se então que o tamanho efetivo resultante daquele cruzamento é $N_e = 32$.

Nas relações entre tamanho populacional e endogamia, deve-se utilizar o tamanho efetivo (N_e) em vez do número real (N) de indivíduos sempre que o sistema de cruzamento não for panmixia completa.

LITERATURA CONSULTADA

ELANDT-JOHNSON, R. **Probability models and statistical methods in genetics**. New York: John Wiley & Sons, 1971. 592p.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1995. 468p.

LI, C.C. **Population genetics**. Pacific Grove: The Boxwood Press, 1976. 631p.

MIRANDA FILHO, J.B. Inbreeding depression and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (Ed.) **Genetic and exploitation of heterosis in crops**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p.69-80.

21

CRUZAMENTOS COM TESTADORES E DIALELOS

JOSÉ B. MIRANDA FILHO[1]
ELIANA PATRÍCIA GORGULHO[2]

[1]Depto. Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP 13400-970 - Piracicaba, SP.
[2]Pós-Doutoranda do Depto. Genética - USP/ESALQ.

1. INTRODUÇÃO

Não há dúvida que entre as espécies vegetais, o milho (*Zea mays* L.) foi o que mais contribuiu para o conhecimento dos princípios fundamentais e para o desenvolvimento de modelos genéticos envolvendo os diversos tipos de cruzamentos. Segundo Hallauer & Miranda Filho (1995) os primeiros relatos sobre hibridação em plantas datam do final do século XVIII, mas os primeiros experimentos comparando plantas de milho autofecundadas e cruzadas foram desenvolvidos por Darwin na segunda metade do século XIX. Beal (1880) conduziu experimentos de hibridação em milho com vistas à utilização da semente híbrida em larga escala.

Shull (1908, 1909, 1910) estabeleceu, com base em resultados experimentais, os princípios fundamentais para o desenvolvimento de híbridos a partir de linhagens endogâmicas obtidas por autofecundação. Os modernos métodos de melhoramento de milho ainda se baseiam nos princípios de Shull. Entretanto, a utilização de híbridos simples (HS: linhagem x linhagem) não ofereceu perspectiva de utilização da semente híbrida, devido ao alto custo de produção (Hallauer, 1990). Jones (1918) sugeriu o uso de híbridos duplos (HS x HS), que eliminou o problema de produção da semente híbrida. Em seguida, iniciaram-se os programas de melhoramento de milho para o desenvolvimento de linhagens e produção de híbridos duplos, sendo os primeiros híbridos avaliados por volta de 1930 (Hallauer, 1990).

O trabalho de desenvolvimento de linhagens endogâmicas para utilização em híbridos não se apresenta como grande dificuldade nos programas de melhoramento. Como a utilização final da linhagem é em combinação híbrida, a sua avaliação em cruzamentos se torna necessária. Inicialmente, avaliaram-se linhagens elites em todas as combinações possíveis tendo em vista a identificação dos híbridos mais promissores. Entretanto, com o aumento da dimensão dos programas de melhoramento, buscaram-se alternativas para facilitar os testes de avaliação do valor genético das linhagens (Hallauer, 1990). Paralelamente à concepção e utilização do milho híbrido, desenvolveram-se metodologias para a avaliação do valor genético de linhagens ou genótipos. Neste contexto, dois sistemas de cruzamento sobressaíram no que diz respeito à sua importância e abrangência de sua utilização: a) cruzamento *topcross*; b) cruzamento dialélico. Outros tipos de cruzamento podem ser mencionados:

- cruzamento na mesma geração: cruzamento fraternal ou entre irmãos, cruzamento entre primos, cruzamentos biparentais etc.
- cruzamento entre diferentes gerações: retrocruzamentos do tipo pais x filhos ou avós x netos, tios x sobrinhos.

Porém, na seqüência desta apresentação somente serão abordados os dois esquemas de cruzamento mais utilizados, quais sejam, *topcross* e dialelo.

2. CRUZAMENTO TOPCROSS

Davis (1927) e Jenkins & Brunson (1932) introduziram o uso do esquema *topcross* para a avaliação do valor genético de linhagens em cruzamentos. Segundo este esquema, todas as linhagens (genótipos) de um determinado conjunto (fixo ou aleatório) são cruzadas com um mesmo testador e o seu valor genético é determinado com base em contrastes de médias (média do respectivo *topcross* – média geral) de caracteres quantitativos. Jenkins (1934) propôs métodos de predição de médias de híbridos duplos numa tentativa de reduzir o número de híbridos efetivamente avaliados em experimentos. Concluiu que o método com base na média dos híbridos simples não parentais em um conjunto de seis híbridos envolvendo quatro linhagens, foi o mais eficiente. Jenkins (1935) e Sprague (1946) sugeriram o uso de teste precoce, segundo o qual as linhagens são avaliadas nas primeiras gerações de endogamia, contribuindo para agilizar o esquema de desenvolvimento de linhagens. Todas estas sugestões foram muito úteis, mas o uso do esquema *topcross* tornou-se um processo padrão nos programas de melhoramento (Hallauer, 1990).

O uso do esquema *topcross* para a avaliação da capacidade de combinação de linhagens (genótipos) em cruzamento expandiu-se rapidamente e, atualmente, é amplamente utilizado nos esquemas de melhoramento.

2.1 ESCOLHA DO TESTADOR

Alguma controvérsia no uso do esquema *topcross* refere-se à escolha do testador, pois um determinado material pode ser um bom testador em uma circunstância mas não em outra. Neste aspecto, algumas variações são consideradas, tais como a base genética do testador (ampla *vs.* estreita), o grau de parentesco com o material a ser avaliado (aparentado *vs.* não aparentado), valor genético intrínseco (padrão elevado *vs.* padrão regular ou inferior). Ao longo do tempo, formulações teóricas e resultados experimentais serviram para esclarecer alguns pontos importantes sobre o uso de testadores (Hallauer & Miranda Filho, 1995).

Muitas vezes a escolha de um testador se dá de maneira totalmente empírica, com base na experiência e intuição do pesquisador. Os produtores de sementes utilizam naturalmente uma linhagem elite ou um híbrido simples conhecido como testador de novas linhagens, com vistas à identificação de combinações superiores para uso comercial. Há casos em que a existência de um híbrido simples ou uma linhagem, com características adequadas para utilização como fêmea nos cruzamentos, força a sua utilização como testador. De certa forma, o progresso no programa fica restrito ao desenvolvimento de linhagens ou híbridos a serem utilizados como machos (Miranda Filho, 1985; Hallauer, 1990). O uso de vários testadores simultaneamente pode melhorar a precisão da avaliação do potencial genético da linhagem mas, mesmo assim, persiste a dúvida sobre o grau de mascaramento do valor genético por se tratar de testadores de elevado padrão.

Há também situações em que o testador adequado para linhagens ou genótipos de uma população é naturalmente determinado, como nos casos em que se dispõe de um par heterótico conhecido (ex. populações BR 105 e BR 106 em milho) ou nos casos de seleção recorrente recíproca em que cada população é naturalmente o testador dos genótipos da população contrastante.

TABELA 1. Média e variância entre híbridos *topcross* com dois testadores hipotéticos a partir de uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg para um loco com freqüência alélica p=0,5.

Genótipo	Freqüência	Dominância completa			Sem dominância		
		Valor[v] genotípico	Média no híbrido		Valor[v] genotípico	Média no híbrido	
			Test BB	Test bb		Test BB	Test bb
BB	$\frac{1}{4}$	4	4	4	4	4	4
Bb	$\frac{1}{4}$	4	4	3	3	$\frac{7}{2}$	$\frac{5}{2}$
Bb	$\frac{1}{4}$	4	4	3	3	$\frac{7}{2}$	$\frac{5}{2}$
bb	$\frac{1}{4}$	2	4	2	2	3	2
	Média:	$\frac{7}{2}$	4	3	3	$\frac{7}{2}$	$\frac{5}{2}$
	Variância:	$\frac{3}{4}$	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$

Valores do modelo: $\mu_0 = 3$; $a = d = 1$ com dominância completa; $a = 1$ e $d = 0$ sem dominância.
[v]Médias e variâncias referem-se à população base. [Adaptado de Hallauer & Miranda Filho, 1995].

Hull (1945) fez considerações teóricas sobre o valor relativo de testadores com constituições genéticas diferentes. Em resumo, a formulação de Hull leva à conclusão que um testador com maior freqüência de alelos recessivos conduz a uma menor média e maior variância entre os híbridos (Tabela 1). Assim sendo, se os alelos recessivos são em grande parte indesejáveis na expressão de caracteres quantitativos (Fisher, 1965), um testador com valor genético mais baixo seria mais eficiente, no sentido de melhor poder de discriminação entre os genótipos da população. Neste sentido, o uso de testadores elite como nos programas de híbrido comercial, pode levar à identificação de pares de linhagens com elevado grau de complementação genética mas não necessariamente à avaliação do potencial genético intrínseco da linhagem. Quando mais de um testador é utilizado, a interação linhagem x testator tem mostrado significância na maioria dos casos (Matzinger, 1953; Hallauer & Lopes Peres, 1979; Aguilar Morán, 1990).

2.2 VARIÂNCIA ENTRE FAMÍLIAS OU TESTCROSSES

Rawlings & Thompson (1962) acrescentaram importantes contribuições ao estudo de testadores em um estudo com dois grupos de linhagens de milho, supondo cada grupo como testador do grupo contrastante. Os aspectos teóricos, utilizados como base para explicar os resultados, representam basicamente uma extensão da hipótese de Hull (1945). Assim, para um único loco, a variância entre híbridos *topcross* é representada por

$$\sigma_t^2 = \frac{1}{2} p(1 - p)(1 + F)[a + (1 - 2r)d]^2$$

sendo p e F a freqüência alélica e o coeficiente de endogamia na população base; r é a freqüência alélica no testador; a e d representam desvios do homozigoto favorável e do heterozigoto, respectivamente, em torno da média dos homozigotos (μ_0 : ver Tabela 1). Ao referir-se à variância genética entre indivíduos ou entre famílias, é conveniente explicitar que se trata de uma amostra aleatória representativa de uma população de referência. No esquema *topcross*, pressupõe-se uma amostra aleatória de genótipos cruzada com um testador definido.

Uma análise da fórmula da variância leva a algumas conclusões evidentes: em uma dada população com valores fixos de p, F e *a*, a variância entre híbridos *topcrosses* (σ_t^2) depende da freqüência alélica no testador; na ausência de dominância, σ_t^2 é constante para qualquer freqüência alélica no testador, ou seja, $\sigma_t^2 = \frac{1}{2} p(1-p)(1-F)a^2$; para qualquer nível de dominância positiva ($d > 0$), σ_t^2 será sempre maior para r = 0 (Hallauer & Miranda Filho, 1995). Estas relações podem ser visualizadas na Figura 1.

Com base nas considerações apresentadas, e levando-se em conta que a produção de grãos em milho está sob o controle de ação gênica dominante ou parcialmente dominante (Hallauer & Miranda Filho, 1995), a indicação de um testador com baixo valor genético seria apropriada. Entretanto, Hallauer (1975) definiu como um bom testador aquele que inclui: a) simplicidade no uso; b) informação que corretamente classifique o mérito relativo das linhagens; c) potencial para maximização do ganho genético.

Na seleção recorrente recíproca, que se baseia em famílias de cruzamentos entre duas populações, sendo cada uma o testador natural da população contrastante, a variância entre famílias ou *testcrosses* (σ_t^2) deve ser definida para cada uma das populações base. Assim, na população [1] como base e [2] como testador tem-se $\sigma_t^2 = \sigma_{A12}^2 = 2p(1-p)\,\alpha_2^2$; invertendo-se a população base e o testador, tem-se $\sigma_t^2 = \sigma_{A21}^2 = 2r(1-r)\,\alpha_1^2$. As variâncias σ_{A12}^2 e σ_{A21}^2 são chamadas de homólogos da variância aditiva (Compton *et al.*, 1965) e a sua média $\frac{1}{2}(\sigma_{A12}^2 + \sigma_{A21}^2) = \sigma_{A12}^2$ é a variância aditiva que se expressa no híbrido interpopulacional (Compton *et al.*, 1965; Miranda Filho, 1982; Miranda Filho & Paterniani, 1983).

Miranda Filho & Vencovsky (2001) mostraram que quando o testador é uma linha pura (completamente homozigótica), a variância que se expressa entre famílias *testcrosses* é $\sigma_t^2 = \frac{1}{4}\sigma_{A12}^2$, $\sigma_t^2 = \frac{1}{2}\sigma_{A12}^2$, ou $\sigma_t^2 = \frac{1}{4}(1+F_A)\sigma_{A12}^2$, dependendo se a população base é não endógama (F=0), totalmente endógama (F=1) ou parcialmente endógama ($0<F_A<1$), respectivamente.

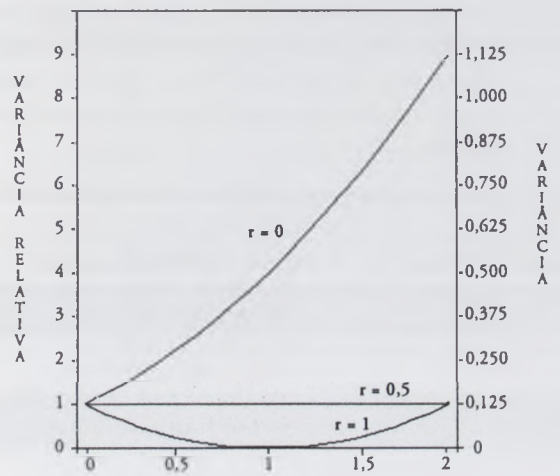


FIGURA 1. Variância entre *testcrosses* de uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg com freqüência alélica p = 0,5 na população e r=0, r=0,5 e r=1 no testador em diversos graus de dominância. [Desvio de homozigose: *a* = 1]. [Adaptado de Rawlings & Thompson (1962) e Hallauer (1975)].

2.3 ALTERAÇÃO NA FREQÜÊNCIA ALÉLICA E GANHO ESPERADO POR SELEÇÃO

Comstock (1964) analisou teoricamente as conseqüências da seleção entre *topcrosses* em relação à alteração na freqüência de alelos favoráveis na população. Neste esquema, têm-se as médias de *topcrosses* individuais como unidade de seleção e sementes S_1, obtidas por autofecundação da planta-mãe, como unidade de recombinação. Tomando-se $\alpha_1 = [a + (1-2p)\,d]$ como o efeito médio de substituição gênica na população base (Falconer, 1960), a alteração na freqüência alélica será função de α_1 se a própria população for usada como testador, e função de $\alpha_2 = [a + (1-2r)\,d] = \alpha_1 + 2\,(p-r)d$ se o testador for não relacionado à população base. Nota-se que o uso de um testador não relacionado terá vantagem quando a freqüência alélica no testador for menor do que na população base. Esta assertiva também corrobora a hipótese inicial de Hull (1945).

Hallauer & Lopes-Peres (1979) avaliaram 50 linhagens selecionadas e 50 linhagens não selecionadas em diferentes níveis de endogamia (S_1 e S_8) em cruzamento com cinco testadores (relacionados e não relacionados). As medidas de variabilidade relativa entre *testcrosses* foram similares às preditas pelas formulações de Rawlings & Thompson (1962) e Comstock (1964).

A alteração na freqüência alélica como resultado da seleção entre *testcrosses* (Comstock, 1964) afeta diretamente o ganho por seleção. Allison & Curnow (1966) desenvolveram formulações apropriadas para expressar o ganho por seleção entre *testcrosses*:

$$G_S = \frac{k}{2\sigma_{\bar{T}}} \left[\sigma^2_A - 4p\,(1-p)\,\alpha_1\,(r-p)d \right]$$

sendo k a proporção de genótipos selecionados, $\sigma_{\bar{T}}$ o desvio-padrão fenotípico entre médias de *testcrosses*, σ^2_A a variância genética aditiva na população base, p e r as freqüências alélicas na população base e testador, respectivamente, e α_1 o efeito médio de substituição gênica na população base. Algumas comparações relativas ao ganho esperado por seleção são mostradas na Tabela 2.

Allison & Curnow (1966) enfatizaram que o melhor testador seria uma linhagem homozigota recessiva para os locos importantes ou uma variedade com baixa freqüência alélica para os locos mais importantes. Independentemente da freqüência alélica no testador, a importância de um loco está relacionada à sua contribuição para o fenótipo, isto é, um loco importante seria aquele no qual uma pequena alteração na freqüência alélica resultaria em mudança expressiva no fenótipo. Neste sentido, a recomendação da própria população base como testador teria a vantagem de que os locos que devem ter suas freqüências aumentadas são exatamente os mesmos com freqüência baixa no testador.

TABELA 2. Ganho esperado na população base por seleção de *testcrosses* com diferentes freqüências alélicas no testador ao nível de um loco.

Testador	Freqüência alélica	Ganho esperado por seleção*
Homozigoto dominante	r = 1	$\frac{k}{2\sigma_{\bar{T}}} [\sigma^2_A - 4pq^2\,\alpha_1\,d]$
Homozigoto recessivo	r = 0	$\frac{k}{2\sigma_{\bar{T}}} [\sigma^2_A - 4p^2q\,\alpha_1\,d]$
População	r = p	$\frac{k}{2\sigma_{\bar{T}}} [\sigma^2_A]$

*Adaptado de Allison & Curnow (1966).

2.4 CAPACIDADE DE COMBINAÇÃO NAS FAMÍLIAS TESTCROSSES

A capacidade de combinação que se expressa em *testcrosses* pode se referir a um conjunto fixo ou aleatório de linhagens ou genótipos ou a um conjunto fixo de populações (Hallauer & Miranda Filho, 1995). Em *topcrosses* avaliados em experimento com repetições, o modelo estatístico é:

$$Y_{ij} = m + c_i + r_j + e_{ij}$$

para delineamento em blocos casualizados, sendo m a média geral, c_i o efeito de capacidade de combinação, r_j o efeito de repetições e e_{ij} o erro experimental. O efeito c_i é estimado pelo contraste $c_i = \overline{Y}_{i.} - \overline{Y}_{..} = \overline{T}_i - \overline{T}$, sendo $\overline{Y}_{i.} = \overline{T}_i$ a média do *topcross* do $i^{ésimo}$ genótipo e $\overline{Y}_{..} = \overline{T}$ a média de todos os *topcrosses*.

A expressão "capacidade de combinação" é empregada no sentido generalizado, independente se o testador é relacionado ou não relacionado, de base estreita ou de base ampla, para conjuntos fixos ou aleatórios. Em termos do modelo genético já utilizado anteriormente, tem-se:

$$c_i = (p_i - \overline{p})\,[a + (1-2r)\,d] = (p_i - \overline{p})\,\alpha_2 = (p_i - \overline{p})\,\alpha_t$$

Esta expressão se aplica a conjunto fixo de populações ou a genótipos dentro de conjuntos ou populações. No primeiro caso, p_i e $\overline{p}$ representam a freqüência alélica na população i e a freqüência alélica média de todas as populações do conjunto, respectivamente. Em uma amostra aleatória de genótipos de uma população em equilíbrio p_i assume valores de 0, $\frac{1}{2}$ e 1, nos genótipos bb, Bb e BB, respectivamente; e $\overline{p}$ é substituída por p_i, a freqüência alélica na referida população.

Nestas circunstâncias, a variância entre *testcrosses* ou variância entre os efeitos de capacidade de combinação (σ^2_C) é dada por

$$\sigma^2_C = \sigma^2_p\,[a + (1-2r)\,d]^2 = \sigma^2_p\;\alpha^2_2$$

sendo σ^2_p a variância da freqüência alélica entre as populações do conjunto. Para genótipos dentro de populações a freqüência alélica dentro da população tem distribuição binomial, onde $\sigma^2_p = \frac{1}{2}\,p(1-p)$, de modo que $\sigma^2_C = \frac{1}{2}\,p(1-p)\,[a + (1-2r)\,d]^2 = \frac{1}{2}\,p(1-p)\,\alpha^2_2$, já mostrado anteriormente (Vencovsky & Barriga, 1992; Hallauer & Miranda Filho, 1995).

3. DIALELO

A capacidade de combinação (c_i) de linhagens ou genótipos, avaliados em cruzamento *topcross* com um testador comum, reflete o seu valor genético relativo intrínseco. Deste modo espera-se que linhagens com maiores estimativas de c_i deverão resultar em cruzamentos superiores; esta superioridade, entretanto, é devido ao valor genético de cada uma das linhagens, não sendo possível fazer qualquer inferência sobre a interação dos valores genéticos no híbrido de linhagens. Este tipo de interação só é possível de ser quantificada quando se dispõe de informação sobre híbridos específicos. Quando se realizam todos os cruzamentos possíveis entre um conjunto

de n linhagens, o esquema é denominado de cruzamento dialélico. Sprague & Tatum (1942) utilizaram este esquema de cruzamento para definir os termos *capacidade geral de combinação* (CGC) e *capacidade específica de combinação* (CEC). O termo CGC refere-se ao comportamento médio de cada linhagem em cruzamento com as demais do conjunto. CEC é interpretada como um efeito na expressão do híbrido que é adicional aos efeitos de CGC dos pais, podendo ser positivo ou negativo; em outras palavras, CEC resulta da interação dos efeitos de CGC dos pais e pode melhorar ou piorar a expressão do híbrido em relação ao efeito esperado com base somente nas CGC. Nos diversos esquemas de cruzamento dialélico que foram propostos após o trabalho de Sprague & Tatum (1942), os efeitos CGC e CEC são estimados como desvios em torno da média geral e são simbolizados por g_i (efeito de CGC da linhagem i) e s_{ij} (efeito de CEC no híbrido i x j), respectivamente, no modelo estatístico.

A origem dos procedimentos que definiram a metodologia dos cruzamentos dialélicos é atribuída a Schmidt em 1919, citado por Fyfe & Gilbert (1963). Segundo Vencovsky (1970) o termo cruzamento dialélico também foi utilizado por outros autores na década de 1940 para designar o processo em que n (animais) fêmeas são cruzadas, cada uma, com um grupo de m machos para produzir nm famílias de irmãos germanos. Este esquema foi posteriormente chamado de delineamento de dois fatores ou *two-factor mating design* por Cockerham (1963).

Griffing (1956) chama de sistema de cruzamento dialélico aquele pelo qual um grupo de n linhas puras é escolhido e cruzamentos são feitos entre elas. Este procedimento dá origem a um máximo de n^2 combinações. As combinações são avaliadas em experimentos com repetições e as médias de tratamentos, representando as combinações mencionadas, são utilizadas para formar uma tabela dialélica n x n. As n^2 combinações podem ser divididas em três grupos: os n genitores, um grupo de $\frac{1}{2}\, n(n\text{-}1)$ híbridos (geração F_1) e o grupo de $\frac{1}{2}\, n(n\text{-}1)$ híbridos recíprocos. A partir destes três grupos, Griffing (1956) idealizou quatro possíveis métodos de análise que se diferenciam pelo fato de incluir os genitores ou recíprocos ou ambos: Método 1 – são incluídos os pais, os híbridos F_1 e os híbridos recíprocos, totalizando n^2 combinações; Método 2 – são incluídos somente os pais e os híbridos F_1 totalizando $\frac{1}{2}\, n(n+1)$ combinações; Método 3 – são incluídos somente os híbridos F_1 e os recíprocos, totalizando $n(n\text{-}1)$ combinações; Método 4 – que inclui somente os híbridos F_1, com um total de $\frac{1}{2}\, n(n\text{-}1)$. Todos os métodos podem ser aplicados para conjuntos fixos ou conjuntos aleatórios de linhagens.

Além dos métodos propostos por Griffing (1956), com base nos efeitos de CGC e CEC, outras variações metodológicas foram sugeridas. Kempthorne & Curnow (1961) utilizaram o modelo básico de Griffing (1956) e propuseram o método de cruzamento dialélico parcial, segundo um esquema circulante. Outros estudos e variações sobre o dialelo parcial também foram publicados. O modelo proposto por Gardner & Eberhart (1966) se aplica a um conjunto fixo de variedades e seus híbridos (F_1) e tem por base os efeitos de variedades (v_i) e a heterose nos híbridos ($h_{ii'}$); o efeito de heterose total é subdividido nos componentes: heterose média ($\bar{h}$), representada pela média aritmética das heteroses de todos os híbridos; heterose de variedades (h_v), que expressa o componente da heterose presente em todos os híbridos em que participa

a variedade i; e heterose específica ($s_{ii'}$), representando um componente da heterose que é específico do cruzamento i x i', sendo equivalente à capacidade específica de combinação do Método 4 de Griffing (1956). Eberhart & Gardner (1966) apresentam um modelo mais amplo que pode incluir outros tipos de populações derivadas (F_2, retrocruzamentos, autofecundação) para o estudo da heterose e seus componentes e efeitos epistáticos.

Outras referências sobre as variações do modelo de Griffing (1956) são encontradas em Singh & Chaudary (1979) e Gonçalves (1987). Variações sobre o modelo de Gardner & Eberhart (1966) são encontradas em Miranda Filho (1995), Miranda Filho & Chaves (1996) e Chaves & Miranda Filho (1997). O método de dois fatores foi posteriormente designado de dialelo parcial por Vencovsky & Barriga (1992), referindo-se ao cruzamento entre dois grupos de linhagens ou genótipos, interpretado segundo o modelo de Griffing (1956). O modelo de Gardner & Eberhart (1966) também foi adaptado para a análise de dois conjuntos (grupos) fixos de variedades (Miranda Filho & Geraldi, 1984; Geraldi & Miranda Filho, 1988). O modelo de dialelo parcial circulante de Kempthorne & Curnow (1961) foi adaptado para o nível interpopulacional por Miranda Filho (citado por Gonçalves, 1987), permitindo a análise de cruzamentos entre dois conjuntos distintos de linhagens. A metodologia de análise foi apresentada por Miranda Filho & Vencovsky (1999).

Dentre os diversos modelos de análise de cruzamentos dialélicos e suas variações, alguns são mais apropriados para utilização nos esquemas de melhoramento. Aqui enquadram-se os métodos baseados nos conceitos de CGC e CEC preconizados por Sprague & Tatum (1942) e modelados por Griffing (1956). O método de Gardner & Eberhart (1966) e suas variações são aplicados a conjuntos fixos de variedades ou linhagens e prestam-se mais propriamente para o estudo do valor genético dos genitores e seu potencial heterótico em cruzamentos; não têm sido utilizados na avaliação de linhagens para utilização em híbridos, mesmo quando se trabalha com conjuntos fixos. Por esta razão, neste capítulo serão focalizados somente os esquemas mais usuais e aplicáveis à avaliação de linhagens ou genótipos.

3.1 MÉTODO 4 DE GRIFFING (1956)

Como já mencionado, o Método 4 de Griffing (1956) inclui somente $\frac{1}{2}\, n(n\text{-}1)$ híbridos possíveis a partir de um conjunto (fixo ou aleatório) de linhagens ou genótipos. Diz-se que conjunto é aleatório quando seus elementos constituem uma amostra aleatória de uma população de referência; deste modo, as inferências sobre a amostra estudada são extrapoladas para a população. Sob um modelo aleatório (conjunto aleatório de genótipos ou linhagens), mais ênfase é dada à estimação de parâmetros (variância, covariância, correlação etc.) do que a testes de hipóteses (teste F, por exemplo). Sob um modelo fixo (conjunto fixo de linhagens ou genótipos), a ênfase é para a estimação dos efeitos (componentes de médias) e sobre a sua significância com base em testes de hipóteses. No modelo fixo não se estimam parâmetros do tipo variância ou covariância, porque os elementos do conjunto não representam uma população de referência.

Para um experimento em blocos casualizados, o modelo é:

$$Y_{ii'k} = m + \eta_{ii'} + r_k + e_{ii'k} \qquad [A]$$

sendo m a média geral, $\eta_{ii'}$ o efeito de híbridos, r_k o efeito de repetições e $e_{ii'k}$ o erro experimental referente ao híbrido i x i' na repetição k. As médias de tratamentos sobre K repetições são utilizadas para construir a tabela dialélica, conforme representada na Tabela 3, onde a simbologia $Y_{ii'}$ é utilizada para representar a média de um caráter quantitativo do híbrido i x i'.

No modelo [A] o efeito de híbridos ($\eta_{ii'}$) está representado ao nível de total de tratamentos; na tabela dialélica o efeito $\eta_{ii'}$ deve estar representado ao nível de médias sobre K repetições e é resultante dos efeitos de CGC e CEC, ou seja,

$$\eta_{ii'} = g_i + g_{i'} + s_{ii'}$$

sendo g_i e $g_{i'}$ os efeitos de CGC dos genitores (linhagens) i e i'; e $s_{ii'}$ o efeito de CEC no híbrido i x i'. Assim, a média de um híbrido pode ser representada por:

$$Y_{ii'} = m + g_i + g_{i'} + s_{ii'} + \bar{e}_{ii'} \qquad [B]$$

sendo $\bar{e}_{ii'}$ o erro experimental para médias de tratamentos sobre K repetições.

Para um conjunto fixo de linhagens, o modelo [B] é chamado de modelo fixo pois todos os efeitos do modelo, exceto o erro experimental ($\bar{e}_{ii'}$), são fixos. As estimativas dos efeitos (componentes de médias) são obtidas pelo método dos quadrados mínimos, por minimização da soma de quadrados dos desvios do modelo ($\bar{e}_{ii'}$). Na equação matricial $Y = X\beta + \varepsilon$ tem-se: Y representa o vetor de médias de híbridos ($Y_{ii'}$), X é a matriz dos coeficientes, β é o vetor dos parâmetros do modelo e ε é o vetor representativo do erro associado às médias. Para um dialelo 4x4, tem-se:

$$\begin{array}{cccc} Y & & X & \beta \quad \varepsilon \end{array}$$

$$\begin{vmatrix} Y_{12} \\ Y_{13} \\ Y_{14} \\ Y_{23} \\ Y_{24} \\ Y_{34} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix} \begin{vmatrix} m \\ g_1 \\ g_2 \\ g_3 \\ g_4 \\ s_{12} \\ s_{13} \\ s_{14} \\ s_{23} \\ s_{24} \\ s_{34} \end{vmatrix} \quad \begin{vmatrix} \bar{e}_{12} \\ \bar{e}_{13} \\ \bar{e}_{14} \\ \bar{e}_{23} \\ \bar{e}_{24} \\ \bar{e}_{34} \end{vmatrix}$$

As equações normais que levam às estimativas dos parâmetros são representadas pela equação matricial $X'X\,\hat{\beta} = X'Y$. O sistema de equações normais não tem solução porque a matriz X é singular; portanto há necessidade de impor restrições, que funcionam como equações adicionais que permitem solução: $\sum_i g_i = 0$ e $\sum_{i'} s_{ii'} = 0$ para cada i. A solução que leva diretamente às estimativas dos parâmetros é dada por $\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y$, incluindo as restrições na matriz X. A partir das equações normais é possível deduzir as fórmulas algébricas que representam as estimativas dos parâmetros, como mostradas na Tabela 4.

TABELA 3. Representação da tabela dialélica referente ao Método 4 de Griffing (1956) com n = 5.

Pais	1	2	3	4	5	Total
1	–	Y_{12}	Y_{13}	Y_{14}	Y_{15}	$Y_{1.} = \sum_{i \neq i'} Y_{ii'} = Y_{12} + Y_{13} + Y_{14} + Y_{15}$
2		--	Y_{23}	Y_{24}	Y_{25}	$Y_{2.} = \sum_{i \neq i'} Y_{ii'} = Y_{12} + Y_{23} + Y_{24} + Y_{25}$
3			--	Y_{34}	Y_{35}	$Y_{3.} = \sum_{i \neq i'} Y_{ii'} = Y_{13} + Y_{23} + Y_{34} + Y_{35}$
4				--	Y_{45}	$Y_{4.} = \sum_{i \neq i'} Y_{ii'} = Y_{14} + Y_{24} + Y_{34} + Y_{45}$
5					--	$Y_{5.} = \sum_{i \neq i'} Y_{ii'} = Y_{15} + Y_{25} + Y_{35} + Y_{45}$
						$Y = \sum_{i<i'} Y_{ii'} = Y_{12} + Y_{13} + \ldots + Y_{45}$

TABELA 4. Estimativas dos componentes de médias e variâncias das estimativas no esquema dialélico (Método 4 de Griffing, 1956).

Componente	Estimativa	Variância da estimativa
Média geral	$\hat{m} = \frac{2}{n(n-1)} Y_{..}$	$var(\hat{m}) = \frac{2}{n(n-1)} \hat{\sigma}^2$
CGC	$\hat{g}_i = \frac{1}{n(n-2)} [nY_{i.} - 2Y_{..}]$	$var(\hat{g}_i) = \frac{n-1}{n(n-2)} \hat{\sigma}^2$
CEC	$\hat{s}_{ii'} = Y_{ii'} - \frac{1}{n-2}(Y_{i.} + Y_{i'.}) + \frac{2}{(n-1)(n-2)} Y_{..}$	$var(\hat{s}_{ii'}) = \frac{n-3}{n-1} \hat{\sigma}^2$

As fórmulas das estimativas dos parâmetros somente podem ser utilizadas quando a tabela dialélica está completa ou balanceada, ou seja, com todos os híbridos representados. Para tabelas incompletas, as estimativas dos parâmetros e a análise da variância devem ser conduzidas diretamente por operação com matrizes, respeitadas as restrições advindas das falhas.

As somas de quadrados devido aos parâmetros, na análise da variância, são obtidas $S = \hat{\beta}' X'Y$, para o modelo completo e para os modelos reduzidos seqüencialmente. A soma de quadrados devido a cada parâmetro é obtida por diferença entre a soma de quadrados referente ao parâmetro e a soma de quadrados do modelo hierarquicamente inferior, conforme representados na Tabela 5.

As fórmulas das somas de quadrados podem ser deduzidas algebricamente e são representadas no quadro da análise da variância (Tabela 6).

Se o conjunto de linhagens ou genótipos é de natureza aleatória, é possível estimar componentes da variância a partir dos quadrados médios na análise da variância. As esperanças dos quadrados médios são mostradas na Tabela 7.

Em termos de covariância entre parentes, têm-se as seguintes relações (Hallauer & Miranda Filho, 1995):

$$\sigma^2_g = COVMI = \frac{1}{4}(1+F)\,\sigma^2_A$$

$$\sigma^2_s = COVIG - 2COVMI = \frac{1}{4}(1+F)^2\,\sigma^2_D$$

Nas fórmulas, têm-se:

COVMI : covariância entre meios-irmãos

COVIG : covariância entre irmãos germanos

F : coeficiente de endogamia de Wright

σ^2_A : variância genética aditiva

σ^2_D : variância genética dominante

Quando genótipos de uma população não endógama (F = 0) são cruzados segundo o esquema dialélico, as estimativas dos componentes da variância são $\hat{\sigma}^2_A = 4\,\hat{\sigma}^2_g$ e $\hat{\sigma}^2_D = 4\,\hat{\sigma}^2_s$. Entretanto, também pode-se utilizar linhagens completamente endogâmicas (F = 1) em cruzamento dialélico. Nesse caso $\hat{\sigma}^2_A = 2\,\hat{\sigma}^2_g$ e $\hat{\sigma}^2_D = \hat{\sigma}^2_s$.

Quando se trata de estimação de componentes da variância, uma preocupação deve ser com o tamanho da amostra, pois amostras pequenas levam a erros relativamente grandes nas estimativas. No esquema dialélico, o problema é que aumentando-se o

TABELA 5. Representação dos efeitos e somas de quadrados para o modelo completo e modelos reduzidos.

Modelos	Representação	Soma de quadrados por modelo
Modelo completo	$[m, g_i, s_{ij}]$	S[m,g,s]
Modelo reduzido (a)	$[m, g_i]$	S[m,g]
Modelo reduzido (b)	[m]	S[m]
		S_{CGC} = S[m,g] - S[m]
		S_{CEC} = S[m,g,s] - S[m,g]

TABELA 6. Quadro da análise da variância com as somas de quadrados (Griffing, 1956).

Fontes de variação	gl	Somas de quadrados
Híbridos	$\frac{1}{2}\,n(n\text{-}1)\text{-}1$	$S_{TOTAL} = \sum_{i<j} Y^2_{ij} - \frac{2}{n(n-1)} Y^2_{..}$
Capac. geral de combinação	n-1	$S_{CGC} = \frac{1}{n-2}\sum_i Y^2_{i.} - \frac{4}{n(n-2)} Y^2_{..}$
Capac. específica de combinação	$\frac{1}{2}\,n(n\text{-}3)$	$S_{CEC} = \sum_{i<j} Y^2_{ij} - \frac{1}{n-2}\sum_i Y^2_{i.} + \frac{2}{(n-1)(n-2)} Y^2_{..}$
Erro	---	

TABELA 7. Quadro da análise da variância com as esperanças$^{\blacktriangledown}$ dos quadrados médios (Griffing, 1956).

Fontes de variação	QM	E(QM)
Híbridos	Q_1	$\sigma^2 + \sigma^2_H$
Capacidade geral de combinação	Q_{11}	$\sigma^2 + \sigma^2_s + (n\text{-}2)\,\sigma^2_g$
Capacidade específica de combinação	Q_{12}	$\sigma^2 + \sigma^2_s$
Erro	Q_2	σ^2

$^{\blacktriangledown}$Análise a partir de médias da tabela dialélica; σ^2 = QMresidual/K

tamanho da amostra dos genitores o número de cruzamentos aumenta em uma proporção maior; por exemplo aumentando-se a amostra de $n = 10$ para $n = 20$ o número de cruzamentos aumenta de 45 para 190. Deste modo, para uma amostra de tamanho aceitável ($n \geq 100$) o número de cruzamentos seria impraticável. Por esta razão uma alternativa é dividir o número total (n) em c conjuntos com k elementos, ou $n = ck$. O cruzamento dialélico é feito em cada conjunto, resultando c tabelas k x k. Finalmente, faz-se uma análise agrupada de todas as análises individuais e as fontes de variação são representadas por CGC/Conjuntos e CEC/Conjuntos com $c(k\text{-}1)$ e $ck(k\text{-}3)/2$ graus de liberdade, respectivamente (Hallauer & Miranda Filho, 1995).

3.2 DIALELO PARCIAL ST

Quando se dispõe de dois grupos ou conjuntos de genótipos ou linhagens pode ser interessante somente os cruzamentos entre grupos e não dentro de grupos. Esta situação pode acontecer, por exemplo, quando se dispõe de um grupo de linhagens tipo *dente* e um grupo tipo *flint* e existe interesse somente no estudo de híbridos semidentados. A diferenciação entre grupos também pode ser material exótico *vs.* local, tardio *vs.* precoce, alto *vs.* baixo etc. (Miranda Filho & Geraldi, 1984). Este esquema também pode ser aplicado quando se tem um conjunto de linhagens em cruzamento com vários testadores. Quando não são incluídos os pais, a análise se reduz à capacidade de combinação das linhagens ou genótipos de cada um dos grupos, independentemente. A este esquema foi dada a designação de dialelo parcial por Vencovsky & Barriga (1992), e que essencialmente equivale a um esquema fatorial. Cockerham (1963) utilizou a denominação de delineamento de dois fatores (*two-fator mating design*) que, sob modelo aleatório apropriado para estimar componentes da variância equivale ao esquema de cruzamento do Delineamento II de Comstock & Robinson (1948). A diferença com o dialelo parcial é que o esquema preconizado por Comstock & Robinson (1948) e Cockerham (1963) refere-se a dois conjuntos tomados aleatoriamente da mesma população base. Por dialelo parcial, entende-se a utilização de dois grupos distintos ou não relacionados de linhagens ou genótipos. Os efeitos genéticos nos híbridos são equivalentes aos efeitos de capacidade geral e capacidade específica de combinação, conforme definidos por Sprague & Tatum (1942). Por esta razão, Geraldi & Miranda Filho (1988) denominaram este esquema de Dialelo Parcial ST, para diferenciar de outros esquemas de dialelo parcial.

Para estimação dos efeitos do modelo e análise da variância o modelo é:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + \bar{e}_{ij} \qquad [C]$$

sendo m a média geral da tabela dialélica; g_i representa os efeitos de CGC das linhagens do grupo (1); g_j representa os efeitos de CGC das linhagens do grupo (2); s_{ij} é o efeito de CEC no híbrido i x j; $\bar{e}_{ij}$ é o erro experimental associado média do híbrido i x j. Utilizam-se os subíndices i e j para diferenciar os dois grupos, sendo i = 1, 2, ... , I e j = 1', 2', ... , J. A tabela dialélica assemelha-se à tabela de uma análise fatorial de dois fatores (Tabela 8).

Os efeitos podem ser estimados pela metodologia dos quadrados mínimos, à semelhança do procedimento descrito em 3.1. Quando os resultados são balanceados, ou seja, não existem caselas vazias (cruzamentos faltantes) na tabela dialélica, então os efeitos podem ser estimados diretamente, como mostrados na Tabela 9.

A análise da variância pode ser utilizada para testar os efeitos do modelo (modelo fixo), utilizando-se testes de hipóteses, ou para estimar os componentes da variância quando os dois conjuntos de linhagens ou genótipos constituírem amostras aleatórias das respectivas populações de referência. O quadro de análise da variância é mostrado na Tabela 10.

Em termos de covariância entre parentes, têm-se as seguintes relações (Hallauer & Miranda Filho, 1995):

$$\sigma^2_{gI} = COVMI_{12} = \frac{1}{4}(1+F)\,\sigma^2_{A12}$$

$$\sigma^2_{gII} = COVMI_{21} = \frac{1}{4}(1+F)\,\sigma^2_{A21}$$

$$\sigma^2_{s} = COVIG - 2COVMI = \frac{1}{4}(1+F)^2\,\sigma^2_{D12}$$

Nas fórmulas, têm-se (Miranda Filho, 1982):

$COVMI_{12}$: covariância entre meios-irmãos, definida para o cruzamento entre populações: genótipos da população (1) x população (2) como testador;

$COVMI_{21}$: covariância entre meios-irmãos, definida para o cruzamento entre populações: genótipos da população (2) x população (1) como testador;

COVIG: covariância entre irmãos germanos definida para cruzamento biparental: população (1) x população (2);

σ^2_{A12} : homólogo da variância genética aditiva, relacionada com $COVMI_{12}$;

σ^2_{A21} : homólogo da variância genética aditiva, relacionada com $COVMI_{21}$;

σ^2_{D12} : homólogo da variância genética dominante, definida para o híbrido interpopulacional.

A variância aditiva definida para o nível interpopulacional é:

$$\sigma^2_{A12} = \frac{1}{2}(\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21})$$

TABELA 8. Representação da tabela dialélica referente ao dialelo parcial ST: I = 5 e J = 4.

Pais	1'	2'	...	j	...	4'	Total
1	$Y_{11'}$	$Y_{12'}$	...	Y_{1j}	...	$Y_{14'}$	$Y_{1.}$
2	$Y_{21'}$	$Y_{22'}$	...	Y_{2j}	...	$Y_{24'}$	$Y_{2.}$
⋮	⋮	⋮		⋮		⋮	⋮
i	$Y_{i1'}$	$Y_{i2'}$	...	Y_{ij}	...	$Y_{i4'}$	$Y_{i.}$
⋮	⋮	⋮		⋮		⋮	⋮
5	$Y_{51'}$	$Y_{52'}$	...	Y_{5j}	...	$Y_{54'}$	$Y_{5.}$
Total	$Y_{.1'}$	$Y_{.2'}$	...	$Y_{.j}$	...	$Y_{.4'}$	$Y_{..}$

TABELA 9. Estimativas dos componentes de médias e erro das estimativas no esquema dialélico parcial ST.

Componente	Estimativa	Variância da estimativa
Média geral	$\hat{m} = \frac{1}{IJ} Y.. = \frac{1}{IJ} \sum_{ij} Y_{ij}$	$var(\hat{m}) = \frac{I+J}{4IJ} \hat{\sigma}^2$
CGC - grupo (1)	$\hat{g}_i = \frac{1}{J} Y_{i.} - m = \frac{1}{J} \sum_{j} Y_{ij} - \frac{1}{IJ} Y..$	$var(\hat{g}_i) = \frac{I-1}{IJ} \hat{\sigma}^2$
CGC - grupo (2)	$\hat{g}_j = \frac{1}{I} Y.j - m = \frac{1}{I} \sum_{i} Y_{ij} - \frac{1}{IJ} Y..$	$var(\hat{g}_j) = \frac{J-1}{IJ} \hat{\sigma}^2$
CEC	$\hat{s}_{ij} = Y_{ij} - \frac{1}{J} Y_{i.} - \frac{1}{I} Y_{.j} + \frac{1}{IJ} Y..$	$var(\hat{s}_{ij}) = \frac{(I-1)(J-1)}{IJ} \hat{\sigma}^2$

TABELA 10. Quadro da análise de variância no esquema dialélico parcial ST.

Fontes de variação	g.l.	QM	E(QM)
Híbridos	IJ-1	Q_1	$\sigma^2 + \sigma^2_H$
Capacidade geral de combinação (1)	I-1	Q_{11}	$\sigma^2 + \sigma^2_s + J\,\sigma^2_{gI}$
Capacidade geral de combinação (2)	J-1	Q_{12}	$\sigma^2 + \sigma^2_s + I\,\sigma^2_{gII}$
Capacidade específica de combinação	(I-1)(J-1)	Q_{13}	$\sigma^2 + \sigma^2_s$
Erro	...	Q_2	σ^2

Como citados nos cruzamentos com testadores, aqui também quando as populações não endógamas (F = 0) são cruzadas segundo o esquema dialélico, as estimativas dos componentes da variância são $\sigma^2_{A12} = 4\,\sigma^2_{gI}$, $\sigma^2_{A21} = 4\,\sigma^2_{gII}$ e $\sigma^2_{DL2} = 4\,\sigma^2_s$. Quando se utilizam linhagens completamente endogâmicas (F = 1) em cruzamento dialélico, os componentes da variância são $\sigma^2_{A12} = 2\,\sigma^2_{gI}$, $\sigma^2_{A21} = 2\,\sigma^2_{gII}$ e $\sigma^2_{DL2} = \sigma^2_s$.

Embora com o dialelo parcial seja possível incluir um maior número de genitores em relação ao dialelo completo, o problema de amostragem também existe quando se trata de estimação de componentes da variância. Por exemplo, uma amostragem mínima de 50 linhagens de cada grupo (população) resultaria em 2.500 híbridos, demonstrando claramente a inviabilidade do esquema para esse fim. A exemplo do dialelo completo, é recomendável dividir uma amostra grande em conjuntos menores. Por exemplo uma amostra de $n_1 = n_2 = 100$ linhagens de cada população poderia ser dividida em c = 20 conjuntos de k = 5. Os conjuntos são agrupados aos pares aleatoriamente, resultando 20 tabelas dialélias de 5 x 5. A análise da variância é então agrupara por conjuntos, resultando c (I-1) e c (J-1) graus de liberdade para CGC(1) e CGC(2), respectivamente; e c (I-1)(J-1) graus de liberdade para CEC. Se cada conjunto for avaliado em um experimento independente com K repetições, os graus de liberdade do erro também são agrupados, resultando c(IJ-1)(K-1). Hallauer & Miranda Filho (1995) sugerem esquema semelhante de agrupamento de conjuntos para a análise de cruzamentos segundo o Delineamento II de Comstock & Robinson (1948). Martins & Miranda Filho (1997) avaliaram linhagens endogâmicas de duas populações contrastantes segundo o esquema de dialelo parcial ST ou delineamento de dois fatores, fazendo o agrupamento de conjuntos conforme exposto. Os autores sugeriram que, a partir das estimativas de g_i e g_j em

cada conjunto, é possível predizer as médias dos demais híbridos não avaliados, utilizando-se o modelo reduzido $Y_{ij} = \hat{m} + \hat{g}_i + \hat{g}_j$. Assim, para n linhagens de cada população, seria possível a realização de $n^2 = c^2k^2$ combinações híbridas. Como ck^2 combinações são avaliadas experimentalmente, as demais $c(c-1)k^2$ podem ser preditas com base no modelo reduzido. Por exemplo, para $n_1 = n_2 = 100$, c = 20 e k = 5, ter-se-ia 10.000 combinações híbridas possíveis, 500 combinações avaliadas experimentalmente e 9.500 combinações preditas com base no modelo reduzido (Martins & Miranda Filho, 1997).

3.3 DIALELO PARCIAL CIRCULANTE - INTRAPOPULACIONAL (DPC)

O dialelo parcial circulante foi sugerido por Kempthorne & Curnow (1961) para aumentar o número de genitores a ser incluído no cruzamento dialélico. Assim, apenas uma parte dos cruzamentos são realizados, permitindo a participação de um maior número de genitores. Utiliza-se um sistema de amostragem dos genitores de modo que todos participam em combinações híbridas. Para um conjunto de *n* linhagens, são realizados $\frac{1}{2}$ *ns* cruzamentos, sendo *s* o número de cruzamentos em que participa cada linhagem, sendo $s \geq 2$. O conjunto de linhagens ou genótipos deve ser aleatório, pois caso contrário as *s* linhagens que servem de testador de uma linhagem qualquer podem ser muito diferentes das *s* linhagens que servem de testador de outra linhagem. Com amostra aleatória, pressupõe-se que qualquer linhagem está sendo testada com uma amostra aleatória de *s* linhagens da população.

O sistema de amostragem dos cruzamentos, pressupõe o cálculo de uma constante $k = \frac{1}{2}(n + 1 - s)$ e os cruzamentos são realizados na seguinte seqüência (Hallauer & Miranda Filho, 1995):

1 x (k + 1)	2 x (k + 2)	...	n x (k + n)
1 x (k + 2)	2 x (k + 3)	...	n x (k + n + 1)
⋮	⋮		⋮
1 x (k + *s*)	2 x (k + 1+ *s*)	...	n x (k + n -1 + *s*)

Nesta simbologia, qualquer número λ acima de n é reduzido para λ-n.

Um exemplo de combinações com 10 linhagens e *s* = 3 é mostrado na Tabela 11.

O modelo apropriado para representar um híbrido no esquema DPC é o mesmo do Método 4 de Griffing (1956), ou seja:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + \bar{e}_{ij}$$

tendo os efeitos o mesmo significado do modelo [C]. Na análise da variância, os componentes de variância e as covariâncias entre parentes são as mesmas do dialelo completo. O que difere entre os dois esquemas são os graus de liberdade associados a cada fonte de variação e os coeficientes nas esperanças dos quadrados médios. O quadro de análise da variância é como mostra a Tabela 12.

TABELA 11. Esquema de cruzamento para um dialelo parcial circulante entre 10 linhagens com $s = 3$.

	5	6	7	8	9	10
1	1x (k+1)	1 x (k + 2)	1 x (k + 3)			
2		2 x (k + 2)	2 x (k + 3)	2 x (k + 4)		
3			3 x (k + 3)	3 x (k + 4)	3 x (k + 5)	
4				4 x (k + 4)	4 x (k + 5)	4 x (k + 6)
5					5 x (k + 5)	5 x (k + 6)
6						6 x (k + 6)

*$k = \frac{1}{2}(n + 1 - s) = 4$

TABELA 12. Quadro da análise da variância para híbridos no esquema dialélico parcial circulante.

Fontes de variação	g.l.	QM	E(QM)
Híbridos	$\frac{1}{2}ns-1$	Q_1	$\sigma^2 + \sigma^2_H$
Capacidade geral de combinação	n-1	Q_{11}	$\sigma^2 + \sigma^2_s + \frac{s(n-2)}{n-1}\sigma^2_g$
Capacidade específica de combinação	$\frac{1}{2}n(s-2)$	Q_{12}	$\sigma^2 + \sigma^2_s$
Erro	---	Q_2	σ^2

As estimativas dos efeitos do modelo ($\hat{m}$, $\hat{g}_i$, $\hat{s}_{ii'}$: modelo fixo) e o procedimento para cálculo das somas de quadrados são baseados em operações matriciais, cuja seqüência de operações é dada por Kempthorne & Curnow (1961). Cruz & Regazzi (1994) fornecem detalhes da metodologia de análise do DPC. Kempthorne & Curnow (1961) também determinaram a eficiência relativa do dialelo completo em relação ao DPC. Foram usados dois métodos de estimação da capacidade de produção: método A, pelo qual os híbridos não amostrados (não avaliados experimentalmente) são estimados por $\hat{Y}_{ii'} = \hat{m} + \hat{g}_i + \hat{g}_{i'}$ enquanto que os híbridos amostrados são estimados pela média observada $Y_{ii'}$; pelo método B, ambos os tipos de híbridos (amostrados e não amostrados) são estimados por $\hat{Y}_{ii'} = \hat{m} + \hat{g}_i + \hat{g}_{i'}$. O método B tem vantagem sobre o método A somente se $(\sigma^2/\sigma^2_s) < 1$, sendo σ^2 o erro experimental para médias de tratamentos [ver E(QM) na Tabela 12].

Desde a sua introdução, o esquema DPC não tem sido utilizado amplamente em melhoramento. Para estimar componentes da variância no modelo aleatório, o Delineamento II de Comstock & Robinson (1948) é mais fácil de usar (Hallauer & Miranda Filho, 1995). Para um número pequeno de genitores, o modelo aleatório não é adequado e o esquema de dialelo completo pode ser mais conveniente. As estimativas dos componentes de médias (m, g_i e $s_{ii'}$), utilizando-se a metodologia de modelo fixo, têm valor limitado quando as linhagens vêm da mesma população, embora as linhagens selecionadas pela estimativa de g_i devam apresentar comportamento superior em cruzamentos com outras linhagens não pertencentes ao conjunto.

3.4 DIALELO PARCIAL CIRCULANTE - INTERPOPULACIONAL (DPCI)

Como já mencionado, uma limitação do esquema DPC (Kempthorne & Curnow, 1961) é que as linhagens avaliadas provêm de uma mesma população. Nos esquemas modernos de melhoramento, geralmente se utilizam de linhagens de duas populações, previamente escolhidas pelo seu padrão heterótico. Miranda Filho[1] propôs o uso do dialelo parcial circulante ao nível interpopulacional. À semelhança do DPC, aqui também são incluídos híbridos amostrados representando apenas uma amostra do total de híbridos possíveis. A amostragem não requer nenhum artifício especial e os cruzamentos podem ser planejados como exemplificado na Tabela 13, para n = 10 e s = 3.

O modelo apropriado é o mesmo do esquema do dialelo parcial ST, ou seja:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + \bar{e}_{ij}$$

Assim, são previstos ns cruzamentos amostrados a partir de um total de n^2 cruzamentos possíveis; os $n(n-s)$ híbridos não amostrados podem ser preditos pelo modelo reduzido $\hat{Y}_{ij} = \hat{m} + \hat{g}_i + \hat{g}_j$. Gonçalves (1987) trabalhou com 25 linhagens endogâmicas oriundas de duas populações distintas, em cruzamento no esquema DPCI com s = 3. Os híbridos foram avaliados em dois locais (Água Santa e ESALQ) e os coeficientes de determinação (R^2) entre valores observados e preditos pelo modelo reduzido foram estimados para peso de grãos (0,85 e 0,74), altura da planta (0,85 e 0,84), altura da espiga (0,74 e 0,64), diâmetro da espiga (0,91 e 0,68) e comprimento da espiga (0,91 e 0,80). A utilização do coeficiente R^2 para medir a eficiência da predição com base no modelo reduzido nem sempre é realista devido à diferença entre os graus de liberdade para CGC e CEC. Para s = 2, gl = 1 para CEC para qualquer valor de n e, conseqüentemente $R^2 \approx 1$. Para $s>2$, os gl para CEC são cerca de $(s-2)/2$ vezes os gl para CGC e eles são aproximadamente equivalentes para s = 4. Obviamente, para dados valores de n e s, R^2 tende a ser maior para efeitos menores ou não significativos de CEC (Miranda Filho & Vencovsky, 1999).

A estimação dos componentes de médias e a análise da variância são conduzidas

TABELA 13. Esquema de cruzamento para um dialelo parcial circulante entre 10 linhagens com s = 3.

	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'
1	x	x	x							
2		x	x	x						
3			x	x	x					
4				x	x	x				
5					x	x	x			
6						x	x	x		
7							x	x	x	
8								x	x	x
9	x								x	x
10	x	x								x

[1]Miranda Filho, J.B. citado por Gonçalves (1987).

pelo processo matricial, conforme descrito em 3.1, com a diferença de que a matriz β envolve dois conjuntos de efeitos referentes à CGC. Por facilidade, trabalha-se com o modelo reduzido $Y_{ij} = m + g_i + g_j + \bar{e}_{ij}$ pois os efeito de CEC (s_{ij}) são calculados por diferença ($\hat{s}_{ij} = Y_{ij} - \hat{m} - \hat{g}_i - \hat{g}_j$) O sistema matricial é representado a seguir:

$$\begin{array}{ccccc} \mathbf{Y} & & \mathbf{X} & & \boldsymbol{\beta} \quad \boldsymbol{\varepsilon} \end{array}$$

$$\left|\begin{array}{c} Y_{11'} \\ Y_{12'} \\ Y_{13'} \\ Y_{22'} \\ Y_{23'} \\ Y_{24'} \\ \vdots \end{array}\right| = \left|\begin{array}{ccccccccc} 1 & 1 & 0 & \cdots & 1 & & & \cdots \\ 1 & 1 & 0 & \cdots & & 1 & & \cdots \\ 1 & 1 & 0 & \cdots & & & 1 & \cdots \\ 1 & 0 & 1 & \cdots & & 1 & & \cdots \\ 1 & 0 & 1 & \cdots & & & 1 & \cdots \\ 1 & 0 & 1 & \cdots & & & & 1 \quad \cdots \\ \vdots & & & & & \vdots & & \end{array}\right| \left|\begin{array}{c} m \\ g_1 \\ g_2 \\ g_3 \\ \vdots \\ g_{1'} \\ g_{2'} \\ g_{3'} \\ \vdots \end{array}\right| \left|\begin{array}{c} \\ \varepsilon_{11'} \\ \varepsilon_{12'} \\ \varepsilon_{13'} \\ \vdots \end{array}\right|$$

As somas de quadrados devido aos efeitos no modelo são calculadas a partir da soma de quadrados total e dos modelos reduzidos (Tabela 14). Para cada um dos modelos reduzidos a soma de quadrados é dada por $S = \hat{\beta}' X'Y$.

Na análise da variância a distribuição dos graus de liberdade e as somas de quadrados são como mostra a Tabela 15.

Miranda Filho & Vencovsky (1999) apresentam uma análise de variância alternativa que permite estimar os componentes da variância.

Observando as diagonais da Tabela 13, percebe-se que existe uma covariância genética entre as diagonais; a covariância entre cada par é uma função linear da variância devido à capacidade geral de combinação (σ^2_g). Existem duas variâncias para CGC, sendo uma para cada população. Para CGC(I), as covariâncias entre diagonais são obtidas diretamente do esquema mostrado na Tabela 13. Para CGC(II), as diagonais devem ser rearranjadas; para n = 10 e s = 3, as diagonais para obtenção das covariâncias são como mostradas na Tabela 16.

Os dois grupos de diagonais (Tabela 16) podem ser analisados como tabelas de dupla-entrada, de acordo com o modelo fatorial:

$$Y_{ik} = \mu + \tau_i + \delta_k + (\tau\delta)_{ik} + \bar{e}_{ik} \quad \text{para o grupo I; e}$$

$$Y_{jk} = \mu + \tau_j + \delta_k + (\tau\delta)_{jk} + \bar{e}_{jk} \quad \text{para o grupo II;}$$

onde μ é a média geral e é comum para ambos os grupos; τ_i e τ_j são os efeitos constantes das linhas I e II, respectivamente; δ_k é o efeito aleatório devido às diferenças entre diagonais e $(\tau\delta)_{ik}$ e $(\tau\delta)_{jk}$ são os efeitos da interação de linhagens com diagonais dentro dos respectivos grupos. O último efeito é o do erro experimental associado às médias de híbridos.

Dentro de cada grupo, as diagonais são representadas por híbridos envolvendo as mesmas linhagens de modo que, em média, elas diferem somente

pelo erro médio e por uma pequena quantidade representada pela CEC ($\frac{1}{n}\sum s_{ij}$). As esperanças dos efeitos quadráticos são: $E(\delta_k^2) = \sigma_d^2$, $E(\tau_i^2) = \sigma_{gI}^2 = \sigma_{gI}^2$, $E(\tau_j^2) = \sigma_{gII}^2 = \sigma_{gII}^2$, e $E(\bar{e}_{ik}) = E(\bar{e}_{jk}) = \sigma^2$. Os componentes σ_{gI}^2 e σ_{gII}^2 representam as variâncias devido à capacidade geral de combinação das linhagens dentro de grupos; σ^2 é a variância do erro ajustada para análise com médias sobre repetições.

A análise da variância das tabelas de dupla-entrada são mostradas na Tabela 17. As análises para os grupos I e II têm estrutura semelhante. Nas esperanças dos quadrados médios, a variância média dentro de diagonais e a variância do erro são as mesmas em ambos os grupos. A decomposição das somas de quadrados é ortogonal dentro de grupos mas não ortogonal entre grupos (Tabela 17). Pelo fato de as estimativas dos componentes da variância serem baseadas em ambas as análises, as estimativas são correlacionadas de alguma forma.

TABELA 14. Representação de modelos e suas somas de quadrados para o esquema de cruzamento DPCI.

	Representação	Soma de quadrados por modelo
Modelo completo	[m, g_i , g_j , s_{ij}]	—
Modelo reduzido (a)	[m, g_i , g_j]	S[m, g_i , g_j]
Modelo reduzido (b)	[m, g_i]	S[m, g_i]
Modelo reduzido (c)	[m, g_j]	S[m, g_j]
Modelo reduzido (d)	[m]	S[m]

TABELA 15. Somas de quadrados na análise da variância entre híbridos pelo esquema dialélico parcial circulante interpopulacional.

Fontes de variação	g.l.	Somas de quadrados
Híbridos	ns-1	$S_{TOTAL} = \sum Y_{ij}^2 - \frac{1}{ns} Y^2$
Capacidade geral de combinação	2(n-1)	S[m, g_i , g_j] - S[m]
CGC (I)	n-1	S[m, g_i , g_j] - S[m, g_j]
CGC (II)	n-1	S[m, g_i , g_j] - S[m, g_i]
Capacidade específica de combinação	n(s-2)+1	S_{TOTAL} - S[m, g_i , g_j]

TABELA 16. Representação esquemática das diagonais da Tabela 13 rearranjadas de acordo com a população de referência (I e II).

Linhas-I	D_1	D_2	D_3	Linhas-II	D_1'	D_2'	D_3'
1	1x1'	1x2'	1x3'	1'	1'x1	1'x10	1'x9
2	2x2'	2x3'	2x4'	2'	2'x2	2'x1	2'x10
3	3x3'	3x4'	3x5'	3'	3'x3	3'x2	3'x1
4	4x4'	4x5'	4x6'	4'	4'x4	4'x3	4'x2
5	5x5'	5x6'	5x7'	5'	5'x5	5'x4	5'x3
6	6x6'	6x7'	6x8'	6'	6'x6	6'x5	6'x4
7	7x7'	7x8'	7x9'	7'	7'x7	7'x6	7'x5
8	8x8'	8x9'	8x10'	8'	8'x8	8'x7	8'x6
9	9x9'	9x10'	9x1'	9'	9'x9	9'x8	9'x7
10	10x10'	10x1'	10x2'	10'	10'x10	10'x9	10'x8

I, II : linhagens das populações I e II que são comuns a todas as diagonais do respectivo grupo. D e D' são diagonais representando híbridos arranjados para as linhagens 1, 2, ... , 10 da população I e para as linhagens 1', 2'... 10' da população II.

TABELA 17. Análise da variância da tabela de dupla-entrada representando *s* diagonais do grupo I.

Fonte	g.l.	QM	
Diagonais (D)	*s*-1	Q_d	$\sigma^2 + \sigma^2_\delta$
Linhas (L)	*n*-1	Q_r	$\sigma^2 + \sigma^2_{\delta l} + \sigma^2_{rl} = \sigma^2 + (\bar{\sigma}^2_H - COV_{gI}) + s\,COV_{gI}$
L x D	(*n*-1)(*s*-1)	Q_{rd}	$\sigma^2 + \sigma^2_{\delta l} = \sigma^2 + (\bar{\sigma}^2_H - COV_{gI})$
Erro	(*r*-1)(*ns*-1)	Q_e	σ^2
Híbridos/D	*s* (n-1)	$Q_{H/D}$	$\sigma^2 + \sigma^2_H$

$\bar{\sigma}^2_H$: média de s variâncias dentro de diagonais ; COV: média de s(s-1)/2 covariâncias entre diagonais.

A covariância entre quaisquer duas diagonais é estimada por

$$\hat{COV}_I = \frac{1}{n-1}[\sum_{ij}^{n} Y_{ij} Y_{ij'} - \frac{1}{n}(\sum_{ij}^{n} Y_{ij})(\sum_{ij}^{n} Y_{ij'})]$$

$$\hat{COV}_{II} = \frac{1}{n-1}[\sum_{ij}^{n} Y_{ij} Y_{i'j} - \frac{1}{n}(\sum_{ij}^{n} Y_{ij})(\sum_{ij}^{n} Y_{i'j})]$$

Em termos de esperança matemática, as covariâncias são:

$$COV_I = E[(Y_{ij} - m)(Y_{ij'} - m)] = E[(g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij})(g_i + g_{j'} + s_{ij'} + e_{ij'})] = \sigma^2_{gI}$$

$$COV_{II} = E[(Y_{ij} - m)(Y_{i'j} - m)] = E[(g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij})(g_{i'} + g_j + s_{i'j} + e_{i'j})] = \sigma^2_{gII}$$

As covariâncias entre diagonais totalizam $\frac{1}{2}s(s\text{-}1)$ estimativas de σ^2_g para cada população e a estimativa média das covariâncias é a estimativa média da variância devido à capacidade geral de combinação.

As estimativas dos componentes da variância são obtidas por:

$$\overline{COV}_I = \overline{COV}_{gI} = \sigma^2_{gI} = \frac{1}{s}(Q_r - Q_{rd}); \bar{\sigma}^2_H = \frac{s-1}{s}Q_{rd} + \frac{1}{s}Q_r - Q_e$$

$$\overline{COV}_{II} = \overline{COV}_{gII} = \sigma^2_{gII} = \frac{1}{s}(Q_r - Q_{rd}); \bar{\sigma}^2_H = \frac{s-1}{s}Q_{rd} + \frac{1}{s}Q_r - Q_e$$

onde σ^2_g representa a capacidade geral de combinação de linhagens do respectivo grupo; e $\bar{\sigma}^2_H = \sigma^2_{gI} + \sigma^2_{gII} + \sigma^2_s$ é a variância entre híbridos dentro de diagonais. O último componente é a variância devido à capacidade específica de combinação, a qual é estimada por $\hat{\sigma}^2_s = \hat{\bar{\sigma}}^2_H - \hat{\sigma}^2_{gI} - \hat{\sigma}^2_{gII}$. Para a obtenção de todas as estimativas, a análise da variância mostrada na Tabela 17 deve ser feita para ambos os grupos de diagonais.

A tradução dos componentes da variância para variâncias genéticas é dada pelas funções lineares:

$$\sigma^2_{gI} = \frac{1+F}{4}\,\sigma^2_{A12}\ ;\ \sigma^2_{gII} = \frac{1+F}{4}\,\sigma^2_{A21}\ ;\ \sigma^2_s = (\frac{1+F}{2})^2\,\sigma^2_{D12}\ \text{ e}$$

$$\sigma^2_H = \frac{1+F}{4}\left(\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}\right) + \left(\frac{1+F}{2}\right)^2 \sigma^2_{D12} = \frac{1+F}{2}\sigma^2_{A12} + \left(\frac{1+F}{2}\right)^2 \sigma^2_{D12}$$

sendo F o coeficiente de endogamia das linhagens oriundas de uma população de referência não endógama (Hallauer & Miranda Filho, 1995); σ^2_{A12} e σ^2_{A21} são homólogos da variância aditiva, de modo que $\frac{1}{2}\left(\sigma^2_{A12} + \sigma^2_{A21}\right) = \sigma^2_{A12}$ é a variância aditiva definida para o híbrido interpopulacional; do mesmo modo σ^2_{D12} é a variância dominante definida para o híbrido interpopulacional (Miranda Filho, 1982).

Os componentes da variância genética são então estimados por:

$$\hat{\sigma}^2_{A12} = \frac{2}{1+F}\left(\hat{\sigma}^2_{gI} + \hat{\sigma}^2_{gII}\right) \qquad \text{e} \qquad \hat{\sigma}^2_{D12} = \left(\frac{2}{1+F}\right)^2 \hat{\sigma}^2_s$$

Uma análise completa do DPCI com dados de comprimento da espiga é fornecida por Miranda Filho & Vencovsky (1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR MORÁN, J.F. Comparação de testadores para avaliação da capacidade de combinação de linhagens de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. Tese, Doutorado.

ALLISON, J.C.S.; CURNOW, R.W. On the choice of tester parent for the breeding of synthetic varieties of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v.6, p.541-544, 1966.

BEAL, W.J. **Indian corn rept. Wich. Board. Agric.**, v.19, p.279-289, 1880.

CHAVES, LJ; MIRANDA FILHO, JB. Predicting variety composite means without diallel crossing. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.501-506, 1997.

COCKERHAM, C.C. Estimation of genetic variances. In: HANSON, W.D.; ROBINSON, H.F. (Ed.) **Statistical genetics and plant breeding**. Washington: NAS-NRC, 1963. p.53-94. (Publ., 982)

COMPTON, W.A.; GARDNER, C.O.; LONNQUIST, J.H. Genetic variability in two open-pollinated varieties of corn (*Zea mays* L.) and their F_1 progenies. **Crop Science**, v.5, p.505-508, 1965.

COMSTOCK, R.E. Selection procedures in corn improvement. **Proceedings of the Annual Hybrid Corn Industry Research Conference**, v.19, p.87-94, 1964.

COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H.F. The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. **Biometrics**, v.4, p.254-266, 1948.

CRUZ, C.D. REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390p.

DAVIS RL. Report of the plant breeder. **Rep. Puerto Rico Agricultural Experiment Station**, p.14-15, 1927.

EBERHART, S.A.; GARDNER, C.O. A general model for genetic effects. **Biometrics**, v.22, p.864-881, 1966.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. New York: Ronald Press, 1960. 430 p.

FISHER, R.A. **The theory of inbreeding**. 2.ed. London: Academic Press, 1965.

FYFE, J.L.; GILBERT, N. Partial diallel crosses. **Biometrics**, v.19, p.278-286, 1963.

GARDNER, C.O.; EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, v.22, p.439-452, 1966.

GERALDI, I.O.; MIRANDA FILHO, J.B. Adapted models for the analysis of combining ability of varieties in partial diallel crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, p.419-430, 1988.

GONÇALVES, P.S. Esquema circulante de cruzamentos para avaliação de linhagens de milho (*Zea mays* L.) ao nível interpopulacional. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. Tese, Doutorado.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.9, p.463-493, 1956.

HALLAUER, A.R. Relation of gene action and type of tester in maize breeding procedures. **Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Research Conference**, v.30, p.150-165, 1975.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, v.35, p.1-16, 1990.

HALLAUER, A.R.; LOPES PERES, E. Comparisons among testers for evaluating lines of corn. **Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Research Conference**, v.34, p.57-75, 1979.

HALLAUER A.R.; MIRANDA FILHO J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1995.

HULL, F.H. Recurrent selection for specific combining ability in corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.37, p.134-145, 1945.

JENKINS, M.T. Methods of estimating the performance of double crosses in corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.26, p.199-204, 1934.

JENKINS, M.T. The effect of inbreeding and selection within inbred lines of maize upon the hybrids made after successive generations of selfing. **Iowa State College Journal of Science**, v.6, p.429-450, 1935.

JENKINS M.T.; BRUNSON A.M. Methods of testing inbred lines of maize in crossbred combinations. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.24, p.523-530, 1932.

JONES, D.F. The effects of inbreeding and crossbreeding upon development. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, v.207, p.5-100, 1918.

KEMPTHORNE, O.; CURNOW, R.N. The partial diallel cross. **Biometrics**, v.17, p.229-250, 1961.

MARTINS, C.S.; MIRANDA FILHO, J.B. Evaluation of inbred lines from two maize (*Zea mays* L.) brachytic populations in single crosses following the two-factor mating design. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.265-273, 1997.

MATZINGER, D.F. Comparison of three types of testers for evaluation of inbred lines. **Agronomy Journal**, v.45, p.493-495, 1953.

MIRANDA FILHO, J.B. Mating schemes to predict gain on heterosis in reciprocal recurrent selection. **Brazilian Journal of Genetics**, v.5, p.745-760, 1982.

MIRANDA FILHO, J.B. Breeding methodologies for tropical maize. In: BRANDOLINI, A.; SALAMINI, F. (Ed.) **Breeding strategies for maize production improvement in the tropics**. Firenze: Istituto Agronomico per L'oltremare, 1985. p.177-206.

MIRANDA FILHO, J.B. Analysis of diallel tables with reciprocal crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, p.633-637, 1995.

MIRANDA FILHO, J.B.; CHAVES, L.J. Analysis of diallel crosses with F_2 generations. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.127-132, 1996.

MIRANDA FILHO, J.B.; GERALDI, I.O. An adapted model for the analysis of partial diallel crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, v.7, p.677-688, 1984.

MIRANDA FILHO, J.B.; PATERNIANI, E. Intra and interpopulation genetic parameter estimates and implications in selection. **Brazilian Journal of Genetics**, v.6, p.15-27, 1983.

MIRANDA FILHO, J.B.; VENCOVSKY, R. The partial circulant diallel cross at the interpopulation level. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.249-255, 1999.

MIRANDA FILHO, J.B.; VENCOVSKY, R. **Variance among testcrosses**. Piracicaba: USP/ESALQ, Depto. de Genética, 2001. 11p. (Publicação Didática)

RAWLINGS, J.O.; THOMPSON, D.L. Performance level as criterion for the choice of maize testers. **Crop Science**, v.2, p.217-220, 1962.

SHULL, G.H. The composition of a field of maize. **American Breeders Association Report**, v.4, p.296-301, 1908.

SHULL, G.H. A pure line method of corn breeding. **American Breeders Association Report**, v.5, p.51-59, 1909.

SHULL, G.H. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders Magazine**, v.1, p.98-107, 1910.

SINGH, R.K.; CHAUDARY, B.D. **Biometrical methods in quantitative genetic analysis**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1979. 304p.

SPRAGUE, G.F. Early testing of inbred lines of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.38, p.107-117, 1946.

SPRAGUE, G.F.; TATUM, L.A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **American Society of Agronomy**, v.34, p.923-932, 1942.

VENCOVSKY, R. Alguns aspectos teóricos e aplicados relativos a cruzamentos dialélicos de variedades. Piracicaba: ESALQ/USP, 1970. 110p. Tese, Livre-Docência.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

22

INTERAÇÃO DE GENÓTIPOS COM AMBIENTES

LÁZARO JOSÉ CHAVES

Universidade Federal de Goiás - UFG, Campus Samambaia, C.P. 131 - CEP: 74001-970 - Goiânia, GO.

1. INTRODUÇAO

Um dos princípios básicos no estudo da herança de caracteres métricos é o de que o valor de um indivíduo (fenótipo) é determinado por dois componentes básicos: a constituição genética (genótipo) e uma contribuição do ambiente específico em que aquele indivíduo se encontra. Este princípio pode ser representado pela expressão:

$$F = G + A \qquad (1)$$

sendo F o valor fenotípico, G o valor genotípico e A um desvio provocado pelo ambiente. Se um dado genótipo puder ser copiado (como nas linha puras, nos híbridos simples e nos clones) e plantado em diferentes pontos representativos do conjunto de ambientes da área experimental, toda a variação observada entre indivíduos será de natureza ambiental. Uma vez que a contribuição do ambiente se manifesta como desvios em torno do valor genotípico G, na média, estes valores tendem a se anular. Desta forma, a média dos valores fenotípicos dos diferentes indivíduos representa uma estimativa do valor genotípico daquele genótipo específico, ou seja, $\hat{G} = \overline{F}$. Esta estimativa será tão mais precisa quanto maior for o número de indivíduos avaliados.

Na rotina do melhoramento de plantas, a avaliação de genótipos para caracteres métricos é feita, via de regra, em parcelas experimentais com várias plantas. Se as parcelas que recebem os diferentes genótipos (tratamentos) são repetidas em delineamento experimental adequado, a média geral daquele tratamento representa uma estimativa não viesada do valor genotípico.

Em experimentos de campo, as diferenças ambientais que ocorrem entre covas dentro de uma parcela experimental ou entre parcelas dentro de um mesmo experimento são devidas, basicamente, à variações de solo e fatores erráticos como falhas de germinação, ataque de pragas, diferenças na profundidade de semeadura etc. Outros fatores ambientais como, por exemplo, diferenças climáticas, altitude, comprimento do dia, tipo de solo, variam muito pouco dentro de uma mesma área experimental, no entanto podem variar bastante quando se considera uma outra localidade ou outro ano de teste. Assim, por conveniência prática, dois níveis de variação ambiental precisam ser considerados. A variação dentro do experimento ou microambiental, cuja porção não controlada pode ser medida pela variação residual ou erro experimental e a variação de macroambientes ou, simplesmente, a variação de ambientes, podendo ser estes diferentes locais, anos, épocas de plantio, níveis de tecnologia etc.

Quando um dado genótipo é submetido a dois ambientes diferentes (locais por exemplo) espera-se uma variação no valor fenotípico maior que aquela ocorrida ao nível do microambiente experimental. Neste caso, o valor genotípico deve ser estimado com base na média dos dois locais. O mesmo princípio vale quando se consideram vários ambientes de teste. Quando vários genótipos são avaliados em

vários ambientes, pode ocorrer – e geralmente ocorre – de o ambiente alterar diferentemente o mesmo caráter em diferentes genótipos, ou seja, pode ocorrer uma interação entre fatores. Define-se então, a interação de genótipos com ambientes como sendo o efeito diferencial dos ambientes sobre os genótipos. Vista pelo outro lado, a interação resulta da resposta diferencial dos genótipos à variação ambiental.

No melhoramento de plantas, considerações a respeito da interação de genótipos com ambientes são essenciais para a eficiência do processo. Isto porque a maioria dos caracteres de importância para o melhoramento, nas diferentes espécies, são caracteres métricos. Estes caracteres apresentam distribuição contínua, possuem herança poligênica e sofrem grande influência das variações ambientais. Para que um dado genótipo, ou conjunto de genótipos, seja reconhecido como cultivar, deverá ter passado por avaliações em diversas condições ambientais, de forma a se ter mais segurança quanto ao seu desempenho. Mesmo assim, poderá acontecer que, no ambiente específico da lavoura de um agricultor ocorram condições ambientais não enfrentadas por aquela cultivar em sua fase de teste. Se a cultivar interagir negativamente com aquela situação especial, terá trazido um risco para aquele agricultor, mesmo que seu desempenho médio na região tenha sido superior.

De todas as fases de um programa de melhoramento de plantas, a avaliação dos genótipos em diferentes condições ambientais representa, em geral, a mais trabalhosa e mais cara. Desta forma, o tamanho do programa fica limitado pela capacidade de avaliação experimental dos materiais. Qualquer ganho em eficiência nesta fase representa, portanto, um ganho em eficiência em todo o processo. Para isto, um bom entendimento da interação de genótipos com ambientes poderá contribuir para o aproveitamento de seus efeitos benéficos, bem como para contornar seus efeitos indesejáveis sobre a avaliação de genótipos e recomendação de cultivares.

2. CAUSAS E NATUREZA DA INTERAÇÃO

A interação de genótipos com ambientes deve ser encarada como um fenômeno biológico em suas aplicações no melhoramento de plantas e não como um simples efeito estatístico. Considerando a afirmação de Dobzhansky (1973) de que "nada em biologia faz sentido a não ser à luz da evolução", cumpre buscar a explicação evolutiva do fenômeno se quisermos aproveitá-lo no melhoramento. Para este propósito o conceito de adaptação é o mais adequado.

Uma população grande, ocupando uma área geográfica ambientalmente variável, estará sujeita a pressões de seleção diferentes, ao longo de sua distribuição espacial. Havendo variabilidade no valor adaptativo dos indivíduos, serão beneficiados, em cada condição ambiental particular, aqueles indivíduos mais adaptados, mesmo que estes desviem do valor adaptativo médio. Havendo alguma restrição ao fluxo gênico entre subpopulações, diferenças entre estas poderão surgir como resultado desta seleção diferencial criando os chamados ecótipos, cada qual melhor adaptado ao seu ambiente específico. Esta adaptação específica a determinados ambientes é a causa evolutiva básica da interação de genótipos com ambientes que se manifesta sobre qualquer caráter métrico. Vista desta forma, a interação de genótipos com ambientes, é conseqüência da mesma causa básica da diversidade, pois boa parte da diversidade natural existente surgiu pelo efeito diferencial da seleção.

Com as espécies cultivadas, o processo de domesticação provocou um aceleramento nas mudanças evolutivas nas condições de cultivo. Por um lado, porque as espécies passaram a se distribuir por uma área geográfica muito além dos limites dos seus genitores e, por outro, pelo papel importante da seleção artificial provocada pelo homem, de forma intencional ou não. Assim, a enorme diversidade encontrada na maioria das espécies cultivadas deriva deste processo de adaptação diferencial a condições específicas de ambiente.

Com o melhoramento moderno, recursos genéticos de diferentes origens passaram a ser utilizados. Por uma questão de escala, buscam-se cultivares que sejam adaptadas à maior gama possível de condições ambientais. Não é de se estranhar, portanto, que a manifestação da interação seja a regra, nos ensaios de avaliação de genótipos em vários ambientes. Portanto, a interação de genótipos com ambientes deve ser encarada, não como um problema ou um fator indesejável, cujos efeitos devem ser minimizados em um programa de melhoramento. Ao contrário, como um fenômeno biológico natural, cumpre conhecê-la bem, para melhor aproveitá-la no processo de seleção.

Diferenças em adaptação de genótipos em populações resultam, obviamente, de diferenças de constituição gênica para os caracteres importantes nesta adaptação. A reação diferencial às mudanças ambientais pode-se dar desde os mecanismos de regulação gênica até caracteres morfológicos finais.

Considere-se um loco B com dois alelos B_1 e B_2. Poderá acontecer que em um ambiente A_1 o alelo B_1 esteja ativo ou "ligado" e em um ambiente A_2 o mesmo alelo esteja inativo ou "desligado". Se o oposto ocorrer com o alelo B_2 e supondo que o produto deste loco seja importante na adaptação, teremos o genótipo B_1B_1 especificamente adaptado ao ambiente A_1, enquanto o genótipo B_2B_2 será especificamente adaptado ao ambiente A_2. O genótipo heterozigoto B_1B_2 será adaptado aos dois ambientes, uma vez que em cada ambiente um alelo estará funcionando. Se, no entanto, houver um efeito de "dose" do produto gênico, o heterozigoto será menos adaptado a cada um dos ambientes, que o homozigoto respectivo. O mesmo princípio pode ser explicado quando se consideram os muitos locos que governam um caráter métrico ou quantitativo. Neste caso, além das interações de cada loco particular, poderão acontecer ainda, interações entre alelos de locos diferentes. Um outro efeito interessante da interação ao nível gênico diz respeito à reversão de dominância. Kang (1998) apresenta alguns exemplos de situações reais onde um alelo se comporta como dominante em um ambiente e como recessivo quando o ambiente é alterado.

A interação pode se dar, também, ao nível da expressão gênica, desde a atividade das enzimas até a manifestação de caracteres finais, como a produção. Na Figura 1 está representado um modelo considerando um loco hipotético como dois alelos (B e b) e a resposta dos genótipos homozigotos à variação das condições ambientais (Beavis & Keim, 1996). Na ordenada está representada a expressão fenotípica, medida pela atividade das enzimas produzidas por cada genótipo. Na abscissa estão representados quatro ambientes formados pela combinação de dois fatores a saber: 1– baixo nível de substrato e baixa temperatura; 2 – baixo nível de substrato e alta temperatura; 3 – alto nível de substrato e baixa temperatura e 4 – alto nível de substrato e alta temperatura.

O alelo **B** codifica uma enzima com alta atividade em baixo nível de substrato e baixa temperatura, enquanto que o alelo **b** codifica uma forma alternativa com alta atividade em alto nível de substrato e alta temperatura. A resposta fenotípica, medida pela atividade da enzima, mostra o genótipo **BB** especificamente adaptado ao ambiente 1 e o genótipo **bb** especificamente adaptado ao ambiente 4. Nos ambientes 2 e 3, ambos os genótipos possuem adaptação intermediária. Note-se que, apesar das diferenças entre os genótipos em ambientes particulares, na média dos quatro ambientes o desempenho é o mesmo. Também os ambientes seriam indiferenciáveis se medidos pelo comportamento médio dos genótipos. Um modelo com dois locos independentes com dois alelos por loco é apresentado, também, por Beavis & Keim (1996).

Quando se consideram caracteres métricos de importância para o melhoramento, deve haver uma multiplicidade de fatores atuando nos mais diferentes níveis, desde a regulação gênica até a manifestação final.

Allard & Bradshaw (1964) utilizam uma situação simples onde são considerados dois genótipos em dois ambientes, para ilustrar alguns tipos de interação. Na Figura 2 são apresentadas três situações básicas que trazem diferentes conseqüências para o melhoramento.

Duas populações geneticamente distintas G_1 e G_2, são submetidas a dois ambientes A_1 e A_2. Assume-se que o ambiente A_2 é mais favorável para a manifestação do caráter genérico Y, que pode ser qualquer variável métrica. Na situação **a** a mudança das condições ambientais afeta igualmente o comportamento dos genótipos, caracterizando-se a ausência de interação. Neste caso a diferença entre os genótipos se mantém constante nos dois ambientes. Nas situações **b** e **c** a mudança de ambiente afeta desigualmente a manifestação do caráter para os dois genótipos, ou seja, a diferença entre os genótipos varia entre ambientes. No caso **b** o efeito individual do ambiente não provocou uma mudança na classificação dos genótipos, sendo em ambas as condições, G_2 superior a G_1. Para este tipo, a interação é denominada simples ou quantitativa. No caso **c**, há uma mudança na classificação dos mesmos. Neste caso a interação é denominada cruzada ou qualitativa.

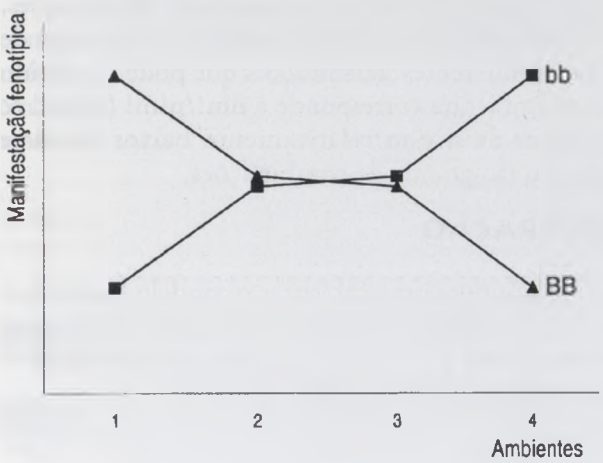


FIGURA 1. Modelo de um loco com dois alelos, com resposta das linhas homozigotas a diferentes condições ambientais (adaptado de Beavis & Keim, 1996).

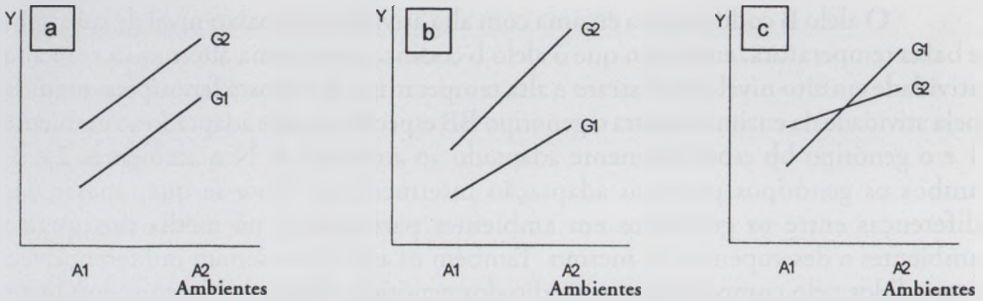


FIGURA 2. Comportamento de dois genótipos (G1 e G2) em duas condições ambientais (A1 e A2). a) ausência de interação; b) interação simples ou quantitativa; c) interação cruzada ou qualitativa.

As implicações para o melhoramento, dos diferentes tipos de resposta dos genótipos aos ambientes, são óbvias. Nas situações **a** e **b** da Figura 2, um mesmo genótipo (G_2) é o melhor adaptado às duas condições ambientais e uma seleção baseada na média dos ambientes beneficiará sempre o melhor genótipo. Na situação **b**, a manifestação da interação é conseqüência, apenas, da conceituação aditiva do fenômeno e poderia ser explicada, por exemplo, pela ação multiplicativa dos ambientes sobre os genótipos (Chaves *et al.*, 1989). Na situação **c**, a seleção baseada na média dos ambientes não é capaz de satisfazer o conjunto dos ambientes podendo levar a uma seleção de genótipos mal adaptados a uma situação particular.

Falconer (1987) considera que um caráter medido em dois ambientes pode ser tratado como dois caracteres, porque diferentes mecanismos fisiológicos podem estar atuando. Assim os locos requeridos para alta adaptação a um ambiente podem ser diferentes daqueles requeridos no ambiente contrastante. O autor propõe o uso do coeficiente de correlação genética entre ambientes como uma ferramenta para esclarecer tal situação. Se um conjunto de genótipos mostra alta correlação genética para um caráter, quando avaliados em dois ambientes, isto é um indicativo de que os mesmos locos estão determinando a manifestação do caráter nas duas situações. O contrário indica certa independência dos mecanismos que interferem no fenótipo do caráter.

Quando se consideram vários genótipos avaliados em vários ambientes, a combinação de situações como as da Figura 2, forma um emaranhado de situações, difícil de ser interpretado, exigindo métodos adequados de análise da interação de genótipos com ambientes. O número de diferentes classificações que pode ser obtido quando se avaliam **n** genótipos em **m** ambientes corresponde a **nm!/n!m!** (Allard & Bradshaw, 1964). Mesmo com valores de **n** e **m** relativamente baixos torna-se impraticável trabalhar com um número tão grande de combinações.

3. QUANTIFICAÇÃO DA INTERAÇÃO

Na presença de interação de genótipos com ambientes o modelo básico que considera a expressão fenotípica como resultado da ação de variações ambientais sobre o valor genotípico, torna-se insuficiente para expressar a variação dos dados. A inclusão da interação pode ser feita utilizando-se o modelo:

$$F = G + A + GA \qquad (2)$$

sendo *GA* a parcela relativa à interação. Para que o efeito *GA* seja detectado são necessários, pelo menos, dois genótipos, avaliados em dois ambientes.

Na Tabela 1 estão representados os valores fenotípicos básicos de dois genótipos (G_1 e G_2) em dois ambientes (A_1 e A_2). Na ausência de interação, o efeito ambiental sobre os genótipos é o mesmo, ou seja, $a - c = b - d$. Da mesma forma os efeitos genotípicos são os mesmos nos dois ambientes, ou seja, $a - b = c - d$. Neste caso, os efeitos de genótipos e de ambientes calculados com base na média, correspondem aos efeitos particulares, isto é $[(a + b - c - d)/2] = a - c = b - d$ e $[(a + c - b - d)/2] = a - b = c - d$. Isto significa que a seleção de genótipos com base na média dos ambientes atenderia a cada situação particular ou, ainda, que a seleção poderia ser feita em apenas um ambiente. A detecção da presença da interação consiste, portanto, em se verificar as desigualdades $a - b \neq c - d$ ou $a - c \neq b - d$.

Quando se dispõem de valores fenotípicos observados de vários genótipos avaliados em diversos ambientes, há a necessidade de se lançar mão de modelos estatísticos apropriados para tratamento da interação. Isto porque, por um lado, a avaliação experimental inclui no valor observado variações de natureza não controlada que impossibilitam uma comparação aritmética dos dados e, por outro lado, porque o número de desigualdades a serem observadas torna impraticável a análise dos dados.

Supondo-se que os genótipos foram avaliados nos diversos ambientes em delineamento experimental que permita a estimativa da variação residual em cada ambiente, o modelo básico (2) para tratamento dos dados pode ser expresso, em linguagem estatística, por:

$$Y_{ij} = m + g_i + a_j + (ga)_{ij} + \bar{e}_{ij} \ , \qquad (3)$$

sendo Y_{ij} a média observada do caráter Y, do genótipo i no ambiente j; m a média geral; g_i o efeito do genótipo i; a_j o efeito do ambiente j; $(ga)_{ij}$ a interação do genótipo i com o ambiente j e $\bar{e}_{ij}$ o erro experimental médio associado à média Y_{ij}. Por este modelo a interação de genótipos com ambientes é definida como desvio do modelo que considera a expressão fenotípica como resultado da ação aditiva dos efeitos genotípico e ambiental sobre a média geral.

A forma básica de organização dos dados para análise da interação de genótipos com ambientes está representada na Tabela 2. Cada coluna da tabela representa as médias dos n tratamentos (genótipos) sobre r repetições, derivadas de um experimento em delineamento apropriado. Quando todos os genótipos são avaliados em todos os ambientes, com o mesmo número de repetições por experimento, diz-se que os dados

TABELA 1. Representação do valor fenotípico de dois genótipos em dois ambientes.

Genótipos	Ambientes		Média	Diferença ambiental
	A1	A2		
G1	a	c	(a + c)/2	a - c
G2	b	d	(b + d)/2	b - d
Média	(a + b)/2	(c + d)/2	(a + b + c + d)/4	(a + b - c - d)/2
Diferença genotípica	a - b	c - d	(a + c - b - d)/2	

são balanceados. Neste caso a análise de variância resultante da aplicação do modelo (3) se torna bastante simples, calculando-se os efeitos principais pelas marginais da tabela e a interação como desvios do modelo. O termo referente ao erro experimental $\bar{e}_{ij}$ é calculado para cada experimento, utilizando-se o erro médio na análise conjunta.

Para a resolução do modelo, pelo processo de quadrados mínimos, são impostas as restrições: $\sum_{i=1}^{n} g_i = 0$; $\sum_{j=1}^{m} a_j = 0$ e $\sum_{i=1}^{n} (ga)_{ij} = 0$, para cada j. As expressões para as estimativas dos efeitos são:

$$\hat{g}_i = \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{..} \; ; \; \hat{a}_j = \bar{Y}_{.j} - \bar{Y}_{..} \text{ e } \widehat{(ga)}_{ij} = Y_{ij} - \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{.j} + \bar{Y}_{..} \quad (4)$$

As somas de quadrados devido aos efeitos principais e interação são obtidas por:

$$SQ_{TOTAL} = \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=i}^{m} Y_{ij}^2 - nm\bar{Y}_{..}^2 \text{ , com nm – 1 graus de liberdade;}$$

$$SQ_G = m\sum_{i=1}^{n} \bar{Y}_{i.}^2 - nm\bar{Y}_{..}^2 \text{ , com n – 1 graus de liberdade;}$$

$$SQ_A = n\sum_{j=1}^{m} \bar{Y}_{.j}^2 - nm\bar{Y}_{..}^2 \text{ , com m – 1 graus de liberdade e;}$$

$$SQ_{GA} = SQ_{TOTAL} - SQ_G - SQ_A \text{ , com (n – 1)(m – 1) graus de liberdade.}$$

Os quadrados médios correspondentes são calculados dividindo-se cada soma de quadrados pelos respectivos graus de liberdade. O quadrado médio residual ou do erro é calculado pela média dos quadrados médios de cada experimento, quando os graus de liberdade do resíduo de cada experimento forem os mesmos. Caso contrário, deve-se ponderar cada quadrado médio pelos respectivos graus de liberdade, o que equivale a se fazer um somatório das somas de quadrados, dividindo-se pelo total de graus de liberdade. Para que o quadrado médio residual da análise conjunta represente uma estimativa não tendenciosa da variância residual média, há a exigência de homogeneidade dos quadrados médios residuais do experimento. Tal situação pode ser verificada por um teste de homogeneidade de variâncias como o teste de Bartlet

TABELA 2. Representação dos dados de n genótipos avaliados em m ambientes para um caráter genérico *Y*.

Genótipos	Ambientes							Média $\bar{Y}_{i.}$
	1	2	3	.	.	.	M	
1	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}	.	.	.	Y_{1m}	$\bar{Y}_{1.}$
2	Y_{21}	Y_{22}	Y_{23}	.	.	.	Y_{2m}	$\bar{Y}_{2.}$
3	Y_{31}	Y_{32}	Y_{33}	.	.	.	Y_{3m}	$\bar{Y}_{3.}$
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
n	Y_{n1}	Y_{n2}	Y_{n3}	.	.	.	Y_{nm}	$\bar{Y}_{n.}$
Média ($\bar{Y}_{.j}$)	$\bar{Y}_{.1}$	$\bar{Y}_{.2}$	$\bar{Y}_{.3}$	.	.	.	$\bar{Y}_{.m}$	$\bar{Y}_{..}$

(Steel & Torrie, 1960). Como regra prática, se a razão entre o maior e menor quadrados médios não exceder a 4, a análise conjunta pode ser feita sem qualquer restrição (Pimentel Gomes, 1985). Se houver heterogeneidade dos quadrados médios residuais, duas alternativas podem ser seguidas. A primeira seria descartar experimento(s) com quadrados médios residuais muito elevados, por representar uma situação de baixa precisão experimental. A segunda seria promover um ajuste nos graus de liberdade dos quadrados médios da interação e do resíduo da análise conjunta para se evitarem testes de hipóteses inválidos. Pimentel Gomes (1985) apresenta um procedimento para se fazer tal ajuste, pelo método de Cochran.

Uma vez calculado o quadrado médio residual da análise conjunta este deve ser dividido pelo número de repetições de cada experimento. Esta divisão se faz necessária pelo fato da análise conjunta ter sido feita a partir de médias dos tratamentos em cada ambiente, enquanto que na análise de variância de cada experimento se utilizam os totais de tratamentos nos cálculos das somas de quadrados.

Uma consideração importante a ser feita para realização do teste F e interpretação dos resultados da análise conjunta da variância, diz respeito à natureza fixa ou aleatória dos efeitos do modelo de análise. Um efeito é considerado aleatório quando se refere a uma amostra de uma população maior. Neste caso, os resultados obtidos a partir da amostra podem ser extrapolados para a população como um todo. Quando os fatores envolvidos na análise (genótipos e/ou ambientes, no caso) representam situações particulares bem definidas, os efeitos são considerados fixos e os resultados só se aplicam àquele conjunto específico. A natureza fixa ou aleatória da interação é determinada pelos efeitos principais. Se genótipos e ambientes são fixos, a interação será fixa. Se pelo menos um dos fatores for aleatório, a interação será aleatória.

Em um programa de melhoramento, diferentes situações se apresentam, dependendo da fase do programa e dos objetivos da avaliação de genótipos em diferentes ambientes. Em um programa de seleção recorrente, por exemplo, um conjunto de famílias ou progênies retirado da população base é testado com vistas à recombinação daquelas superiores para formação da população melhorada. Neste caso, há pouco interesse no desempenho de cada família em particular, mas sim no desempenho médio das famílias e variabilidade entre elas, o que vai determinar o desempenho da população melhorada. Estimativas de parâmetros obtidas da amostra, podem ser interpretadas como propriedades populacionais levando-se, por exemplo, à escolha de populações potencialmente superiores para seleção. Neste tipo de avaliação, mesmo que haja interesse no estudo da interação de genótipos com ambientes, razões de ordem prática, como o grande número de progênies a serem avaliadas e a quantidade limitada de sementes por progênie, limitam a avaliação em um grande número de ambientes. Assim, utilizam-se em geral, poucos ambientes com características definidas como tipo de solo, nível de tecnologia, épocas de plantio etc. Nesta situação, claramente os genótipos devem ser considerados como aleatórios e os ambientes como fixos.

Uma situação contrastante ocorre quando diferentes cultivares (variedades, híbridos, linhagens ou clones) são testadas na fase final de um programa de

melhoramento. Neste caso, cada genótipo (ou população) constitui uma entidade bem definida que se quer testar como tal. Por outro lado, para que se tenha maior segurança na recomendação, há a necessidade de que se conheça a resposta dos genótipos às inúmeras variações ambientais que podem ocorrer na região, ou seja, seu desempenho em uma população variável de ambientes. Desta forma, são constituídos os ensaios em rede, procurando-se amostrar as variações espaciais e temporais que ocorrem entre ambientes. Assim, na análise de ensaios em rede, consideram-se, em geral, os efeitos de genótipos como fixos e os efeitos de ambientes como aleatórios.

A consideração de que os efeitos de cultivares são fixos não traz qualquer controvérsia, uma vez que, nesta fase do programa, as propriedades genéticas da população estão definidas e a cultivar pode ser reproduzida segundo seu modo de propagação. Com relação aos ambientes, entretanto, a situação não é tão definitiva. As variações que ocorrem entre ambientes podem ser agrupadas em duas categorias, as previsíveis e as imprevisíveis (Allard & Bradshaw, 1964). Dos fatores previsíveis do ambiente podem-se citar o tipo de solo, as tecnologias aplicadas, a época de plantio, a latitude e altitude, entre outros. Os fatores imprevisíveis são representados, principalmente, pelas variações erráticas do clima, como quantidade e distribuição de chuvas, temperatura, ocorrência de geadas etc. Portanto, o efeito do ambiente representa, na realidade, um confundimento de efeitos de fatores fixos (previsíveis) e aleatórios (imprevisíveis).

O aproveitamento dos efeitos favoráveis da interação de genótipos com ambientes implica em que se tenha, para cada ambiente, o genótipo mais adaptado. Quanto mais previsível for o ambiente de uma lavoura, maior será a possibilidade de aproveitamento dos efeitos da interação. Um desafio, portanto, na avaliação de cultivares para recomendação, será o máximo de caracterização dos ambientes de teste para possibilitar o máximo de previsibilidade no ambiente de cada agricultor. Em outras palavras, seria ideal que os efeitos de ambientes pudessem ser tomados como fixos ou, pelo menos, que a porção fixa da interação pudesse ser medida e os resultados utilizados na recomendação de cultivares.

Exemplo 1. Análise conjunta de variância e medição dos efeitos da interação de genótipos com ambientes.

Na Tabela 3 estão apresentados dados de produtividade de grãos em toneladas por hectare, obtidos dos Ensaios Nacionais de Milho Precoce realizados na safra 1997/98 (Corrêa, 1998). Para simplificação e a título de exemplo, foram considerados apenas 12 cultivares de um total de 49, em dez localidades da Região Centro do Brasil. Por se tratarem de híbridos comerciais ou em fase de avaliação final de diferentes empresas, os nomes das cultivares foram omitidos e renumerados de 1 a 12. Das 12 cultivares, quatro são híbridos duplos (1 a 4), quatro híbridos triplos (5 a 8) e quatro híbridos simples (9 a 12). Os quadrados médios residuais por localidade foram calculados pelo coeficiente de variação experimental e média geral de cada ensaio, fazendo-se $QM_{R(j)} = (\bar{Y}_j \; CV_j/100)^2$, sendo $\bar{Y}_j$ e CV_j referentes às 49 cultivares do ensaio do ambiente j. O delineamento de cada ensaio corresponde a um látice simples 7x7, com duas repetições, portanto, a cada quadrado médio residual estão associados 36 graus de liberdade.

O primeiro passo para a análise conjunta consiste em se verificar a homogeneidade dos quadrados médios residuais. A razão entre o maior e menor QM_R é igual a 3,93 ($QM_{R(9)}/QM_{R(4)}$) estando abaixo do limite máximo recomendado por Pimentel Gomes (1985), o que permite testar a interação sem necessidade de correção de graus de liberdade.

As somas de quadrados são calculados por:

$$SQ_{TOTAL} = 3,82^2 + 7,34^2 + ... + 7,96^2 - 12 \times 10 \times 5,83875^2 = 422,7350$$

$$SQ_G = 10 \times (5,675^2 + 5,200^2 + ... + 6,260^2) - 4090,9202 = 28,1908$$

$$SQ_A = 12 \times (3,936^2 + 7,441^2 + ... + 7,339^2) - 4090,9202 = 323,1912$$

$$SQ_{GA} = 422,7350 - 28,1908 - 323,1912 = 71,3529$$

Os resultados da análise de variância com o teste de F, encontram-se na Tabela 4. O valor de F para a interação é calculado dividindo-se o quadrado médio da interação pelo quadrado médio residual, independentemente de serem fixos ou aleatórios os efeitos principais. Para o cálculo de valores de F para genótipos e para ambientes há que se considerar a natureza fixa ou aleatória dos efeitos, o que interfere na esperança dos quadrados médios. Cruz & Regazzi (1994) apresentam as esperanças de quadrados médios para diferentes situações. No presente exemplo, o efeito de genótipos foi considerado fixo e o de ambientes aleatório. Assim, o valor de F para

TABELA 3. Produção média de grãos (t ha^{-1}) de cultivares de milho precoce, na Região Centro, do Brasil (Corrêa, 1998)

Cultivar	Ambientes										Média ($\bar{Y}_{i.}$)	Efeito Genotípico ($\hat{g}_i$)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	3,82	7,34	3,85	8,35	4,42	4,30	6,27	6,19	5,57	6,64	5,675	-0,164
2	4,19	7,86	2,91	8,68	3,03	3,89	4,89	4,40	5,74	6,41	5,200	-0,639
3	3,73	4,94	6,00	7,50	3,78	3,96	4,45	6,46	5,00	7,15	5,297	-0,542
4	4,13	7,06	2,89	8,88	3,81	5,01	6,26	5,77	6,50	7,19	5,750	-0,089
5	3,32	6,46	2,55	8,81	3,19	4,03	5,75	4,75	6,50	5,25	5,061	-0,778
6	2,89	7,47	4,78	9,72	4,21	5,27	4,28	6,00	7,43	9,21	6,126	0,287
7	4,32	8,75	3,68	10,33	3,71	3,92	7,84	4,85	6,43	7,93	6,176	0,337
8	3,81	7,34	5,40	8,51	4,22	4,52	5,29	6,54	4,68	7,17	5,748	-0,091
9	4,86	8,70	5,62	10,22	5,21	5,06	6,28	5,37	6,34	8,34	6,600	0,761
10	3,04	5,29	5,56	9,08	4,53	4,10	7,00	5,10	6,02	6,70	5,642	-0,197
11	4,50	9,51	3,00	10,54	4,09	5,62	7,84	5,53	6,55	8,12	6,530	0,691
12	4,62	8,57	4,88	8,96	4,33	4,83	5,98	5,09	7,38	7,96	6,260	0,421
Média ($\bar{Y}_{.j}$)	3,936	7,441	4,260	9,132	4,044	4,542	6,011	5,504	6,178	7,339	5,83875	-
Efeito Ambiental ($\hat{a}_j$)	-1,903	1,062	-1,579	3,293	-1,795	-1,297	0,172	-0,335	0,339	1,500	-	-

TABELA 4. Análise conjunta da variância de dados de produção de grão (t ha^{-1}) de 12 cultivares de milho, em 10 localidades.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F[1/]
Genótipos (G)	11	28,1908	2,5628	10,473**
Ambientes (A)	9	323,1912	35,9101	146,752**
Interação (GxA)	99	71,3529	0,7207	2,945**
Resíduo médio/2	360	-	0,2447	-

[1/]Considerando efeitos de genótipos fixos e de ambientes aleatórios.
**significativo, pelo teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

genótipos foi calculado dividindo-se o quadrado médio respectivo pelo quadrado médio da interação. O valor de F para ambientes foi encontrado dividindo-se o valor do quadrado médio correspondente pelo quadrado médio residual. Na realidade, a esperança do quadrado médio de ambientes inclui um termo referente à variância de fatores de controle local dentro de cada experimento (efeitos de repetições e de blocos). Como a partir dos dados disponíveis não foi possível recuperar estas fontes de variação, o valor de F para ambientes, como calculado, pode estar superestimado. Na prática isto não traz maiores problemas porque o efeito de ambientes costuma ser alto levando a valores tão elevados de F, que raramente haverá dúvidas quanto à sua significância. No presente caso, por exemplo, a soma de quadrados para ambientes representa 77% da soma de quadrados total com apenas 7,6% dos graus de liberdade. O quadrado médio residual foi dividido por 2, o número de repetições de cada ensaio, conforme já exposto.

As estimativas dos efeitos principais de genótipos ($\hat{g}_i$) e ambientes ($\hat{a}_j$) estão apresentadas na última coluna e na última linha da Tabela 3, respectivamente. A soma de quadrados de genótipos equivale a $m\sum_{i=1}^{n}\hat{g}_i^2$ de forma que $m\hat{g}_i^2$ corresponde à contribuição do genótipo i para a soma de quadrados. Da mesma forma a soma de quadrados de ambientes corresponde a $n\sum_{j=1}^{m}\hat{a}_j^2$, sendo $n\hat{a}_j^2$ a contribuição do ambiente j para a soma de quadrados deste fator.

Como era de se esperar, a amplitude de variação das estimativas dos efeitos ambientais foi bem maior que aquela das estimativas dos efeitos genotípicos. Isto se deve ao fato de que a amostragem ambiental procura atingir ambientes extremos em termos de solo, clima, latitude etc. Por outro lado, os genótipos representam apenas os melhores saídos dos programas de melhoramento. Os piores genótipos não chegam a esta fase final de avaliação.

Verificando-se as estimativas dos efeitos genotípicos constata-se que os híbridos duplos (genótipos 1 a 4) apresentam, todos, valores negativos. Para os híbridos triplos (genótipos 5 a 8) ocorreram dois valores positivos e dois negativos. Já para os híbridos simples (genótipos 9 a 12) ocorreu apenas um valor negativo.

As estimativas dos efeitos da interação para cada combinação de genótipos com ambientes estão apresentadas na Tabela 5. Cada estimativa foi obtida tirando-se do valor observado Y_{ij} as estimativas dos efeitos principais, e da média geral a partir da Tabela 3 e expressão (4). Assim, por exemplo, o valor da interação da cultivar 1 no local 1 foi estimado por:

$$(\hat{ga})_{11} = 3,82 - (-0,164) - (-1,903) - 5,839 = 0,048 \text{ ou,}$$

$$(\hat{ga})_{11} = 3,82 - 5,675 - 3,936 + 5,839 = 0,048$$

TABELA 5. Estimativas dos efeitos da interação de genótipos com ambientes ($\hat{ga}$)$_{ij}$, relativas aos dados da Tabela 3.

	Ambiente									
Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,048	0,063	-0,246	-0,618	0,540	-0,079	0,423	0,850	-0,445	-0,535
2	0,893	1,058	-0,711	0,187	-0,375	-0,014	-0,482	-0,465	0,200	-0,290
3	0,336	-1,959	2,282	-1,090	0,278	-0,041	-1,019	1,498	-0,637	0,353
4	0,283	-0,292	-1,281	-0,163	-0,145	0,556	0,338	0,355	0,410	-0,060
5	0,162	-0,203	-0,932	0,456	-0,076	0,265	0,517	0,024	1,099	-1,311
6	-1,333	-0,258	0,233	0,301	-0,121	0,440	-2,018	0,209	0,964	1,584
7	0,047	0,972	-0,917	0,861	-0,671	-0,960	1,492	-0,991	-0,086	0,254
8	-0,035	-0,010	1,231	-0,531	0,267	0,068	-0,630	1,127	-1,408	-0,078
9	0,163	0,498	0,599	0,327	0,405	-0,244	-0,492	-0,895	-0,600	0,240
10	-0,699	-1,954	1,497	0,145	0,683	-0,246	1,186	-0,207	0,038	-0,442
11	-0,127	1,378	-1,951	0,717	-0,645	0,386	1,138	-0,665	-0,320	0,090
12	0,263	0,708	0,199	-0,593	-0,135	-0,134	-0,452	-0,835	0,780	0,200

Valores positivos e elevados de ($\hat{ga}$)$_{ij}$ indicam uma boa adaptação relativa da cultivar i ao ambiente j, enquanto que valores negativos indicam uma má adaptação relativa da cultivar ao ambiente.

4. AVALIAÇÃO E RECOMENDAÇÃO REGIONALIZADAS

Qualquer programa de melhoramento possui, em princípio, uma região de abrangência, definida em função de fatores geográficos, tecnológicos, comerciais etc. Assim, por exemplo, uma instituição estadual restringiria sua área de atuação aos limites geopolíticos do Estado, enquanto uma empresa privada definiria sua área de atuação em função das possibilidades de mercado e do seu porte.

Uma vez definida a região de abrangência do programa, são planejados os ensaios de avaliação para seleção em etapas intermediárias do programa e a rede de ensaios para avaliação final. Neste último caso, existem, muitas vezes, redes coordenadas por instituições oficiais e que recebem materiais para teste, de diferentes programas. Em qualquer caso, considerações a respeito da interação de genótipos com ambientes são essenciais na escolha dos locais de avaliação e na definição da estratégia de recomendação de cada cultivar, se generalizada ou particularizada por sub-regiões.

Em uma condição inicial, quando não se dispõem de estudos sobre a interação de genótipos com ambientes para uma dada espécie cultivada em uma dada região, a escolha dos locais de teste é feita considerando-se técnicas de amostragem e aspectos econômicos. Uma boa amostragem é aquela que considera o maior número possível de locais, escolhidos de forma a representar convenientemente as variações ambientais da região. Os aspectos econômicos e práticos, geralmente, limitam a amostragem ideal, por questões de custo e falta de estrutura de experimentação em alguns locais que seriam escolhidos. Uma vez estabelecida a rede de ensaios é fundamental que os ambientes sejam caracterizados o melhor possível com relação a fatores de solo, clima,

tecnologias etc., para facilitar a interpretação dos resultados e possibilitar maior segurança nas extrapolações destes. Uma vez colhidos os resultados dos ensaios em rede, estes podem ser usados tanto na avaliação das cultivares, o que é função primeira dos ensaios, quanto para o planejamento dos ensaios futuros, principalmente quanto à escolha de locais de avaliação.

Feita a análise conjunta dos ensaios, conforme mostrado no Exemplo 1, caso não haja significância para a interação de genótipos com ambientes, a situação se tornaria simples. A recomendação de cultivares seria feita, apenas com base na média geral e o número de ensaios de avaliação poderia ser diminuído nas avaliações posteriores. Esta situação, no entanto, dificilmente ocorre, pelo menos para as grandes culturas.

Na presença de interação significativa, a primeira questão que geralmente ocorre é: a recomendação de cultivares deve ser generalizada, isto é, a(s) mesma(s) cultivar(es) para toda a região ou devem-se buscar recomendações particularizadas para ambientes ou sub-regiões? Neste último caso, como? A resposta a estas questões não é simples e diferentes alternativas de métodos de análise têm sido propostas para tentar esclarecê-la.

Uma primeira abordagem, bastante simples, que se poderia fazer sobre a questão levantada, diz respeito ao "prejuízo" ou perda de eficiência que se teria com a recomendação generalizada em relação àquela particularizada. Tomemos novamente, como exemplo, os dados da Tabela 3. As situações mais extremas seriam aquelas de: a) recomendar apenas uma cultivar para todos os ambientes com base na média geral ou; b) recomendar a melhor cultivar de cada ambiente. Esta última alternativa, embora inviável na prática, representa o referencial teórico se pudéssemos aproveitar totalmente os efeitos da interação. A cultivar mais produtiva na média dos dez ambientes foi a cultivar 9, com 6,600 t ha^{-1}. Tomando-se o maior valor em cada ambiente, e calculando-se a média obtém-se um valor de 7,276 t ha^{-1}. Dividindo-se o primeiro valor pelo segundo obtêm-se a eficiência relativa da recomendação generalizada, ou seja f = (6,600/7,276) = 0,907, mostrando que para toda a região a recomendação generalizada traria uma perda de produtividade de cerca de 10%, em relação à recomendação ideal. Se se observar pelo lado do agricultor, por outro lado, nota-se que em algumas situações, aqui representadas pelos ambientes 1 ou 5, não há qualquer perda, uma vez que a melhor cultivar naqueles ambientes coincidiu com a de maior média geral. Já no local 7, a perda seria de 20%, em relação a melhor cultivar naquele ambiente. A mesma abordagem poderia ser feita considerando duas ou mais cultivares a serem recomendadas.

Feita esta primeira análise se a perda representada pela recomendação generalizada for pequena o melhorista poderá optar por este tipo de recomendação, mesmo se a interação for significativa. Deve-se ressaltar que uma interação significativa não implica, necessariamente, em valores de interação de alta magnitude. A significância pelo teste F revela, apenas, que se tem razoável grau de certeza que a variância dos efeitos da interação não é nula.

Caso a recomendação generalizada represente uma perda considerável na eficiência da recomendação, uma abordagem que pode ser tentada diz respeito à regionalização da recomendação. O objetivo, neste tipo de abordagem, seria o de se

determinar sub-regiões, relativamente homogêneas quanto à interação, passando a recomendação e, conseqüentemente, os esforços do melhoramento, a serem dirigidos para cada sub-região. Para que este objetivo seja alcançado é necessário que o agrupamento de ambientes mais homogêneos leve a conjuntos identificáveis em função de fatores previsíveis do ambiente como região geográfica, latitude, altitude, tipo de solo etc. Caso isso não ocorra o agrupamento representará, apenas, uma situação passada, sem possibilidade de utilização em planejamentos futuros.

Para a realização do zoneamento ecológico ou estratificação de ambientes, utilizam-se os próprios dados derivados dos ensaios de avaliação de cultivares nos diferentes ambientes. O pressuposto básico para este procedimento é o de que as diferenças entre ambientes não são totalmente aleatórias nem totalmente sistemáticas. Busca-se, então, determinar a estrutura desta variação, distribuindo-a entre e dentro das regiões.

O primeiro passo para a análise consiste em se medir a similaridade (ou dissimilaridade) entre ambientes, baseando-se na interação provocada com os genótipos. Horner & Frey (1957) foram os primeiros a propor um estudo desta natureza e utilizaram como medida da dissimilaridade entre locais o quadrado médio da interação de cultivares com ambientes da análise conjunta de variância dos locais, dois a dois. Brasil (1990) comparou alguns métodos de determinação da dissimilaridade entre locais, com base em ensaios de cultivares de milho. Em geral, as diferentes medidas levaram a classificações semelhantes das diferenças entre locais.

Após se determinar a matriz de distâncias entre os ambientes, o próximo passo consiste em uma análise de agrupamento, juntando-se por etapas, os locais mais similares, para formar sub-regiões mais homogêneas. Cruz & Regazzi (1994) mostram, com exemplo numérico, os passos necessários para a estratificação de ambientes ou zoneamento ecológico.

Uma vez obtido um padrão de regionalização, os resultados devem ser confrontados com fatores previsíveis do ambiente, como região geográfica, tipo de solo, altitude, latitude etc. A validação da regionalização obtida pode ser aferida comparando-se resultados de diferentes anos, para uma mesma amostragem de locais. Caso o padrão de agrupamento seja consistente entre anos, há uma maior segurança em se proceder à recomendação com base na regionalização obtida.

Alguns estudos têm mostrado uma dificuldade de se obterem regionalizações consistentes a partir da análise de agrupamento baseada na interação de genótipos com ambientes, particularmente, nas regiões tropicais (Brasil, 1990). Esta inconsistência se deve, provavelmente, a uma prevalência de fatores não previsíveis ou não controlados, na determinação das diferenças entre locais, havendo, muitas vezes, um confundimento de efeitos de locais e de épocas de plantio (Paterniani, 1986). A interação tripla de genótipos com locais e anos pode ser uma outra causa da inconsistência nas regionalizações em diferentes anos. A possibilidade de sucesso em estudos de zoneamento ecológico, portanto, está na dependência de uma caracterização, o mais completa possível, dos ambientes dos ensaios, controlando o máximo de fatores. Em outras palavras, trata-se de tornar os efeitos de ambientes mais fixos e menos aleatórios.

Mesmo que o padrão de agrupamento de ambientes não permita uma segurança na recomendação regionalizada de cultivares, o estudo da similaridade entre locais pode ser muito útil em futuras avaliações. Assim, caso ocorram pares de locais consistentemente similares quanto à interação, um deles poderia ser eliminado dos testes posteriores, permitindo incluir outros locais em regiões menos cobertas na amostragem. Este tipo de abordagem é referido como escolha de locais chave para avaliação de cultivares.

5. ADAPTABILIDADE E ESTABILIDADE FENOTÍPICAS

Os estudos de adaptabilidade e estabilidade fenotípicas, para fins de melhoramento, se referem à avaliação da resposta diferencial dos genótipos à variação das condições de ambiente. A maioria dos métodos utiliza técnicas de regressão, medindo a variação da produtividade ou qualquer outro caráter quantitativo, em relação a um índice ambiental. A diferenciação entre métodos se dá pelo modelo de regressão utilizado, pela forma de interpretação dos parâmetros do modelo e maneira de se determinar o índice ambiental. Uma outra abordagem em estudos de estabilidade fenotípica seria a avaliação da contribuição de cada genótipo para a interação total.

5.1 REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Pode-se verificar na Figura 2 que, para a situação simples de apenas dois ambientes, a ausência de interação é caracterizada por um paralelismo das retas que contêm os pontos referentes aos valores dos genótipos. Com mais de dois ambientes, seria necessário ajustar uma reta que melhor representasse os pontos observados. Para isto há a necessidade de que a qualidade dos ambientes seja quantificada. Ajustando-se uma reta por regressão linear, a soma de quadrados dos desvios dos valores observados em relação aos estimados pela equação da reta será minimizada. Desta forma, a interação de genótipos com ambientes se manifestará como uma heterogeneidade nos coeficientes de regressão de cada genótipo, na suposição de que as retas representam convenientemente a variação dos dados.

A utilização da técnica de regressão linear para estudo da resposta de cultivares à variação ambiental remonta ao trabalho de Yates & Cochram (1938). Neste trabalho os autores utilizam como medida da qualidade ambiental a produtividade média de todos os genótipos naquele ambiente, ajustando-se uma reta de regressão das produtividades de cada genótipo em relação a estas médias, tomadas como variável independente.

Finlay & Wilkinson (1963) relacionaram o coeficiente de regressão linear de produtividade de cada genótipo sobre a média geral dos genótipos em cada ambiente, com os conceitos de adaptabilidade e estabilidade fenotípica. Em seu estudo com 277 variedades de cevada em sete ambientes (locais e anos) os autores analisaram os dados em uma escala logarítmica, com a finalidade de induzir uma maior linearidade de resposta das produtividades de cada genótipo, além de aumentar a homogeneidade do erro experimental. Para definir a estabilidade e adaptabilidade de cada genótipo, por este método, são considerados, conjuntamente, a média e o coeficiente de regressão linear. Coeficiente de regressão próximo de 1,0 indica estabilidade média. Quando associado com alto rendimento, caracteriza um genótipo com adaptabilidade geral.

Se associado com baixo rendimento, o genótipo é mal adaptado a todos os ambientes. Genótipos com valores significativamente maiores que 1,0 são especificamente adaptados a ambientes favoráveis e são pouco estáveis, enquanto que aqueles com valores significativamente menores que 1,0 são mais estáveis e se adaptam especificamente a ambientes desfavoráveis. Por este conceito de estabilidade fenotípica, um genótipo completamente estável seria caracterizado por um coeficiente de regressão igual a zero, o que foi posteriormente classificado por Becker (1981) como estabilidade no sentido biológico, ou seja, o genótipo seria insensível à variação ambiental.

Eberhart & Russell (1966) propuseram um modelo de regressão linear para estudo da estabilidade fenotípica de cultivares que se tornou o mais amplamente utilizado, em todo o mundo, neste tipo de estudo. Neste modelo, além da média geral e do coeficiente de regressão linear de cada genótipo, foi considerado como parâmetro de estabilidade a variância dos desvios da regressão de cada genótipo. Este tipo de abordagem foi classificado por Becker (1981) como estabilidade no sentido agronômico.

Os parâmetros para estudo de estabilidade fenotípica pelo método de Eberhart & Russell (1966) são definidos pelo modelo:

$$Y_{ij} = \mu_i + \beta_i I_j + \delta_{ij} \qquad (5)$$

sendo Y_{ij} a média do genótipo i, no ambiente j; μ_i a média do genótipo i em todos os ambientes; β_i o coeficiente de regressão que mede a resposta do genótipo i à variação ambiental; I_j o índice ambiental e δ_{ij} o desvio da regressão do genótipo i, no ambiente j. O índice ambiental é calculado pelo desvio da média de todos os genótipos naquele ambiente, em relação à média geral, isto é: $I_j = \bar{Y}_j - \bar{Y}$

Relacionando-se o modelo (5) com o modelo geral para estudo da interação (3), verifica-se que o índice ambiental I_j corresponde à estimativa do efeito ambiental, ou seja, $I_j = \hat{a}_j$. Fazendo $\beta = 1 + \alpha_i$ e considerando que $\mu_i = m + g_i$ o modelo (5) pode ser reescrito como:

$$Y_{ij} = m + g_i + a_j + \alpha_i a_j + \delta_{ij} + \bar{e}_{ij}$$

incluindo-se o termo relativo ao erro experimental médio. Verifica-se, portanto, que o termo relativo à interação $(ga)_{ij}$ fica subdividido em duas parcelas, uma $(\alpha_i a_j)$ relativa à regressão linear sobre o efeito ambiental e outra (δ_{ij}) relativa aos desvios da regressão.

As estimativas dos parâmetros do modelo de Eberhart & Russell (1966) são obtidas para m ambientes por:

$$\hat{\mu}_i = \bar{Y}_{i.} \; ; \; \hat{\beta}_i = b_i = \sum_j Y_{ij} I_j \Big/ \sum_j I_j^2 \quad \text{e} \quad s_{di}^2 = QM_{di} - QM_R / r$$

sendo QM_R o quadrado médio residual da análise conjunta da variância, r no número de repetições de cada experimento e QM_{di} o quadrado médio dos desvios da regressão para o genótipo i calculado por:

$$QM_{di} = \frac{1}{m-2}\left[\left(\sum_j Y_{ij}^2 - Y_{i.}^2 / m\right) - \left(\sum_j Y_{ij} I_j\right)^2 / \sum_j I_j^2\right] \text{, com } m-2 \text{ graus de}$$

liberdade.

Em termos de análise de variância, o modelo (5) permite a partição da soma de quadrados dos efeitos conjuntos de ambientes e da interação com $n(m-1)$ graus de liberdade em suas partes relativas aos efeitos de regressão linear e desvios da regressão, para cada genótipo ou cultivar.

Três tipos de comparações estatísticas são relevantes pelo modelo de regressão linear. A comparação entre médias, correspondente à hipótese de nulidade (H_0: $\mu_1 = \mu_2 = ... = \mu_n$) pode ser feita por um teste de comparações múltiplas, como o teste de Tuckey, por exemplo. A diferença de resposta de um dado genótipo, em relação à média dos genótipos (H_0: $\beta_i = 1,0$) pode ser avaliada por um teste t calculado por:

$$t_i = (b_i - 1,0)/s_{bi}, \text{ sendo } s_{bi} = (QM_R / r \sum_j I_j^2)^{1/2}, \text{ (Cruz \& Regazzi, 1994).}$$

O número de graus de liberdade para o teste t é aquele do quadrado médio residual da análise conjunta da variância.

A hipótese $s_{di}^2 = 0$ pode ser testada por um teste F, dividindo-se o quadrado médio dos desvios da regressão pelo quadrado médio do resíduo de análise conjunta de variância, este último, dividido pelo número de repetições (r), ou seja, $F_i = rQM_{di} / QM_R$.

Os testes de t e F, assim efetuados são apenas aproximados, pelo fato de o índice ambiental I_j ser estimado dos próprios dados e conter um erro de estimação. Vários estudos têm mostrado, no entanto, que para um número elevado de genótipos, o erro nos testes pode ser negligenciado.

Para escolha dos melhores genótipos ou cultivares por este método considera-se, em primeiro lugar, a média geral. Dentre aqueles de médias adequadas, são considerados os demais parâmetros. O coeficiente de regressão linear (β_i) define a adaptabilidade do genótipo. Assim, genótipos com b_i significativamente superiores à unidade são considerados responsivos e especificamente adaptados a ambientes favoráveis. Aqueles com b_i inferiores estatisticamente à unidade são considerados mais rústicos, ou especificamente adaptados a ambientes desfavoráveis ou de estresse. Genótipos com b_i que não diferem estatisticamente de 1,0 apresentam resposta média à variação ambiental e são mais adaptados a ambientes médios. Como a maior parte das condições de cultivo estão próximas das condições médias, costuma-se considerar que estes genótipos apresentam uma adaptabilidade mais geral.

A variância dos desvios da regressão (s_{di}^2) define a estabilidade de resposta do genótipo. Aqueles genótipos com valores que não diferem de zero são considerados com alta previsibilidade de resposta e, portanto, com maior estabilidade, no sentido agronômico. Valores de (s_{di}^2) significativamente diferentes de zero indicam que a regressão linear não representa, satisfatoriamente, a variação daquele genótipo nos diferentes ambientes, não permitindo uma boa previsibilidade de resposta do genótipo pelo modelo de Eberhart & Russell (1966).

A contribuição relativa da regressão linear e dos desvios da regressão para a variação dos dados de cada genótipo, nos diferentes ambientes, pode ser aferida pelo coeficiente de determinação do modelo (R^2) dividindo-se a soma de quadrados da regressão linear pela soma de quadrados total daquele genótipo. A contribuição dos desvios da regressão corresponde a $1 - R^2$. A utilização do coeficiente de determinação como parâmetro de estabilidade deve, contudo, ser evitada, uma vez que estes valores apresentam uma correlação intrínseca com os valores de b_i conforme demonstrado

por Duarte & Zimmerman (1995). Valores elevados de R^2 estão, geralmente, associados a genótipos responsivos.

Exemplo 2. Análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípicas pelo modelo de repressão linear de Eberhart & Russell (1966).

Considerem-se, novamente, os dados da Tabela 3. Os índices ambientais são calculados pela diferença da média de cada ambiente, em relação à média geral. Para o ambiente 1 temos:

$$I_1 = 3{,}9358 - 5{,}83875 = -1{,}90295$$

Na Tabela 6 encontram-se os índices ambientais assim calculados, com aproximação para três casas decimais.

Para o genótipo 1, os parâmetros do modelo, somas de quadrados e quadrados médios de interesse, são assim calculados:

a) Média:

$$\hat{\mu}_i = \bar{Y}_{1.} = 5{,}675$$

b) Coeficiente de regressão linear:

$$b_1 = [3{,}82 \times (-1{,}903) + 7{,}34 \times 1{,}602 + \ldots + 6{,}64 \times 1{,}500]/26{,}9338$$

$$b_1 = 0{,}8635$$

c) Soma de quadrados total (ambientes/genótipo 1):

$$SQ_{a/g1} = 3{,}82^2 + 7{,}34^2 + \ldots + 6{,}64^2 - (3{,}82 + 7{,}34 + \ldots + 6{,}64)^2 / 10$$

$SQ_{a/g1} = 21{,}7267$, com $m - 1 = 9$ graus de liberdade.

d) Soma de quadrados da regressão linear:

$$SQ_{RLi} = (\Sigma_j Y_{ij} I_j)^2 / \Sigma_j I_j^2$$

$$SQ_{RL1} = [3{,}82 \times (-1{,}903) + 7{,}34 \times 1{,}602 + \ldots + 6{,}64 \times 1{,}500]^2/26{,}9338$$

$SQ_{RL1} = 20{,}0847$, com 1 grau de liberdade.

e) Soma de quadrados e quadrado médio dos desvios de regressão:

$$SQ_{di} = SQ_{a/gi} - SQ_{RLi}$$

$SQ_{d1} = 21{,}7267 - 20{,}0847 = 1{,}6420$, com 8 graus de liberdade.

$QM_{d1} = 1{,}6420/8 = 0{,}2052$

f) Variância dos desvios da regressão:

$s^2_{d1} = 0{,}2052 - 0{,}2447$ (vide Tabela 4)

$s^2_{d1} = -0{,}0395$

O teste de *t* para comparação do valor do coeficiente de regressão linear em relação à unidade resulta em:

$t = (0,8635 - 1,0)/0,0953$

$t = -1,432$ com 360 graus de liberdade, sendo a diferença não significativa.

O teste F para a variância dos desvios da regressão é:

$F = (0,2052/0,2447) = 0,839$, não significativo

O coeficiente de determinação do modelo é dado por:

$$R_i^2 = SQ_{RLi} / SQ_{Ai}$$

Portanto, para o genótipo 1:

$R_1^2 = (20,0847/21,7267) = 0,9244$ ou 92,44%

Este valor corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação entre os valores observados e aqueles estimados pelo modelo. A proporção da variação correspondente dos desvios da regressão, também chamado de coeficiente de não-determinação é dado por $1 - R^2 = 0,0756$ ou 7,56%.

Os valores dos parâmetros do modelo linear para todos os genótipos estão apresentados na Tabela 7. Dos 12 híbridos, apenas quatro apresentaram coeficientes de regressão estatisticamente diferentes de 1,0, sendo dois especificamente adaptados a ambientes desfavoráveis (genótipos 3 e 8) e dois especificamente adaptados a ambientes favoráveis (genótipos 7 e 11). Os quatro mostraram variâncias dos desvios de regressão significativas, indicando baixa estabilidade de resposta, o que implica em se interpretar com reserva sua adaptabilidade. A cultivar 7, apesar de apresentar um valor de s_{di}^2 significativo a 5% de probabilidade, mostrou um coeficiente de não determinação relativamente baixo (7,79%) e poderia ser recomendada para ambientes favorecidos, já que possui, também, uma boa produtividade média. Das cultivares com adaptabilidade média (ou geral) destaca-se a cultivar 9, com a maior média de produtividade, coeficiente de regressão próximo de 1,0 e variância dos desvios da regressão não significativa, encaixando-se no conceito de cultivar ideal segundo Eberhart & Russell (1966). A cultivar 12 se aproxima, também, deste conceito.

TABELA 6. Índices ambientais para utilização nos modelos linear, linear segmentado e quadrático.

Ambientes	I_j	T_j	I_j'
1- Barreiras	-1,903	0	3,6214
2- Goianésia	1,602	1,602	2,5664
3- Itumbiara	-1,579	0	2,4932
4- Rio Verde	3,293	3,293	10,8438
5- Ponta [illegible]	-1,795	0	3,2220
6- S. G. do Oeste	-1,296	0	1,6796
7- Sidrolândia	0,172	0,172	0,0296
8- Capinópolis	-0,335	0	0,1122
9- Inhauma	0,340	0,340	0,1156
10- Uberlândia	1,500	1,500	2,2500
Total	-0,001	6,907	26,9338

TABELA 7. Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão linear relativos aos dados da Tabela 3.

Genótipo	Média (t ha^{-1})	b_i	s^2_{di}	1 - R^2 (%)
1	5,675	0,8635	-0,0395	7,56
2	5,200	1,0791	0,1307	8,74
3	5,297	0,5627**	0,8908**	51,58
4	5,750	1,0003	0,0773	8,73
5	5,061	1,0230	0,3057*	13,51
6	6,126	1,1738	0,8725**	19,41
7	6,176	1,3394**	0,2653*	7,79
8	5,748	0,8036*	0,3164*	20,51
9	6,600	1,0215	0,0567	7,90
10	5,642	0,8155	0,7334**	30,40
11	6,530	1,3339**	0,4612**	10,54
12	6,260	0,9833	0,0730	8,89

*, ** - significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t (H_0:b_i = 1,0) ou F (H_0: s^2_{di} = 0).

Pelo fato da variância dos desvios da regressão ser estimada pela diferença entre quadrados médios, podem ocorrer, ocasionalmente, estimativas negativas. É o que aconteceu com a cultivar 1, no exemplo da Tabela 7. Atribui-se este fato, a erros aleatórios de estimação, podendo-se considerar o valor negativo como zero.

Vale ressaltar que quaisquer conclusões a respeito da estabilidade e adaptabilidade fenotípicas são relativas ao grupo de cultivares sob análise, uma vez que os índices ambientais são estimados a partir do desempenho daquele grupo específico.

5.2 REGRESSÃO LINEAR SEGMENTADA

O método de Eberhart & Russell (1966) pode ser considerado conservador, em termos de seleção para adaptabilidade e estabilidade fenotípicas, uma vez que são favorecidos os genótipos com desempenho médio, em relação ao conjunto analisado.

Verma *et al.* (1978) consideram que um genótipo ideal seria aquele com alta resposta à melhoria das condições ambientais e, ao mesmo tempo, tolerante às condições de ambientes desfavoráveis. Para a identificação de um tal genótipo, os autores propuseram o ajuste de dois segmentos de reta, um relativo aos ambientes desfavoráveis e outro relativo aos ambientes favoráveis. Uma cultivar ideal seria aquela com coeficiente de regressão significativamente inferior a 1,0 no primeiro segmento e significativamente superior a 1,0 no segundo segmento. O ponto de segmentação seria aquele correspondente ao índice ambiental médio ($I_j = 0$).

Silva & Barreto (1985) propuseram um modelo de análise que considera, simultaneamente, os dois segmentos, ou seja:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} I_j + \beta_{2i} T_j + \delta_{ij} \qquad (6)$$

O índice ambiental I_j é definido da mesma forma que no modelo de Eberhart & Russel (1966). O índice T_j é definido como $T_j = 0$, se $I_j \leq 0$ e $T_j = I_j$, se $I_j > 0$. O parâmetro β_{0i} corresponde ao valor esperado da variável Y no ambiente médio

($I_j = 0$); β_{1i} corresponde ao coeficiente de regressão linear do primeiro segmento e mede a resposta do genótipo i, nos ambientes desfavoráveis; β_{2i} mede a diferença de resposta do genótipo nos dois conjuntos de ambientes, sendo a inclinação do segundo segmento medida por $\beta_{1i} + \beta_{2i}$. Os desvios do modelo são medidos por δ_{ij}.

Pelo modelo bissegmentado é considerado como genótipo ideal aquele com alta média geral, $\beta_1 < 1{,}0$ e $\beta_1 + \beta_2 > 1{,}0$.

Os parâmetros do modelo são estimados por:

$$\hat{\beta}_{0i} = \frac{1}{D}[Y_{i.}\sum_j T_j^2(\sum_j I_j^2 - \sum_j T_j^2) - T_{..}(\sum_j Y_{ij}T_j \sum_j I_j^2 - \sum_j Y_{ij}I_j \sum_j T_j^2)];$$

$$\hat{\beta}_{1i} = \frac{1}{D}[m\sum_j T_j^2(\sum_j Y_{ij}I_j - \sum_j Y_{ij}T_j) + T_{..}(Y_{i.}\sum_j T_j^2 - T_{..}\sum_j Y_{ij}I_j)];$$

$$\hat{\beta}_{2i} = \frac{1}{D}[\sum_j I_j^2(m\sum_j Y_{ij}T_j - Y_{i.}T_{..}) - m\sum_j Y_{ij}I_j \sum_j T_j^2]; \text{ sendo,}$$

$$D = m\sum_j T_j^2(\sum_j I_j^2 - \sum_j T_j^2) - T_{..}^2 \sum_j I_j^2$$

Neste caso os testes de hipótese mais relevantes, com relação aos parâmetros de adaptabilidade são:

H_0: $\beta_{1i} = 1{,}0$, testada por ; $t = (\hat{\beta}_{1i} - 1{,}0)/s_{\beta 1}$;

H_0: $\beta_{2i} = 0$, testada por ; $t = \hat{\beta}_{2i} / s_{\beta 2}$;

H_0: $\beta_{1i} + \beta_{2i} = 1{,}0$, testada por ; $t = (\hat{\beta}_{1i} + \hat{\beta}_{2i} - 1{,}0)/s_{(\beta 1+\beta 2)}$ sendo,

$$s_{\beta 1} = \left[(m(\sum_j T_j^2 - T_{..}^2)\frac{QM_R}{rD}\right]^{1/2}$$

$$s_{\beta 2} = \left[m(\sum_j I_j^2)\frac{QM_R}{rD}\right]^{1/2} \text{ e}$$

$$s_{(\beta 1+\beta 2)} = \left\{[m(\sum_j I_j^2 - \sum_j T_j^2) - T_{..}^2]\frac{QM_R}{rD}\right\}^{1/2}.$$

A significância da variância dos desvios de regressão pode ser verificada pelo teste F, como no modelo linear. A soma de quadrados dos desvios do modelo é dada por:

$SQ_{di} = \sum_j Y_{ij}^2 - (\hat{\beta}_{0i} Y_{i.} + \hat{\beta}_{1i} \sum_j Y_{ij} I_j + \hat{\beta}_{2i} \sum_j Y_{ij} T_j)$, com $m - 3$ graus de liberdade.

O coeficiente de determinação do modelo é dado por:

$R_i^2 = 1 - SQ_{di} / SQ_{a/gi}$

As fórmulas de estimação apresentadas são obtidas pelo processo de quadrados mínimos. Em notação matricial a estimação dos parâmetros se dá por:

$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}(X'Y)$, sendo,

$$\beta = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \end{bmatrix}$$

$$X = \begin{bmatrix} 1 & I_1 & T_1 \\ 1 & I_2 & T_2 \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & I_m & T_m \end{bmatrix}$$ a matriz informação e,

$$Y = \begin{bmatrix} Y_{i1} \\ Y_{i2} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ Y_{im} \end{bmatrix}$$ o vetor de dados observados da variável Y no genótipo i.

X' é a matriz transposta de X e $(X'X)^{-1}$ a inversa de $X'X$. As variâncias associadas às estimativas são obtidas diretamente da matriz $(X'X)^{-1}$, multiplicando-se o elemento correspondente pela variância residual (QM_R/r). Extraindo-se a raiz quadrada, encontram-se os erros padrão correspondentes.

A soma de quadrados do modelo, incluindo o efeito da constante β_0, é dada por $SQ_{LS} = \hat{\beta}'X'Y$, com 3 graus de liberdade e a soma de quadrados dos desvios por $SQ_{di} = Y'Y - \hat{\beta}'X'Y$.

Exemplo 3. Análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípicas pelo modelo de regressão linear bissegmentada de Silva & Barreto (1985).

Considere-se, para exemplo, a cultivar 9 da Tabela 3 e os índices I_j e T_j da Tabela 6. O vetor Y e matriz X correspondentes são:

$$Y = \begin{bmatrix} 4{,}86 \\ 8{,}70 \\ 5{,}62 \\ 10{,}22 \\ 5{,}21 \\ 5{,}06 \\ 6{,}28 \\ 5{,}37 \\ 6{,}34 \\ 8{,}34 \end{bmatrix} \qquad X = \begin{bmatrix} 1 & -1{,}903 & 0 \\ 1 & 1{,}602 & 1{,}602 \\ 1 & -1{,}579 & 0 \\ 1 & 3{,}293 & 3{,}293 \\ 1 & -1{,}795 & 0 \\ 1 & -1{,}296 & 0 \\ 1 & 0{,}172 & 0{,}172 \\ 1 & -0{,}335 & 0 \\ 1 & 0{,}340 & 0{,}340 \\ 1 & 1{,}500 & 1{,}500 \end{bmatrix};$$

A matriz $X'X$ resultante é:

$$X'X = \begin{bmatrix} m & 0 & T_{.} \\ 0 & \sum_j I_j^2 & \sum_j T_j^2 \\ T_{.} & \sum_j T_j^2 & \sum_j T_j^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 10 & 0 & 6{,}907 \\ 0 & 26{,}934 & 15{,}805 \\ 6{,}907 & 15{,}805 & 15{,}805 \end{bmatrix} \text{ e}$$

$$(X'X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0{,}3711 & 0{,}2303 & -0{,}3925 \\ 0{,}2303 & 0{,}2328 & -0{,}3334 \\ -0{,}3925 & -0{,}3334 & 0{,}5682 \end{bmatrix}.$$

O vetor $X'Y$ correspondente é:

$$X'Y = \begin{bmatrix} Y_{i.} \\ \sum_j Y_{ij} I_j \\ \sum_j Y_{ij} T_j \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 66{,}0 \\ 27{,}5064 \\ 63{,}3376 \end{bmatrix}$$

O vetor das estimativas dos parâmetros é, portanto:

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 5{,}9673 \\ 0{,}4865 \\ 0{,}9128 \end{bmatrix}, \text{ ou seja, } \hat{\beta}_{0(9)} = 5{,}9673;\ \hat{\beta}_{1(19)} = 0{,}4865;\ \hat{\beta}_{2(9)} = 0{,}9128 \text{ e } \hat{\beta}_{1(9)} + \hat{\beta}_{2(9)} = 1{,}3993$$

As variâncias e erros-padrão das estimativas são:

$$V_{\hat{\beta}0} = 0{,}3711 \times 0{,}2447 = 0{,}0908 \Leftrightarrow s_{\hat{\beta}0} = 0{,}3013$$

$$V_{\hat{\beta}1} = 0{,}2328 \times 0{,}2447 = 0{,}0570 \Leftrightarrow s_{\hat{\beta}1} = 0{,}2387$$

$$V_{\hat{\beta}2} = 0{,}5682 \times 0{,}2447 = 0{,}1317 \Leftrightarrow s_{\hat{\beta}2} = 0{,}3629$$

$$V_{(\hat{\beta}1+\hat{\beta}2)} = V_{\hat{\beta}1} + V_{\hat{\beta}2} + 2COV_{\hat{\beta}1;\,\hat{\beta}2} = [0{,}2328 + 0{,}5682 + 2 \times (-0{,}3334)] \times 0{,}2447$$

$$V_{(\hat{\beta}1+\hat{\beta}2)} = 0{,}0328 \Leftrightarrow s_{(\hat{\beta}1+\hat{\beta}2)} = 0{,}1812$$

O teste de t para $\hat{\beta}_{1(9)}$ em relação à unidade é:

$t = (0{,}4865 - 1{,}0)/0{,}2387 = -2{,}1512$, com 360 graus de liberdade, sendo significativo a 5% de probabilidade. Pode-se, portanto, afirmar que a resposta da cultivar 9 aos ambientes desfavoráveis é significativamente menor que a média das cultivares, o que a torna bem adaptada a este conjunto de ambientes.

O teste para existência de uma segmentação na resposta é dado pela significância de $\hat{\beta}_{2(9)}$ (H_0:$\beta_{2(9)} = 0$),

t = 0,9128/0,3629=2,5153, com 360 graus de liberdade, sendo significativo a 5% de probabilidade. Portanto a inclinação do segundo segmento é significativamente maior que a do primeiro segmento.

A diferença de resposta aos ambientes favoráveis, em relação à média das cultivares é testada pelas diferenças de em relação à unidade, ou seja:

t =(1,3993 – 1,0)/0,1812 = 2,2036, também significativo a 5% de probabilidade.

A soma de quadrados do modelo é dada por:

$$SQ_{LS(9)} = [5,9673 \quad 0,4865 \quad 0,9128] \times \begin{bmatrix} 66,0 \\ 27,5064 \\ 63,3376 \end{bmatrix} = 465,0382,$$ com 3 graus de liberdade. A soma de quadrados dos desvios é:

$SQ_{d(9)} = (4,86^2 + 8,70^2 + ... + 8,34^2) – 465,0382 = 1,0784$ com 7 graus de liberdade. Portanto,

$QM_{d(9)}$ = 1,0784/7 = 0,1541, não significativo pelo teste F, em relação ao quadrado médio residual da análise conjunta.

Com estes resultados pode-se afirmar que a cultivar 9 se enquadra dentro do conceito de genótipo ideal, por esta metodologia, por possuir alta média (6,60 t ha^{-1}), coeficiente de regressão menor que 1,0 no primeiro segmento e maior que 1,0 no segundo segmento, além de desvios da regressão não significativos.

O coeficiente de determinação do modelo é:

$R_9^2 = 1 – SQ_{d9}/SQ_{dg9}$ = 1 – 1,0784/30,5166 = 0,9647 ou 96,47%, resultando que 1– $R_{(9)}^2$ =3,53%. Comparando-se com os valores da Tabela 7, verifica-se uma redução de 7,90% para 3,53% na determinação dos desvios do modelo (coeficiente de não determinação), quando se passou do modelo linear para o modelo linear bissegmentado, para a cultivar 9.

As estimativas dos parâmetros do modelo para todas as cultivares encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8. Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão linear bissegmentada, relativos aos dados da Tabela 3.

Genótipo	Média	$\hat{\beta}_{0i}$	$\hat{\beta}_{1i}$	$\hat{\beta}_{2i}$	$\hat{\beta}_{1i} + \hat{\beta}_{2i}$	s_{di}^2	1– R_i^2(%)
1	5,675	5,935	1,08	-0,38	0,71	-0,0473	6,36
2	5,200	4,961	0,88	0,35	1,22	0,1542	8,12
3	5,297	5,170	0,46*	0,18	0,64*	1,0446**	51,25
4	5,750	6,104	1,30	-0,51	0,79	0,0572	7,16
5	5,061	5,333	1,25	-0,39	0,86	0,3453*	12,67
6	6,126	6,053	1,11	0,11	1,22	1,0293**	19,37
7	6,176	6,319	1,46	-0,21	1,25	0,3274*	7,64
8	5,748	5,499	0,59	0,36	0,95	0,3638*	19,46
9	6,600	5,968	0,49*	0,91*	1,40*	-0,0906	3,53
10	5,642	5,714	0,88	-0,10	0,77	0,8704**	30,33
11	6,530	6,721	1,50*	-0,28	1,22	0,5427**	10,29
12	6,260	6,287	1,01	-0,04	0,97	0,1180	8,89

*, **significativos a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t (H_0:β_{1i} = 1,0; $\beta_{1i}+\beta_{2i}$=1,0) ou F (H_0: s_{di}^2 = 0).

Cruz *et al.* (1989) propuseram uma modificação na metodologia de Silva & Barreto (1985) com o propósito principal de eliminar a interdependência das estimativas dos parâmetros β_{1i} e β_{2i}. Esta modificação, entretanto, cria uma descontinuidade na curva de resposta de cada genótipo, no ponto correspondente ao índice ambiental zero. Isto dificulta a interpretação da resposta nos ambientes médios, quando a descontinuidade é considerável.

5.3 REGRESSÃO QUADRÁTICA

Uma forma alternativa para se investigar a resposta diferencial de um mesmo genótipo, em diferentes níveis de qualidade ambiental, é a utilização de uma função curvilinear. Neste caso, não há a necessidade de se arbitrar um ponto de segmentação, que represente uma mudança brusca no comportamento do genótipo. Por este conceito, admite-sè que a resposta do genótipo à variação ambiental é dinâmica e pode assumir valores diferentes em quaisquer ambientes.

Brasil (1990) e Brasil & Chaves (1994) apresentam a aplicação de tal conceito utilizando um modelo de regressão quadrática, definido por:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} I_j + \beta_{2i} I_j^2 + \delta_{ij} \qquad (7)$$

sendo, β_{0i} o valor esperado da variável Y do genótipo i no ambiente médio; β_{1i} o coeficiente de regressão de primeiro grau e β_{2i} o coeficiente de regressão quadrático. Os demais termos são definidos como no modelo de Eberhart & Russell (1966).

Por este modelo, define-se como genótipo ideal aquele com alta média média (Y_i); coeficiente de regressão de primeiro grau (β_{1i}) médio; coeficiente de regressão quadrática (β_{2i}) positivo e significativo e variância dos desvios da regressão (s^2_{di}) nula.

As estimativas dos parâmetros do modelo são dadas por:

$$\hat{\beta}_{0i} = \frac{1}{Z}\{Y_{i.}[\sum_j I_j^2 \sum_j I_j^4 - (\sum_j I_j^2)^2] + \sum_j I_j^2 \sum_j I_j^3 \sum_j Y_{ij} I_j - (\sum_j I_j^2)^2 \sum_j Y_{ij} I_j^2\} ;$$

$$\hat{\beta}_{1i} = \frac{1}{Z}\{Y_{i.} \sum_j I_j^2 \sum_j I_j^3 + [m\sum_j I_j^4 - (\sum_j I_j^2)^2] \sum_j Y_{ij} I_j - m\sum_j I_j^3 \sum_j Y_{ij} I_j^2\} ;$$

$$\hat{\beta}_{2i} = \frac{1}{Z}[m\sum_j I_j^2 \sum_j Y_{ij} I_j^2 - Y_{i.}(\sum_j I_j^2)^2 - m\sum_j I_j^3 \sum_j Y_{ij} I_j] \text{ ; sendo,}$$

$$Z = m\sum_j I_j^2 \sum_j I_j^4 - (\sum_j I_j^2)^3 - m(\sum_j I_j^3)^2$$

As variâncias associadas às estimativas dos parâmetros são:

$$V_{\hat{\beta}0} = [\sum_j I_j^2 \sum_j I_j^4 - (\sum_j I_j^3)^2] \frac{QM_R}{rZ} ;$$

$$V_{\hat{\beta}1} = [m\sum_j I_j^4 - (\sum_j I_j^2)^2] \frac{QM_R}{rZ} ;$$

$$V_{\hat{\beta}_2} = (m\sum_j I_j^2)\frac{QM_R}{rZ} \quad ;$$

cujas raízes fornecem os erros apropriados para uso no teste *t*.

O desdobramento da soma de quadrados de ambientes dentro de genótipos pode ser realizada conforme apresentado na Tabela 9.

TABELA 9. Esquema de análise de variância de acordo com o modelo de regressão quadrática.

Fontes de variação	GL	SQ
Ambientes/Genótipos	m(m - 1)	$SQ_{A/E}$
Ambientes/g1	m - 1	$SQ_{A/g1}$
Linear	1	SQ_{RL1}
Quadrático	1	SQ_{RQ1}
Desvios	m - 3	SQ_{d1}
Ambientes/g2	m - 1	$SQ_{A/g2}$
⋮	⋮	⋮
Resíduo médio/r		

As somas de quadrados de ambientes dentro do genótipo i ($SQ_{A/gi}$) e da regressão linear (SQ_{RLi}) são calculadas como no modelo de regressão linear simples.

A soma de quadrados da regressão quadrática é dada por:

$$SQ_{RQi} = \hat{\beta}_{0i} Y_{i.} + \hat{\beta}_{1i} \Sigma_j Y_{ij} I_j + \hat{\beta}_{2i} \Sigma_j Y_{ij} I_j^2 - SQ_{RLi} - Y_{i.}^2 / m$$

O teste F do quadrado médio da regressão quadrática em relação ao quadrado médio residual fornece um teste de hipótese para a diferença de β_{2i} em relação a zero, alternativamente ao teste *t*.

A soma de quadrados dos desvios da regressão é dada por:

$$SQ_{di} = SQ_{A/gi} - SQ_{RLi} - SQ_{RQi}$$

e o coeficiente de determinação do modelo por:

$$R_i^2 = 1 - SQ_{di} / SQ_{A/gi}$$

A detecção de significância para a regressão quadrática indica que o genótipo respectivo apresenta resposta variável à melhoria ambiental conforme a qualidade do ambiente. A resposta do genótipo no limite de um ponto *I* qualquer pode ser predita pela derivada de primeira ordem da função quadrática dada por:

$$\hat{Y}_i' = \hat{\beta}_{1i} + \hat{\beta}_{2i} I$$

Genótipos com valores de $\hat{\beta}_2$ positivos apresentam resposta crescente com a melhoria ambiental sendo, por conseguinte, tolerantes a ambientes desfavoráveis e responsivos a ambientes favoráveis.

Da mesma forma que para os demais modelos as estimativas dos parâmetros e somas de quadrados podem ser obtidas com operações de matrizes, conforme segue.

Exemplo 4. Análise de estabilidade e adaptabilidade fenotípicas pelo modelo de regressão quadrática.

Tomem-se novamente, como exemplo, os dados da cultivar 9 da Tabela 3 e os índices I_j e I_j^2 da Tabela 6. O vetor Y e matriz X são:

$$Y = \begin{bmatrix} 4{,}86 \\ 8{,}70 \\ 5{,}62 \\ 10{,}22 \\ 5{,}21 \\ 5{,}06 \\ 6{,}28 \\ 5{,}37 \\ 6{,}34 \\ 8{,}34 \end{bmatrix}; \qquad X = \begin{bmatrix} 1 & -1{,}903 & 3{,}6213 \\ 1 & 1{,}602 & 2{,}5666 \\ 1 & -1{,}579 & 2{,}4925 \\ 1 & 3{,}293 & 10{,}8435 \\ 1 & -1{,}795 & 3{,}2204 \\ 1 & -1{,}296 & 1{,}6803 \\ 1 & 0{,}172 & 0{,}0296 \\ 1 & -0{,}335 & 0{,}1119 \\ 1 & 0{,}340 & 0{,}1153 \\ 1 & 1{,}500 & 2{,}2513 \end{bmatrix}$$

A matriz $X'X$ é, portanto:

$$X'X = \begin{bmatrix} m & 0 & \sum_j I_j^2 \\ 0 & \sum_j I_j^2 & \sum_j I_j^3 \\ \sum_j I_j^2 & \sum_j I_j^3 & \sum_j I_j^4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 10 & 0 & 26{,}9326 \\ 0 & 26{,}9326 & 24{,}4178 \\ 26{,}9326 & 24{,}4178 & 161{,}7847 \end{bmatrix} \text{ e ;}$$

$$(X'X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0{,}2081 & 0{,}0364 & -0{,}0401 \\ 0{,}0364 & 0{,}0494 & -0{,}0135 \\ -0{,}0401 & -0{,}0135 & 0{,}0149 \end{bmatrix}$$

O vetor $X'Y$ para a cultivar 9 é:

$$X'Y = \begin{bmatrix} Y_{i.} \\ \sum_j Y_{ij} I_j \\ \sum_j Y_{ij} I_j^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 66{,}0 \\ 27{,}5064 \\ 210{,}3316 \end{bmatrix}, \text{ resultando que } \bar{\beta} = \begin{bmatrix} 6{,}2938 \\ 0{,}9184 \\ 0{,}1137 \end{bmatrix}$$

As variâncias e erros-padrão das estimativas, obtidas a partir da matriz $(X'X)^{-1}$ e do quadrado médio residual da análise conjunta são:

$V_{\bar{\beta}0} = 0{,}2081 \times 0{,}2447 = 0{,}0509 \Leftrightarrow s_{\bar{\beta}0} = 0{,}2257$

$V_{\bar{\beta}1} = 0{,}0494 \times 0{,}2447 = 0{,}0121 \Leftrightarrow s_{\bar{\beta}1} = 0{,}1099$

$V_{\bar{\beta}2} = 0{,}0149 \times 0{,}2447 = 0{,}00365 \Leftrightarrow s_{\bar{\beta}2} = 0{,}0604$, todos com 360 graus de liberdade.

O teste t para a diferença de $\beta_{1(9)}$ em relação à unidade é:

$t = (0{,}9140 - 1{,}0)/0{,}1099 = -0{,}742$, não significativo.

A significância de $\beta_{2(9)}$ é testada por:

t = 0,1137/0,0604 = 1,882, com probabilidade entre 5% e 10%.

A partição da soma de quadrados de ambientes dentro do genótipo 9, resulta nos valores da Tabela 10.
Sendo,

$SQ_{A/9} = (4,86^2 + 8,70^2 + ... + 8,34^2 - 66,0^2/10) = 30,5166$

$SQ_{RL9} = [(\Sigma_j Y_{ij} I_j)^2 / \Sigma_j I_j^2] = (27,5064^2/26,9326) = 28,0924$

$SQ_{RQ9} = [6,2938 \times 66,0 + 0,9184 \times 27,5064 + 0,1137 \times 210,3316 - (66,0^2/10) - 28,0924]$
$= 0,8749$

O coeficiente de determinação do modelo é:

$R_j^2 = (SQ_{RL9} + SQ_{RQ9})/SQ_{A/9} = (28,0924 + 0,8749)/30,5166 = 0,949$ ou 94,9% na Tabela 11.

$1 - R^2 = 0,051$ ou 5,1%

Os parâmetros do modelo quadrático para todas as cultivares estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 10. Análise de regressão, pelo modelo quadrático, a partir dos dados do genótipo 9 da Tabela 3.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Ambientes/g	9	30,5166	3,3907	13,86**
Regressão Linear	1	28,0924	28,0924	114,81**
[illegible] quadrática	1	0,8749	0,8749	3,58ns
Desvios de regressão	7	1,5493	0,2213	0,90ns
Resíduo/r	360	-	0,2447	

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns – não significativo.

TABELA 11. Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão quadrática, relativas aos dados da Tabela 3.

Genótipo	Média	$\hat{\beta}_0$	$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$	s^2_d	1 - R^2 (%)
1	5,675	5,803	0,91	-0,0477	-0,0334	6,81
2	5,200	5,106	1,05	0,0349	0,1727	8,50
3	5,297	5,200	0,53**	0,0360	1,0405**	51,08
4	5,750	5,921	1,06	-0,0636	0,0846	7,81
5	5,061	5,080	1,03	-0,0072	0,3838*	13,50
6	6,126	6,202	1,20	-0,0283	1,0244**	19,29
7	6,176	6,250	1,36**	-0,0276	0,3309*	7,69
8	5,748	5,640	0,77*	0,0402	0,3811*	20,02
9	6,600	6,294	0,92	0,1137	-0,0241	5,07
10	5,642	5,519	0,77*	0,0457	0,8530**	29,86
11	6,530	6,669	1,38**	-0,0517	0,5364**	10,21
12	6,260	6,380	1,02	-0,0445	0,0994	8,43

5.4 PROPRIEDADES E LIMITAÇÕES

Conforme já explicitado, os estudos de resposta de genótipos às variações de ambientes, via regressão, promovem um detalhamento dos efeitos de ambientes dentro de genótipos, incluindo aí os efeitos de ambientes e da interação. Não são, portanto, estudos que detalham a natureza da interação como tal. Para que tais estudos sejam úteis na recomendação de cultivares dois requisitos básicos se fazem necessários. Primeiro, que se tenha uma boa medida de qualidade do ambiente para o qual se faz a recomendação e segundo, que o comportamento verificado dos genótipos, seja consistente em novas situações.

Uma vez que a maioria dos métodos de análise utiliza a produtividade média como índice ambiental, a maneira mais prática de se medir a qualidade de um ambiente não avaliado experimentalmente, seria a produtividade esperada. A previsão de produtividade, embora influenciada por variações erráticas principalmente do clima, é uma prática comum no planejamento dos próprios agricultores. Tal previsão é feita com base nos fatores conhecidos do ambiente, no nível de tecnologia adotado e, principalmente, na produtividade de anos anteriores, em condições similares. Assim, o conhecimento se uma dada cultivar é especificamente adaptada a ambientes favoráveis ou desfavoráveis, pode ser muito útil para a recomendação. É recomendável, ainda, a utilização de mais de uma cultivar, principalmente em áreas maiores, o que diminui o risco de erros de recomendação, trazendo maior estabilidade para o agricultor.

A segunda condição tem sido, em geral, mais difícil de ser atendida, particularmente nas condições tropicais. A premência na liberação de novas cultivares tem feito com que os testes sejam feitos em um número relativamente grande de locais, porém em um número reduzido de anos. Com isto não há, em geral, dados suficientes para se avaliar a estabilidade dos genótipos na dimensão temporal. E é justamente a resposta às variações de ano para ano que mais interessa ao agricultor. Uma alternativa seria a verificação da consistência dos parâmetros de estabilidade e adaptabilidade estimados entre locais, nos diferentes anos de teste. Brasil (1990) a partir de dados de produtividade de milho, fez uma comparação de parâmetros de diferentes modelos de regressão estimados com base na variação de locais, por seis anos consecutivos. Verificou que, de um modo geral, a consistência destes parâmetros foi baixa no decorrer dos anos. Alguns autores consideram que os modelos baseados em regressão funcionam bem como modelos descritivos, porém nem sempre são bons modelos preditivos. Paterniani (1986) recomenda que os ensaios de avaliação em rede sejam repetidos em diferentes épocas dentro de cada ano, como forma de simular uma variação entre anos, melhorando assim a recomendação de cultivares.

De qualquer forma, a observação do comportamento das cultivares em ambientes de lavoura, após o lançamento, deve ser utilizada como uma providência adicional para aferir os resultados experimentais.

6. UTILIZAÇÃO DE VARIÁVEIS AUXILIARES

A possibilidade de aproveitamento dos efeitos da interação de genótipos com ambientes no melhoramento, conforme já mencionado, está condicionada ao conhecimento de características dos genótipos e dos ambientes, relacionadas à manifestação da interação. A utilização de um índice ambiental medido pela

produtividade de cada ambiente, na forma descrita nos métodos de adaptabilidade e estabilidade, constitui uma maneira de se sintetizarem todas as informações sobre a qualidade ambiental em uma única variável. Contudo, quando outras variáveis, qualitativas ou quantitativas, associadas aos genótipos ou aos ambientes, são disponíveis, o efeito destas sobre a interação pode ser avaliado, em certas condições (Van Eeuwijk *et al.*, 1996).

Variáveis qualitativas associadas aos genótipos podem ser, por exemplo, genealogia, origem geográfica, grupos de maturação, classes discretas de resistência a doenças e pragas etc. Exemplos de variáveis quantitativas associadas aos genótipos são, notas de resistência, precocidade medida em uma escala contínua, porte médio das plantas, entre outras. Da mesma forma, pode-se exemplificar com classes de solos, níveis de tecnologia, estações de cultivo (normal, safrinha), regiões geográficas etc., as variáveis qualitativas associadas aos ambientes. Altitude, latitude, temperatura e níveis de elementos químicos no solo, são exemplos de variáveis quantitativas associadas aos ambientes.

Exemplo 5. Inclusão de uma variável qualitativa associada aos genótipos.

Informações a respeito de uma variável qualitativa podem ser obtidas agrupando-se os genótipos de acordo com as classes da variável. Assim, na análise conjunta da variância, as somas de quadrados de genótipos e da interação, são desdobradas nos efeitos dentro de cada classe e entre classes (ou grupos). Detalhes formais da inclusão da variável no modelo de análise são dadas por Van Eeuwijk *et al.* (1996).

Dos genótipos da Tabela 3, quatro são híbridos duplos (1 a 4), quatro híbridos triplos (5 a 8) e quatro híbridos simples (9 a 12), conforme já explicitado. O desdobramento dos efeitos de genótipos e da interação da análise de variância da Tabela 4, está apresentado na Tabela 12.

Para o cálculo das somas de quadrados de genótipos e da interação para cada grupo, basta realizar uma análise conjunta de variância, considerando-se, apenas, os genótipos daquele grupo. As somas de quadrados entre grupos podem ser obtidas por diferença ou a partir de uma tabela com as médias (ou totais) de cada grupo em todos os ambientes.

TABELA 12. Análise conjunta de variância referente aos dados da Tabela 3, com desdobramento dos efeitos de genótipos e da interação de genótipos com ambientes.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Genótipos (G)	11	28,1908	2,5628	10,473**
Híbridos duplos (HD)	3	2,2281	0,7427	3,035*
Híbridos triplos (HT)	3	7,9450	2,6483	10,823**
Híbridos simples (HS)	3	5,7041	1,9014	7,770**
Entregrupos (E)	2	12,3136	6,1568	25,161**
Interação (G x A)	99	71,3529	0,7207	2,945**
Híbridos duplos (HD x A)	27	18,8966	0,6999	2,860**
Híbridos triplos (HT x A)	27	25,7791	0,9548	3,902**
Híbridos simples (HS x A)	27	19,8939	0,7368	3,011**
Entregrupos (E x A)	18	6,7833	0,3768	1,540ns
Resíduo médio/r	360		0,2447	

*,** - Significativos aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente; ns – não significativo.

O desdobramento apresentado na Tabela 12 mostra diferença significativa entre os tipos de híbridos, quanto ao efeito principal de genótipos. Apesar disso, a interação de grupos com ambientes foi não significativa, indicando que outros atributos dos genótipos, que não o tipo do híbrido, foram os responsáveis pela interação. Em outras palavras, as interações significativas ocorreram entre híbridos e ambientes, dentro de cada grupo, para o conjunto de genótipos considerado.

A inclusão de uma variável qualitativa associada aos ambientes pode ser feita de forma similar. Neste caso, os ambientes seriam agrupados, realizando uma análise conjunta para cada grupo de ambientes.

Exemplo 6. Inclusão de uma variável quantitativa associada aos ambientes.

Considere-se uma variável Z fixa ou aleatória, utilizada para medir um atributo quantitativo do ambiente. Assim, Z_j seria o valor da variável Z no ambiente j. Seja z_j a mesma variável centrada, ou seja, $z_j = Z_j - \overline{Z}$. A inclusão da variável no modelo básico de estudo da interação resulta em:

$$Y_{ij} = m + g_i + a_i + \beta_i z_j + (ga)'_{ij} + \bar{e}_{ij} \qquad (8)$$

sendo, β_i um coeficiente de regressão que mede a resposta dos efeitos de interação do genótipo i à variável Z. Desta forma, a soma de quadrados devida à heterogeneidade de resposta dos genótipos representa a porção da soma de quadrados da interação explicada pela variável. A porção restante representa a soma de quadrados da interação remanescente ou residual, após eliminado o efeito da covariável Z. Esta porção remanescente é representada por $(ga)'_{ij}$ no modelo (8).

Na Tabela 13 constam as altitudes dos dez locais de ensaios, considerados na Tabela 3. As estimativas de β_i são obtidas a partir da matriz de interações, ou seja, após retirados os efeitos principais de genótipos (g_i) e ambientes (a_j). Para cada linha da matriz, estima-se o coeficiente de regressão por:

$$\beta_i = b_i = \Sigma_j (ga)_{ij} z_j / \Sigma_j z_j^2$$

Considerando-se os valores da interação da Tabela 5 e de z_j da Tabela 13, temos para o genótipo 1:

b_1 = [0,048 x (–155,4) + 0,063 x (–79,4)+ ... +(–0,535) x 342,6]/[(–155,4)² + (–79,4)² + ... + 342,6²]

b_1 = (–323,1854/224496,4) = –0,001440, em toneladas por metro.

Os valores de b_i para todas as cultivares estão mostrados na Tabela 14.

A soma de quadrados para o efeito da covariável Z_j sobre a interação é dada por:

$$SQ_Z = \Sigma_i b_i^2 \times \Sigma_j z_j^2 = [\Sigma_j (ga)_{ij} z_j]^2 / \Sigma_j z_j^2$$

Uma vez que os coeficientes de regressão são estimados após se estimarem os efeitos principais, esta soma de quadrados está associada a **n** – 1 graus de liberdade para **n** valores de b_i (Van Eeuwijk *et al.*, 1996).

Com os valores de b_i da Tabela 14 tem-se:

$$SQ_Z = [(-0,001440)^2 + (-0,000347)^2 + ... + 0,000186^2] \times 224496,4 = 8,4539$$

É sempre recomendável se trabalhar com um grande número de algarismos significativos a fim de não se introduzirem erros de aproximação nos cálculos.

A análise de variância correspondente está apresentada na Tabela 15.

TABELA 13. Altitude em metros dos locais dos ensaios da Tabela 3.

Local	Altitude (Z_j)	$z_j = Z_j - \bar{Z}$
1- Barreiras	452	-155,4
2- Goianésia	528	-79,4
3- Itumbiara	420	-187,4
4- Rio Verde	680	72,6
5- Ponta Porã	560	-47,4
6- São Gabriel do Oeste	640	32,6
7- Sidrolândia	484	-123,4
8- Capinópolis	620	12,6
9- Inhaúma	740	132,6
10- Uberlândia	950	342,6
Média	607,4	0

TABELA 14. Coeficientes de regressão linear das estimativas dos efeitos da interação de genótipos com ambientes, em função da altitude.

Genótipo	b_i	Genótipo	b_i
1	-0,001440	7	0,000131
2	-0,000347	8	-0,001759
3	-0,001055	9	-0,000572
4	0,001020	10	-0,001523
5	-0,000695	11	0,000939
6	0,005114	12	0,000186

TABELA 15. Análise de variância considerando o efeito da altitude (Z_j) sobre a interação de genótipos com ambientes.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Interação (G x A)	(n - 1)(m - 1) = 99	71,3529	0,7207	2,945**
Altitude (Z)	n - 1 = 11	8,4539	0,7685	3,141**
Interação residual	(n - 1)(m - 2) = 88	62,8990	0,7148	2,921**
Resíduo médio/r	360	-	0,2447	-

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade

A altitude tem, portanto, um efeito significativo sobre a interação de genótipos com ambientes, para este conjunto de dados. A soma de quadrados relativa ao efeito da altitude representa 11,85% da soma de quadrados da interação, o que não é pouco em vista da multiplicidade de fatores que interferem na caracterização do ambiente. Outras covariáveis podem ser incluídas, se disponíveis, cada uma com **n** – 1 graus de liberdade, desde que não fique comprometido o número de graus de liberdade para a interação residual. Esta abordagem corresponde à identificação de porções fixas ou previsíveis da interação, mesmo quando esta é aleatória.

A interpretação da contribuição de cada cultivar para a resposta dos efeitos de interação à variável considerada, é feita examinando-se os valores de b_i. Valores de b_i positivos, indicam uma adaptação às maiores altitudes e vice-versa.

7. ANÁLISE AMMI

Uma alternativa para o detalhamento do efeito da interação de genótipos com ambientes é a utilização da chamada análise AMMI (*Additive Main effects and Multiplicative Interaction*). Neste texto serão considerados apenas alguns princípios da técnica, com um exemplo numérico. Maiores detalhes sobre o tema podem ser encontrados nos trabalhos de Gauch & Zobel (1996) e Duarte & Vencovsky (1999).

A abordagem AMMI combina análise de variância e análise de componentes principais (ACP) em um único modelo, aditivo quanto aos efeitos principais de genótipos e ambientes e multiplicativo no detalhamento dos efeitos da interação. O modelo de análise passa a ser, então:

$$Y_{ij} = m + g_i + a_j + \sum_{k=1}^{s} \lambda_k \gamma_{ik} \alpha_{jk} + \rho_{ij} + \bar{e}_{ij} \qquad (9)$$

fazendo-se

$(ga)_{ij} = \sum_{k=1}^{s} \lambda_k \gamma_{ik} \alpha_{jk} + \rho_{ij}$, a partir do modelo (3). Os efeitos m, g_i, a_j e $(ga)_{ij}$ são estimados conforme já apresentado na análise conjunta de variância (4). O novos termos do modelo são obtidos pela técnica de decomposição por valores singulares (DVS), a partir da matriz dos efeitos da interação (matriz GA). Desta forma, λ_k representa o k-ésimo valor singular da matriz GA; γ_{ik} representa o valor do k-ésimo vetor singular (vetor coluna associado a λ_k) correspondente ao genótipo **i** e; α_{jk} representa o valor do k-ésimo vetor singular (vetor linha associado a λ_k) correspondente ao ambiente **j**. O índice **k** pode variar de 1 a **p**, sendo **p** o posto da matriz GA, correspondendo ao menor valor entre **n** – 1 e **m** – 1.

No modelo (9) **s** corresponde a um valor entre **1** e **p**. Desta forma, as **p** parcelas nas quais se pode decompor a interação são agrupadas em dois conjuntos. No primeiro grupo de **s** parcelas (**k** = **1** a **s**) procura-se detectar um padrão da variação de $(ga)_{ij}$, enquanto que as parcelas de **s** + **1** a **p** constituem o que se define como ruído presente nas estimativas da interação, representado por ρ_{ij} no modelo. O quadrado de λ_k (λ_i^2) de corresponde à porção da variação explicada pela parcela **k** e corresponde ao k-ésimo autovalor da matriz (GA)(GA)' ou (GA)'(GA) e $\sum_{k=1}^{p} \lambda_k^2 = SQ_{GA}$. Pelas propriedades da DVS, $\lambda_1^2 \geq \lambda_2^2 \geq \ldots \geq \lambda_p^2$ de forma que as primeiras parcelas captam proporções maiores da variação contida na matriz de interações. Quando a matriz

GA possui um padrão de variação, uma grande parte da variação presente vai ser captada com poucas parcelas (na prática, s = 1 a 3), possibilitando a separação de padrão e ruído, com um modelo parcimonioso. Modelos com s = 1, 2, ..., p podem ser denotados por AMMI 1, AMMI 2, ..., AMMI p, respectivamente. Idealmente, quando um modelo AMMI 1 ou AMMI 2 é suficiente para detectar um padrão de variação nos dados, a técnica se torna muito útil por permitir a interpretação da interação em uma ou duas dimensões, livre de ruídos que afetam a compreensão do fenômeno. Neste caso, a média de um genótipo em um dado ambiente estimada pelo modelo AMMI pode ser mais precisa que a média observada, por levar em conta toda a matriz de dados na estimativa, ao invés das poucas repetições de um ensaio (Gauch & Zobel, 1996).

Exemplo 7. Aplicação da análise AMMI.

Representando as estimativas das interações de genótipos com ambientes da Tabela 5 em notação matricial, tem-se:

$$GA = \begin{bmatrix} 0{,}048 & 0{,}063 & -0{,}246 & -0{,}618 & 0{,}540 & -0{,}079 & 0{,}423 & 0{,}850 & -0{,}445 & -0{,}535 \\ 0{,}893 & 1{,}058 & -0{,}711 & 0{,}187 & -0{,}375 & -0{,}014 & -0{,}482 & -0{,}465 & 0{,}200 & -0{,}290 \\ 0{,}336 & -1{,}959 & 2{,}282 & -1{,}090 & 0{,}278 & -0{,}041 & -1{,}019 & 1{,}498 & -0{,}637 & 0{,}353 \\ 0{,}283 & -0{,}292 & -1{,}281 & -0{,}163 & -0{,}145 & 0{,}556 & 0{,}338 & 0{,}355 & 0{,}410 & -0{,}060 \\ 0{,}162 & -0{,}203 & -0{,}932 & 0{,}456 & -0{,}076 & 0{,}265 & 0{,}517 & 0{,}024 & 1{,}099 & -1{,}311 \\ -1{,}333 & -0{,}258 & 0{,}233 & 0{,}301 & -0{,}121 & 0{,}440 & -2{,}018 & 0{,}209 & 0{,}964 & 1{,}584 \\ 0{,}047 & 0{,}972 & -0{,}917 & 0{,}861 & -0{,}671 & -0{,}960 & 1{,}492 & -0{,}991 & -0{,}086 & 0{,}254 \\ -0{,}035 & -0{,}010 & 1{,}231 & -0{,}531 & 0{,}267 & 0{,}068 & -0{,}630 & 1{,}127 & -1{,}408 & -0{,}078 \\ 0{,}163 & 0{,}498 & 0{,}599 & 0{,}327 & 0{,}405 & -0{,}244 & -0{,}492 & -0{,}895 & -0{,}600 & 0{,}240 \\ -0{,}699 & -1{,}954 & 1{,}497 & 0{,}145 & 0{,}683 & -0{,}246 & 1{,}186 & -0{,}207 & 0{,}038 & -0{,}442 \\ -0{,}127 & 1{,}378 & -1{,}951 & 0{,}717 & -0{,}645 & 0{,}386 & 1{,}138 & -0{,}665 & -0{,}320 & 0{,}090 \\ 0{,}263 & 0{,}708 & 0{,}199 & -0{,}593 & -0{,}135 & -0{,}134 & -0{,}452 & -0{,}835 & 0{,}780 & 0{,}200 \end{bmatrix}$$

O posto da matriz GA, neste caso é **p = 9**, ou seja **m – 1**. Como primeiro passo, pode-se investigar que modelo AMMI (AMMI 1, AMMI 2, ...) seria suficiente para detectar o padrão porventura presente na matriz GA. Isto pode ser feito multiplicando-se a matriz GA pela sua transposta (GA)', ou vice-versa, encontrando-se os autovalores da matriz resultante. Vários pacotes estatísticos com procedimentos para álgebra de matrizes estão disponíveis para tais cálculos, em computador. Os autovalores resultantes são:

$$\lambda^2 = \begin{bmatrix} 35{,}7936 \\ 13{,}0954 \\ 7{,}8556 \\ 6{,}9246 \\ 4{,}0078 \\ 1{,}5781 \\ 1{,}0105 \\ 0{,}7496 \\ 0{,}3399 \end{bmatrix}$$

O somatório dos valores de λ_k^2 é 71,3552 e corresponde à soma de quadrados da interação da Tabela 4, salvo pequeno erro de aproximação. A determinação exata do número de graus de liberdade (GL) para cada parcela da interação, ou cada eixo da análise de componentes principais ($IPCA_k$), não é simples. Uma boa aproximação, contudo, é dada por **n + m – 1 – 2k**, para o eixo **k** (Duarte & Vencovsky, 1999). No presente caso teríamos 19 GL para o primeiro eixo ($IPCA_1$), 17 GL para o segundo eixo ($IPCA_2$) e assim por diante. A escolha do modelo pode ser feita testando-se seqüencialmente a significância, por um teste de F aproximado, o quadrado médio de cada eixo e o quadrado médio remanescente, correspondente ao ruído daquele modelo (Cornelius *et al.*, 1996; Duarte & Vencovsky, 1999). O modelo mais adequado e parcimonioso seria aquele que alia significância para os eixos, com não significância para o ruído, consumindo uma porção não muito elevada de graus de liberdade.

Para o presente exemplo, o quadro de análise de variância está representado na Tabela 16.

Pelo critério da significância do quadrado médio do ruído do modelo, tomando-se o limite de 5% de probabilidade de erro, seriam necessários três eixos para captar o padrão de variação da matriz GA, o que levaria à escolha do modelo AMMI 3. É conveniente, entretanto, examinar a contribuição relativa de cada eixo na variação total. Na Tabela 17 estão representadas as proporções da variação explicada por cada eixo, o que corresponde a um coeficiente de determinação. A proporção acumulada equivale à determinação do modelo AMMI correspondente.

A interpretação dos resultados de uma análise multivariada, como neste caso, se torna relativamente simples quando o padrão é reduzido a uma ou duas dimensões. Com mais de dois eixos a representação gráfica dos resultados se torna mais difícil, bem como a associação dos escores dos eixos IPCA3 e superiores com atributos identificáveis dos genótipos e dos ambientes. Gauch & Zobel (1996) ressaltam, ainda, que estes eixos superiores são dominados por ruídos e não apresentam valor preditivo e interpretação biológica. Estes argumentos, aliados ao princípio da parcimônia, podem levar ao descarte de eixos com efeito significativo, se sua contribuição relativa para a interpretação dos resultados não for relevante.

TABELA 16. Análise de variância com detalhamento do efeito da interação pelo modelo AMMI.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Genótipos (G)	11	-	-	-
Ambientes (A)	9	-	-	-
Interação (GA)	99	71,3529	0,7207	2,945**
IPCA1	19	35,7936	1,8839	7,699**
Ruído 1	80	35,5593	0,4445	1,816**
IPCA2	17	13,0954	0,7703	3,148**
Ruído 2	63	22,4639	0,3566	1,457*
IPCA3	15	7,8556	0,5237	2,140**
Ruído 3	48	14,6083	0,3043	1,244ns
Resíduo médio/r	360	-	0,2447	-

TABELA 17. Contribuição relativa dos eixos de ACP, para a variação total.

Eixo	SQ (λ_i^2)	%	% acumulada	Ruído %
$IPCA_1$	35,7936	50,16	50,16	49,84
$IPCA_2$	13,0954	18,35	68,51	31,49
$IPCA_3$	7,8556	11,01	79,52	20,48
$IPCA_4$	6,9246	9,70	89,22	10,78
$IPCA_5$	4,0078	5,62	94,84	5,16
$IPCA_6$	1,5781	2,21	97,05	2,95
$IPCA_7$	1,0105	1,42	98,47	1,53
$IPCA_8$	0,7496	1,05	99,52	0,48
$IPCA_9$	0,3399	0,48	100,00	0
Total	71,3552	100,00	-	-

No presente exemplo, os dois primeiros eixos explicam 68,5% da variação devida à interação, com um ruído remanescente de 31,5%. A escolha do modelo AMMI2, portanto, mostra-se adequada neste caso.

O próximo passo da análise consiste em se determinar os valores de λ_k, γ_{ik} e α_{jk} do modelo, fazendo-se a decomposição por valores singulares (DVS) da matriz GA. Uma outra alternativa seria determinar os autovetores associados aos autovalores das matrizes (GA)'(GA) e (GA)(GA)'. Contudo, conforme advertem Duarte & Vencovsky (1999), este procedimento pode levar a escores com sinais invertidos, prejudicando a interpretação dos resultados.

A decomposição por DVS da matriz GA, de posto **p**, gera **p** valores singulares λ_k ; **p** vetores singulares tipo coluna relacionados com os genótipos (γ_{ik}) e **p** vetores singulares tipo linha relacionados com os ambientes (α_{jk}). Arranjando-se os **p** valores singulares λ_k em uma matriz diagonal $S_{(p \times p)}$, os **p** vetores coluna γ_{ik} em uma matriz $U_{(n \times p)}$ e os **p** vetores linha α_{jk} em uma matriz $V'_{(p \times m)}$, tem-se que GA = USV'. No procedimento IML do SAS a decomposição por valores singulares da matriz GA é feita usando o comando *"CALL SVD (U, S, V, GA)"* (Duarte & Vencovsky, 1999).

Tomando-se apenas as duas primeiras linhas ou colunas, conforme o caso, das matrizes S, U e V' (modelo AMMI 2), tem-se, para os dados deste exemplo:

$\lambda_1 = 5{,}9828$; $\lambda_2 = 3{,}6188$, que correspondem, obviamente, às raízes quadradas dos autovalores respectivos.

$$\gamma_{i1} = \begin{bmatrix} 0{,}037632 \\ -0{,}202458 \\ 0{,}614967 \\ -0{,}123239 \\ -0{,}175224 \\ 0{,}165087 \\ -0{,}367160 \\ 0{,}292671 \\ 0{,}013302 \\ 0{,}263942 \\ -0{,}461137 \\ -0{,}057556 \end{bmatrix} ; \qquad \gamma_{i2} = \begin{bmatrix} 0{,}214161 \\ -0{,}178302 \\ 0{,}056831 \\ 0{,}049522 \\ 0{,}211694 \\ -0{,}712067 \\ 0{,}163664 \\ 0{,}011336 \\ -0{,}124798 \\ 0{,}517981 \\ 0{,}021599 \\ -0{,}231403 \end{bmatrix}$$

α'_{j1} = [–0,070550 –0,490192 0,649525 –0,245199 0,182822 0,011072 ...
... –0,318078 0,336929 –0,135174 0,078844]

α'_{j2} = [–0,118529 –0,334256 0,070046 –0,008735 0,131248 –0,127227 ...
... 0,0752662 0,071249 –0,199936 –0,473580]

Com base no modelo selecionado (AMMI 2) a média de um genótipo **i** em um ambiente **j** é estimada por:

$$\hat{Y}_{ij} = \hat{m} + \hat{g}_i + \hat{a}_j + \lambda_1\gamma_{i1}\alpha_{j1} + \lambda_2\gamma_{i2}\alpha_{j2}.$$

Para o genótipo 1, no ambiente 1, utilizando-se as estimativas de m, g_i e a_j da Tabela 3, tem-se: $\hat{Y}_{11}$ = 5,839 + (–0,164) + (–1,903) + 5,9828 x 0,0376 x (–0,0706) + 3,6188 x 0,2142 x 0,1185 = 3,848 t ha^{-1}, sendo 3,772 t ha^{-1} representadas pela média e efeitos principais e 0,076 t ha^{-1} pela interação. Esta média predita pode representar melhor o verdadeiro desempenho da cultivar 1 no ambiente 1, que a própria média observada, que foi de 3,82 t ha^{-1} (Gauch & Zobel, 1996).

A interpretação dos resultados da análise AMMI é facilitada com a representação gráfica, no mesmo espaço, dos genótipos e dos ambientes. Isto é feito calculando-se os escores correspondentes a cada eixo, para os dois fatores. A relação GA=USV' pode ser reescrita como GA=(US^{½})(S^{½}V') em que US^{½} representa os vetores com os escores referentes aos genótipos e S^{½}V' os escores referentes aos ambientes. No presente exemplo os escores para os dois primeiros eixos relativos aos genótipos são dados por:

$$\begin{bmatrix} 0{,}037632 & 0{,}214161 \\ -0{,}202458 & -0{,}178302 \\ \vdots & \vdots \\ -0{,}057556 & -0{,}231403 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 2{,}4460 & 0 \\ 0 & 1{,}9023 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0{,}0920 & 0{,}4074 \\ -0{,}4952 & -0{,}3392 \\ 1{,}5042 & 0{,}1081 \\ -0{,}3014 & 0{,}0942 \\ -0{,}4286 & 0{,}4027 \\ 0{,}4038 & -1{,}3546 \\ -0{,}8981 & 0{,}3113 \\ 0{,}7159 & 0{,}0216 \\ 0{,}0325 & -0{,}2374 \\ 0{,}6456 & 0{,}9854 \\ -1{,}1279 & 0{,}0411 \\ -0{,}1408 & -0{,}4402 \end{bmatrix}$$

↑ ↑

Eixo 1 *Eixo* 2

Da mesma forma, os escores relativos aos ambientes são:

$$\begin{bmatrix} 2{,}4460 & 0 \\ 0 & 1{,}9023 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} -0{,}070550 & -0{,}490192 & \cdots & 0{,}078844 \\ 0{,}118529 & -0{,}334256 & \cdots & -0{,}473580 \end{bmatrix} =$$

$$= \begin{bmatrix} -0{,}173 & -1{,}199 & 1{,}589 & -0{,}600 & 0{,}447 & 0{,}027 & -0{,}778 & 0{,}824 & -0{,}331 & 0{,}193 \\ 0{,}226 & -0{,}636 & 0{,}133 & -0{,}017 & 0{,}250 & -0{,}242 & 1{,}432 & 0{,}136 & -0{,}380 & -0{,}901 \end{bmatrix} \begin{matrix} \leftarrow \text{Eixo 1} \\ \leftarrow \text{Eixo 2} \end{matrix}$$

A Figura 3 mostra a representação gráfica dos genótipos e dos ambientes (gráfico *biplot*), para os dados analisados. Genótipos posicionados próximo à origem dos eixos, contribuem pouco para a interação total em relação àqueles mais afastados da origem e podem ser considerados mais estáveis, por este critério. Podem também ser considerados de adaptabilidade mais geral, por interagirem menos com os ambientes. É o caso dos genótipos 1, 4 e 9 (G1, G4 e G9), entre outros. Da mesma forma, ambientes posicionados próximos à origem, como os ambientes 1, 6 e 9 (A1, A6 e A9), por exemplo, podem ser considerados mais representativos das condições ambientais médias, com respeito aos fatores importantes para a interação. Este tipo de informação pode ser importante na escolha de locais chave para avaliação de genótipos, em um programa de melhoramento.

O valor estimado da interação, para uma combinação específica de genótipos com ambientes pode ser obtido multiplicando-se, para cada eixo, as coordenadas respectivas, somando-se os resultados dos dois eixos. Desta forma, combinações de genótipos com ambientes, afastados da origem e próximos entre si, mostram interação positiva, representando adaptações específicas. É o caso, por exemplo, do genótipo 3 com o ambiente 3, ou do genótipo 6 com o ambiente 10. Ao contrário, combinações de genótipos e ambientes distantes entre si tendem a mostrar interação negativa, indicando má adaptação para aquela condição particular. O genótipo 6 e ambiente 7, ou o genótipo 10 e ambiente 2, são exemplos de má adaptação de genótipos a ambientes específicos.

Para que a interpretação do gráfico de dispersão possa ser útil em situações futuras, é necessário que se busquem associações entre a posição dos pontos relativos aos ambientes e fatores detectáveis de variações ambientais. Isto porque neste tipo de análise os ambientes são tratados como fixos. No presente exemplo,

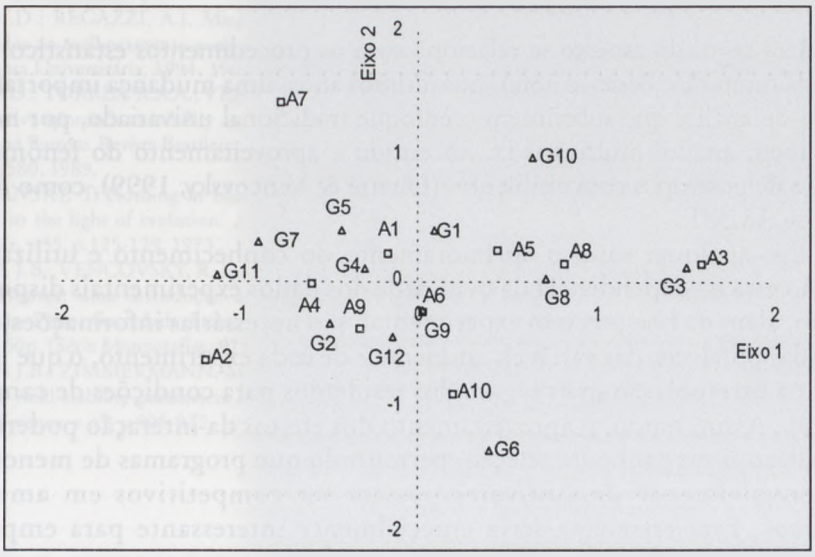


FIGURA 3. Representação gráfica da contribuição dos genótipos e dos ambientes para a interação, relativa aos dois primeiros eixos de ACP.

não se dispõem de informações detalhadas acerca de variáveis ambientais, para permitir um exame mais acurado do padrão de dispersão, em função de características dos ambientes. Mesmo assim pode-se notar uma certa associação dos escores do eixo 1, com a produtividade média, medida pelo índice ambiental, como na análise de estabilidade fenotípica, com um coeficiente de correlação de –0,56. Da mesma forma, há uma associação dos escores do eixo 2 e altitude, estando os locais de menor altitude posicionados na parte superior do gráfico, resultando em um coeficiente de correlação de –0,63. Associações podem ser buscadas, também, de características dos genótipos com sua posição no gráfico de dispersão.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas de avanço nos estudos referentes à interação de genótipos com ambientes, poderiam ser enfocadas sob dois aspectos principais. Um primeiro aspecto diz respeito ao melhor entendimento das bases biológicas do fenômeno. Para tanto, há necessidade de intensificação dos estudos sobre a influência de genes específicos sobre a manifestação da interação em caracteres complexos, como a produção. Exemplos deste tipo de genes são aqueles que conferem resistência a fatores de estresse, como doenças, pragas, elementos tóxicos do solo etc. Um caso especial, que certamente poderá trazer muitos esclarecimentos sobre o fenômeno, é o estudo da interação de QTL's (locos de caracteres quantitativos) com ambientes. Beavis & Keim (1996) apresentam as bases para este tipo de análise e mostram alguns dados da literatura que evidenciam a manifestação do fenômeno da interação, a este nível. Uma vez detectadas associações com caracteres agronômicos de importância, aqueles QTL's mais estáveis em diferentes ambientes poderiam ser utilizados em um esquema de seleção assistida para estabilidade fenotípica (Kang, 1998).

Um segundo aspecto se relaciona com os procedimentos estatísticos para a análise da interação. Pode-se notar, nos últimos anos, uma mudança importante nos modelos de análise que substituem o enfoque tradicional univariado, por métodos que incluem análise multivariada, no estudo e aproveitamento do fenômeno da interação de genótipos com ambientes (Duarte & Vencovsky, 1999), como é o caso da análise AMMI.

Em qualquer caso, o aprimoramento do conhecimento e utilização da interação está na dependência da qualidade dos dados experimentais disponíveis. Para isto, além da boa precisão experimental, são necessárias informações, o mais detalhadas possíveis, das variáveis ambientais de cada experimento, o que poderia permitir a extrapolação mais segura dos resultados para condições de campos de produção. Assim sendo, o aproveitamento dos efeitos da interação poderiam ser contabilizados no ganho de seleção, permitindo que programas de menor porte de desenvolvimento de cultivares possam ser competitivos em ambientes específicos. Esta estratégia seria especialmente interessante para empresas e instituições de âmbito regional, diante da tendência globalizadora atualmente verificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W.; BRADSHAW, A.D. Implications of genotype environmental interactions in applied plant breeding. **Crop Science**, v.4, p.503-508, 1964.

BEAVIS, W.D.; KEIM, P. Identification of quantitative trait loci that are affected by environment. In: KANG, M.S.; GAUCH, H.G. (Ed.) **Genotype-by-environment interaction**. New York: CRC Press, 1996. 416p.

BECKER, H.C. Correlations among some statistical measures of phenotypic stability. **Euphytica**, v.30, p. 835-840, 1981.

BRASIL, E.M. Comparação de métodos no estudo da interação de genótipos com ambientes em milho (*Zea mays* L.). Goiânia: UFG, 1990. 181p. Dissertação, Mestrado.

BRASIL, E.M.; CHAVES L.J. Utilizacion de un modelo cuadratico para el estudio de la respuesta de cultivares a la variacion ambiental. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENETICA, 11., Monterrey, 1994. **Memorias**. Monterrey: Asociacion Latinoamericana de Genetica, 1994. p.616.

CHAVES, L.J.; VENCOVSKY, R.; GERALDI, I.O. Modelo não-linear aplicado ao estudo da interação genótipo x ambiente em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.259-268, 1989.

CORNELIUS, P.L.; CROSSA, J.; SEYEDSADR, M.S. Statistical tests and estimators of multiplicative models for genotype-by-environment interaction. In: KANG, M.S.; GAUCH, H.G. (Ed.) **Genotype-by-environment interaction**. New York: CRC Press, 1996. 416p.

CORRÊA, L.A. (Coord.) **Ensaios nacionais de cultivares de milho**: superprecoce, precoce, normal; 1997/1998. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1998. (Documentos, 13).

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1994. 390p.

CRUZ, C.D.; TORRES, R.A.A.; VENCOVSKY, R. An alternative approach to stability analysis proposed by Silva and Barreto. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.567-580, 1989.

DOBZHANSKY, T. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. **American Biology Teacher**, v.35, p.125-129, 1973.

DUARTE, J.B.; VENCOVSKY, R. **Interação genótipos x ambientes**: uma introdução à análise AMMI. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. 60p. (Série Monografias, 9)

DUARTE, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. Correlation among yield stability parameters in common bean. **Crop Science**, v.35, p.905-912, 1995.

EBERHART, S.A.; RUSSELL, W.A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, v.6, p.36-40, 1966.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279p.

FINLAY, K.W.; WILKINSON, G.N. The analysis of adaptaion in a plant-breeding programme. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.14, p.742-754, 1963.

GAUCH, H.G.; ZOBEL, R.W. AMMI analysis of yield trials. In:KANG, M.S.; GAUCH, H.G. (Ed.) **Genotype-by-environment interaction**. New York: CRC Press, 1996. 416p.

HORNER, T.W.; FREY, K.J. Methods of determining natural areas for oat varietal recommendations. **Agronomy Journal**, v.49, p.313-315, 1957.

KANG, M.S. Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development. **Advances in Agronomy**, v.62, p.199-252, 1998.

PATERNIANI, E. Interação de genótipo x ambiente em climas tropicais e sub-tropicais. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16., Belo Horizonte, 1986. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.378-382.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11.ed. Piracicaba: Nobel, 1985. 466p.

SILVA, J.G.C.; BARRETO, J.N. Aplicação de regressão linear segmentada em estudos da interação genótipo x ambiente. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 1., Campinas, 1985. **Resumos**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p.49-50.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill Book, 1960. 480p.

VAN EEUWIJK, F.A.; DENIS, J.-B.; KANG, M.S. Incorporating additional information on genotypes and environments in models for two-way genotype by environment tables. In: KANG, M.S.; GAUCH, H.G. (Ed.) **Genotype-by-environment interaction**. New York: CRC Press, 1996. 416p.

VERMA, M.M.; CHAHAL, G.S.; MURTY, B.R. Limitations of conventional regression analysis, a proposed modification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.53, p.89-91, 1978.

YATES, F.; COCHRAN, W.C. The analysis of groups of experiments. **Journal of Agricultural Science**, v.28, p.556-580, 1938.

23

MELHORAMENTO DE PLANTAS VISANDO RESISTÊNCIA A DOENÇAS

JOSÉ TADASHI YORINORI
ROMEU AFONSO DE SOUZA KIIHL

Embrapa Soja, C.P. 231 - CEP: 86001-970 - Londrina, PR.

1. IMPORTÂNCIA DAS DOENÇAS DE PLANTAS

Dos tempos bíblicos aos momentos atuais, as doenças de plantas têm sido responsáveis por grandes mudanças sociais, políticas, econômicas e científicas. Fatos importantes da saga do homem, frente às doenças de plantas, foram revistos por Holton *et al.* (1959) e Bergamin Filho & Kimati (1997). Desde o momento em que o homem passou a domesticar as plantas, nem sempre isso representou progresso. A agricultura é uma atividade dinâmica em que, no processo de produzir alimentos e matérias-primas para atender suas necessidades, o homem passou a ser o maior responsável pelo desequilíbrio ambiental. No lugar da vegetação que se desenvolveu por séculos ou milênios, a substituição da diversidade natural das plantas em milhares ou milhões de hectares, por uma ou poucas espécies geneticamente uniformes, tornou inevitável o surgimento ou o agravamento das doenças existentes. O homem aprendeu com os seus erros e os constantes desafios obrigaram-no a utilizar a inteligência para solucionar os problemas criados por ele.

Um exemplo clássico de desequilíbrio causado pelo homem e que teve conseqüência desastrosa, foi a falência do projeto de plantio de extensas áreas de seringueiras [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell. & Arg.] na década de 1920, pela implantação da Fordlandia pela *Ford Motor Company*, no Estado do Pará. Esse projeto foi totalmente inviabilizado pelo mal-das-folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx [comb. nov. = *Dothidella ulei* P. Henn. = *Melanpsamopsis ulei* [P. Henn.) Stahel) (*Fusicladium macrosporum* Kuyper). Resultados semelhantes foram observados em plantações de seringueiras no Panamá, Costa Rica e Colômbia (Thurston, 1973). As seringueiras suscetíveis que vegetavam em ambiente natural, diluídas no meio de uma vegetação densa e diversificada, apresentavam a doença, porém, em níveis toleráveis. Contudo, quando expostas em ambiente favorável, em uma grande população exclusiva, a plantação foi devastada pelo mal-das-folhas. Atualmente, a seringueira é cultivada em diversas áreas da região Central do Brasil, onde a fase vulnerável (vegetativa) das plantas ocorre quando as condições climáticas são desfavoráveis ao patógeno. O controle do mal-das-folhas através de resistência genética tem sido possível, porém, ainda apresenta limitações. O fungo *M. ulei* apresenta grande variabilidade patogênica, com 22 raças conhecidas no Brasil (Trindade & Furtado, 1997).

História semelhante ocorreu com o cultivo da batata na Europa, de 1845 a 1846 (Stackman, 1959). Originada das Américas (Guatemala, México, Peru), onde a cultura convivia com o fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, ao ser introduzida na Europa e cultivada em grandes extensões, foi devastada pelo patógeno que encontrou excelente ambiente para se multiplicar. O resultado foi a morte, por inanição, de 1,5 milhão de pessoas na Irlanda, pela falta do principal alimento que era a batata. A requeima da batata forçou também a migração dos sobreviventes para os Estados Unidos, onde uma nova nação estava em formação. A requeima da batata não só mudou o destino de um povo mas trouxe profundas contribuições cientificas e sociais, sendo fundamental para o desenvolvimento de um novo ramo da ciência.

Nascia a Fitopatologia moderna. No campo científico, a identificação da causa da requeima da batata (*P. infestans*) por de Bary, consolidou o fato de que organismos microscópicos eram capazes de causar doenças em plantas.

No campo socioeconômico, os danos causados pela requeima da batata permitiram derrubar as leis protecionistas que impunham pesadas taxas de importação de cereais na Irlanda, as quais favoreciam os ricos produtores locais a um custo exorbitante para a população. A requeima da batata e sua conseqüência social, foram os argumentos para a derrubada das leis que restringiam a importação de grãos, permitindo, dessa forma, aliviar a falta de alimento causada pela escassez da batata e fez com que a Grã-Bretanha ingressasse no livre comércio mundial (Stackman, 1959).

A fome de Bengala (*The Great Bengal Famine*) foi outro episódio na recente história da humanidade em que a epidemia de mancha parda do arroz, causada por *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan/*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler & Dastur, resultou em mais de dois milhões de pessoas mortas por fome, em Bengala, em 1942 e 1943. Historicamente, esse deve ser o maior dano que uma doença de planta já causou à humanidade (Padmanabhan, 1973).

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br., teve tamanho impacto sobre a cultura que mudou o hábito de tomar café dos burgueses britânicos que viviam na antiga colônia do Ceylon, hoje Sri Lanka. Devastada pela ferrugem e praticamente falida, a colônia substituiu o café pelo chá e estabeleceu um novo e agradável hábito de tomar o chá das 11 horas que denominaram de *elevenses-tea* (Horsfall & Cowling, 1978). No Brasil, a ferrugem do cafeeiro, com toda certeza, foi um importante fator na mudança do panorama agrícola do país, principalmente nas regiões de cultivo tradicional do Sul. A substituição dessa cultura perene por culturas anuais e mecanizadas, trouxe problemas sociais com o agravamento do desemprego no meio rural. Por outro lado, expandiu as áreas de plantio, principalmente nos Cerrados, introduziu profundas mudanças no sistema de cultivo, nos tratos fitossanitários e na colheita, melhorando a qualidade desse importante produto de exportação brasileiro.

O agente causal da ferrugem do cafeeiro, com suas 32 raças (as raças I, II, III e XV são as mais importantes), está hoje firmemente estabelecido em 13 países do hemisfério ocidental: Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia, na América do Sul; Nicarágua, El Salvador, Honduras e Guatemala, na América Central; e México, na América do Norte (Godoy *et al.*, 1997). No Brasil (Bahia), a ferrugem foi identificada em janeiro de 1970. Na maioria das áreas de cultivo, o controle da ferrugem do cafeeiro ainda é feito com o uso de fungicidas cúpricos ou sistêmicos (triadimefon, triadimenol e propiconazole), porém, já é possível contar com cultivares resistentes. O controle através da resistência genética é a forma mais eficiente e econômica, porém, exige um contínuo trabalho de melhoramento para fazer frente à variação genética do patógeno.

A podridão parda do cacaueiro, presente na Bahia desde 1917, é causada por distintas espécies de *Phytophthora*: *P. palmivora* (Butler) Butler, *P. capsici* Leonian, *P. citrophthora* (Smith) Leonian e *P. heveae*, sendo a *P. citrophthora*, a mais virulenta. Apesar de toda a pesquisa que tem sido desenvolvida sobre essa doença, ela ainda é responsável por perdas de 25% a 30% da produção. Seu controle é um exemplo da integração de diversas práticas como a poda, a remoção dos frutos doentes, o

uso de cultivares resistentes e o controle químico. Uma alternativa de controle, na falta de material com bom nível de tolerância é a utilização de táticas de fuga da doença: selecionar cultivares cujo pico de produção não coincida com as épocas de maior incidência de podridão parda (Dall Pria & Camargo, 1997). Atualmente, a maior ameaça ao cacaueiro é a doença chamada vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* Stahel (Singer) (Sin. *Marasmius perniciosus* Stahel). Conhecida desde 1898 na região Amazônica, foi introduzida no Estado da Bahia em 1989 e constitui hoje a maior ameaça à cacauicultura desse Estado que responde por 85% da produção brasileira (Dall Pria & Camargo, 1997). Essa doença é o maior problema socioeconômico da região cacaueira do Estado da Bahia, chegando a causar perdas de até 80% da produção anual das plantações infectadas (Albuquerque *et al.*, 1999).

O melhoramento para resistência à vassoura-de-bruxa tem sido feito no centro de pesquisa do cacaueiro (CEPLAC/ERJOH, Itabuna, BA) por seleção e propagação de clones resistentes e por avaliação de progênies oriundas de polinizações controladas ou abertas, entre clones e matrizes selecionadas como resistentes, em plantações altamente infectadas pelo patógeno (Albuquerque *et al.*, 1999; Silva & Luz, 1998; Luz & Silva, 1999). À semelhança da podridão parda, o controle da vassoura-de-bruxa exige medidas integradas de controle, envolvendo a poda fitossanitária, a remoção dos frutos infectados, o enterrio dos restos vegetais e aplicação de fungicidas (Dall Pria & Camargo, 1997). Cultivares ou clones resistentes estão ainda em fase de desenvolvimento.

Em 1970 e 1971, outra doença devastadora afetou a produção mundial de milho. Foi a helmintosporiose, causada pela raça T do fungo *Helminthosporium maydis* Nisik. [*Cocliobolus heterostrophus* (Drechs.) sin. *Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker], que devastou os híbridos originados de cruzamentos com germoplasma com gene para macho-esterilidade T, de herança citoplasmática. Cerca de 15% de todo o milho cultivado nos Estados Unidos, no ano de 1970 foi destruído, equivalendo a perda de 30 bilhões de hamburguers (*quarter-pounder* = *Big Mac*), se o milho perdido fosse convertido em carne. Na Inglaterra, cita-se que o custo da cevada para *whisky* teve um aumento de preço em 30%, em virtude da escassez do milho e sua substituição pela cevada na alimentação do gado. Esse foi um exemplo de vulnerabilidade genética onde todo o programa de melhoramento de milho dos Estados Unidos (Horsfall & Cowling, 1978) e de inúmeros outros países dependia de um citoplasma macho-estéril.

Entre as frutíferas perenes, os citros (*Citrus* spp.), pela sua importância econômica e extensão de cultivo, têm sido a mais afetada por doenças de difícil controle. Entre as diversas doenças, a tristeza, causada pelo "citrus tristeza vírus" - CTV, observada pela primeira vez no Brasil em 1937, o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* Vauterin *et al.* (1995), identificada em 1957, apesar do vasto montante de recursos e esforços já despendidos, continuam a causar danos à cultura. Atualmente, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (1987) e constatada pela primeira vez no Brasil em 1987, é o principal problema de laranjas doces enxertadas nos principais porta-enxertos utilizados no país. Não foi ainda encontrada em tangerinas Cravo e Poncan, tangor Murcote, limões verdadeiros e lima ácida Galego (Feichtenberger *et al.*, 1997). Para essa doença não há fonte de resistência; as medidas de controle têm efeitos parciais e

os pomares exigem constante monitoramento, medidas profiláticas e contínuo investimento na pesquisa.

Entre as culturas anuais, geralmente o controle das epidemias é mais fácil do que em culturas perenes. No caso da soja, as doenças como a mancha "olho-de-rã", causada por *Cercospora sojina* Hara (Yorinori, 1989), e o cancro da haste [*Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc. f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones/*Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. f.sp. *meridionalis* Morgan-Jones (Yorinori, 1996), apesar de terem causado grandes perdas, foram controladas com relativa facilidade. As perdas estimadas em cada caso foram, respectivamente, de US$100 milhões (Yorinori, 1989) e US$500 milhões (Yorinori, 1996). Em ambos os casos, a existência de fontes de resistência, com dominância completa e um forte programa de melhoramento, permitiu rápida troca das cultivares suscetíveis por resistentes.

Epidemias como as citadas acima, estão sempre sujeitas a ocorrerem e a maior ou menor perda na agricultura dependerá do grau de preparo técnico e científico do país na defesa contra as doenças.

2. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DAS DOENÇAS

As doenças constituem os principais fatores limitantes do rendimento e da qualidade da produção e, também, são os que exigem maior conhecimento técnico para controle. A estratégia mais eficaz e econômica de controle de doenças é o uso de cultivares resistentes, porém, nem sempre a solução é tão simples. Para um grande número de doenças, o grau de resistência é insuficiente para evitar perdas ao nível de dano econômico e pode exigir a adoção de medidas complementares como rotação/sucessão de culturas, aplicação de fungicidas, manejo da população e espaçamento de plantio, alteração da época de semeadura (ex. *Septoria glycines* Hemmi – mancha parda ou septoriose da soja, *Fusarium solani* f.sp. *glycines* – podridão vermelha da raiz da soja – PVR ou síndrome da morte súbita – SDS), poda e diversas medidas profiláticas (*Crinipellis perniciosa* – vassoura-de-bruxa do cacaueiro; *Phytophthora palmivora* – podridão parda do cacaueiro). Para outras, para as quais existem fontes de resistência, estas podem ser efêmeras, pela habilidade do patógeno em desenvolver novas raças ou biótipos, a cada vez que é desafiado com um novo gene de resistência na cultura. Esses casos exigem monitoramento contínuo do quadro de raças e desenvolvimento de novas cultivares (ex. *P. infestans* - requeima da batata, *Puccinica recondita* Rob. ex Desm. f.sp. *tritici* Eriks. & Henn - ferrugem da folha do trigo; *Puccinia graminis* Pers. f.sp. *tritici* Eriks. & Henn - ferrugem do colmo do trigo, *H. vastatrix* - ferrugem do cafeeiro, *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (sin. *P. oryzae* Cav.)[teleom. *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr] - brusone do arroz e do trigo, *Heterodera glycines* Ichinohe - nematóide de cisto da soja).

A resistência estável e permanente é menos freqüente, porém, quando existe, é a forma mais eficiente e econômica de controlar as doenças. Exemplos desse tipo são a helmintosporiose do milho, causada por *H. maydis* raça T, e para cancro da haste da soja, causada por *P. p.* f.sp. *meridionalis*/*D. p.* f.sp. *meridionalis*. No caso da mancha "olho-de-rã" em soja, apesar da variabilidade relativamente alta do fungo, com pelo menos 25 raças no Brasil (Yorinori & Klingelfuss, 1999), os genes de resistência utilizados (ex. da cultivar Davis) têm sido bastante estáveis.

Em função das alterações climáticas, que influem decisivamente na ocorrência das doenças, e das diversidades genéticas das culturas e dos patógenos, nunca se pode confiar demais em uma única estratégia de controle. Assim, para que a agricultura não esteja sujeita a constantes alterações, é fundamental adotar a estratégia de controle integrado, onde a resistência genética é um dos elementos do conjunto de medidas a serem adotadas. O controle integrado de doenças baseia-se na utilização de todos os fatores de produção, na melhor combinação de qualidade, quantidade e no momento oportuno, para que o efeito das doenças sobre a cultura seja o menor possível, propiciando o máximo de produtividade, estabilidade e rentabilidade. No caso da soja, a falta da adoção rotineira dessas medidas é responsável por perdas anuais estimadas em US$ 1,3 bilhão (Wrather *et al.*, 1997). Todavia, para que as medidas de controle de doenças sejam adotadas com mais facilidade, é também necessário que haja disponibilidade de tecnologias de controle, pesquisa e assistência técnica dinâmica e capacitada, mecanismos de transferência de tecnologia hábil e eficiente e, finalmente, mercado e preços adequados para as culturas alternativas que devem fazer parte da rotação/sucessão de culturas, no caso das culturas anuais.

3. MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS E ALCANCE DOS RESULTADOS AO NÍVEL DO PRODUTOR

O controle de doenças através da resistência genética é a forma mais econômica e eficaz, porém, para a maioria das doenças a resistência genética não existe, existe em nível baixo ou a resistência é quebrada por variabilidade genética/patológica do agente causal, exigindo maior participação das práticas culturais para um controle duradouro.

Para que um programa de melhoramento visando resistência a doenças seja justificado e atinja seus objetivos, é necessário satisfazer os seguintes requisitos: a) que seja relevante e economicamente importante; b) detecção do problema na fase inicial ou da sua identificação como problema potencial; c) disponibilidade de fonte(s) ou gene(s) de resistência; d) disponibilidade de um banco de germoplasma, com grande variabilidade genética; e) disponibilidade de métodos de melhoramento para o desenvolvimento de cultivar resistente; f) patógeno pouco ou não variável ou gene de resistência estável; g) condições adequadas de laboratório e de casa de vegetação; h) condições adequadas para pesquisas a campo; i) cooperação estreita entre o melhorista e o fitopatologista; j) disponibilidade de metodologia de inoculação e de avaliação das reações das plantas inoculadas; k) disponibilidade de pessoal de apoio para a produção de inóculo e de inoculação de grande número de linhagens; l) capacidade do programa em expor as linhagens melhoradas à maior diversidade de ambiente e de variabilidade patogênica.

O presente capítulo aborda os procedimentos mais simples e exeqüíveis de melhoramento para resistência a doenças, de baixo custo, e que ainda é a solução para a maioria das doenças, deixando de lado o uso da biologia molecular e plantas trangênicas. Atualmente, a genética molecular ou a engenharia genética, prometem avançar ainda mais o processo de desenvolvimento de plantas com características específicas através de alterações no genoma da planta (Lambais, 1995). Todavia, até

que isso aconteça, o controle eficaz e duradouro das doenças de plantas ainda depende da adoção do manejo integrado da cultura, no qual a resistência genética é um dos componentes do sistema de produção. O desenvolvimento de plantas transgênicas ou transformadas, podará ser a solução para diversas doenças de difícil controle como a podridão vermelha da raiz da soja (PVR), a vassoura-de-bruxa do cacaueiro, da brusone do arroz, das ferrugens da folha e do colmo do trigo, da requeima da batata, e de tantas outras, cujos patógenos são variáveis e o controle exige o uso de grandes quantidades de produtos químicos. No caso do trigo, o uso de genes estranhos (*alien genes*) tem sido considerado como uma forma de melhoramento para resistência mais duradoura às ferrugens (Jones *et al.*, 1995).

A eficiência na solução de um problema de doença através da resistência genética depende do atendimento dos seguintes requisitos: a) da agilidade no desenvolvimento de cultivares resistentes; b) da capacidade de produção de semente genética, básica e certificada, para atendimento adequado da demanda criada pela doença; c) da eficiência e abrangência do *marketing* da nova cultivar, pelos órgãos de pesquisa, de extensão e assistência técnica; d) da capacitação técnica, da agilidade e da eficiência da assistência técnica no convencimento dos produtores quanto à importância da doença a ser controlada e da necessidade de substituir a cultivar suscetível pela resistente; e) da rapidez de uso da nova cultivar pelos produtores, antes que sejam motivados por severas perdas.

4. MÉTODOS DE MELHORAMENTO

O desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças segue os mesmos procedimentos de um programa de melhoramento convencional, com a diferença de que, a cada etapa do melhoramento, são realizados testes de inoculações artificiais ou exposição das linhagens em avanço de gerações aos patógenos específicos para os quais se quer melhorar. O processo passa pela seleção de plantas resistentes em meio a uma população suscetível e evolui para cruzamentos específicos para agregação dessa característica em cultivares já melhoradas. No melhoramento para resistência a doenças, o que há a mais, é a ênfase que é dada na escolha específica dos parentais, que devem ter a(s) fonte(s) de resistência à doença que se deseja controlar e a avaliação da reação das progênies frente aos patógenos, através de inoculações artificiais ou submetendo-as a ambientes onde os patógenos ocorrem naturalmente. Geralmente, em programas de melhoramento genético, os testes para reação às principais doenças são realizadas simultaneamente com o avanço das gerações. Paralelamente devem ser realizados os estudos da variabilidade patogênica, quando o agente causal apresenta variabilidade.

Detalhes sobre procedimentos específicos de melhoramento para resistência a doenças das culturas de importância econômica já foram abordados por diferentes autores, cuja leitura é recomendada (Browning *et al.*, 1977; Camargo & Bergamin Filho, 1995; Deadman, 1998; Fehr, 1987; Poehlman & Sleper, 1995; Van der Plank, 1968; Walker, 1959; 1966). No presente capítulo são abordados os aspectos práticos que devem ser considerados em um programa de melhoramento para resistência a doenças, principalmente para as condições brasileiras. Ainda hoje, as mais antigas doenças de plantas, como as ferrugens do trigo, que afligem a humanidade há mais

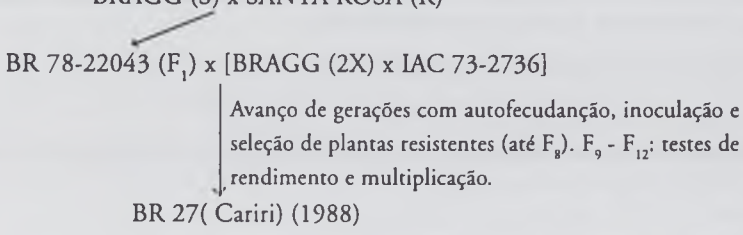
de 2.000 anos, ainda exigem medidas simples como melhoramento genético convencional, controle químico e, principalmente, acompanhamento do que ocorre ao nível de campo.

Os métodos de melhoramento utilizados dependem dos objetivos e dos métodos de inoculação a serem utilizados para avaliar a expressão dos sintomas que permitam diferenciar a reação dos genótipos em estudo. Assim, para doenças cuja resistência é oligogênica e controlada por genes dominantes, os métodos mais simples de combinação ou transferência (cruzamentos) de genes permitem rápido avanço de gerações e obtenção de novas cultivares. Por outro lado, para doenças em que a herança da resistência é mais complexa como resistência horizontal, poligênica, tolerância (Jones, 1998), como a grande parte das doenças radiculares, causadas por fungos e nematóides, os cruzamentos são complexos e os avanços de gerações dependem de seleções dentro de populações de progênies, do tipo seleção de plantas e seleção massal. Nestes casos, a eficiência da seleção pode ser muito baixa devido à grande influência que o ambiente pode ter na severidade da doença.

De modo geral, são dois os principais objetivos do melhoramento genético: a) correção de defeitos (ex. suscetibilidade a doenças) de uma cultivar comercial e b) criação de novas cultivares, com finalidades diversas. No caso da correção de defeitos, são feitos retrocruzamentos para introdução de um ou mais genes de resistência em uma cultivar comercial de alto valor. Para que a escolha da(s) fonte(s) de resistência seja a melhor possível, é necessário conhecer a herança da resistência, a variabilidade do patógeno e a resistência ou suscetibilidade da fonte a outras doenças importantes da cultura. Com base no conhecimento da herança da resistência é definido o procedimento a ser adotado no melhoramento. Além da variabilidade patogênica, a durabilidade de uma cultivar depende também da capacidade do programa em expor essa cultivar ou linhagem à maior variabilidade possível de ambientes onde a mesma possa ser adaptada.

Os métodos mais comuns de melhoramento de plantas autógamas são: a) introdução de germoplasma; b) seleção massal de plantas resistentes; c) seleção de linhas puras; d) método genealógico; e) métodos SSD (*single seed descent*) e MSSD (*modified single seed descent*); f) método das populações segregantes (*bulks*); g) método do retrocruzamento; h) método da seleção recorrente.

Apesar da grande variabilidade patogênica do fungo *C. sojina* (mais de 25 raças no Brasil) que causa a doença mancha "olho-de-rã" em soja, a resistência à doença é controlada por poucos genes (resistência oligogênica) dominantes. Esses genes têm sido estáveis, com raros casos de quebra de resistência. Um exemplo de quebra de resistência ocorreu com a cultivar Santa Rosa que se tornou suscetível com o surgimento da raça Cs-15 de *C. sojina*. A cultivar de soja BR-27 (Cariri), desenvolvida a partir do cruzamento das cultivares Bragg (S-suscetível) com a Santa Rosa (R-resistente), foi dizimada no primeiro ano de sua multiplicação, pela raça Cs-15 de *C. sojina* (Yorinori *et al.*, 1989). A cultivar Santa Rosa manteve-se resistente à mancha "olho-de-rã" por mais de 20 anos (até 1988/89) e, devido à sua rusticidade e ampla adaptação, foi fonte de resistência durante muito tempo, dando origem a diversas cultivares de soja. A seguinte seqüência de retrocruzamento e cruzamento triplo, foi utilizada:



BR 27 (Cariri): resistente a 21 das 22 raças e suscetível à raça Cs-15, detectadas em Balsas-MA e Tangará da Serra-MT. Retirada de recomendação no primeiro ano de lançamento e multiplicação.

A resistência ao nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) e à podridão radicular de Phytophthora (*P. megasperma* f. sp. *glycinea*) são de relativa curta duração, devido à grande variabilidade e virulência dos patógenos. No caso do nematóide de cisto da soja, a expressão de danos por uma determinada raça, na realidade, indica a predominância da raça em uma população heterogênea. Quando se controla a doença através de uma cultivar resistente, específica à raça dominante, o tempo de vida dessa cultivar, no caso de monocultivo, dependerá do tempo que irá levar para a multiplicação da população da raça capaz de causar níveis de danos econômicos na nova cultivar.

4.1 TIPOS DE HERANÇA DE RESISTÊNCIA

a) Herança simples, com dominância completa para resistência (ex. mancha "olho-de-rã", cancro da haste, podridão radicular de *Phytophthora* em soja):
3 R (resistente) : 1 S (suscetível)

b) Herança simples, com resistência recessiva (ex. pústula bacteriana)
3 S (suscetível) : 1 R (resistente)

c) Herança com dois ou mais locos envolvidos na resistência:
9 : 3 : 3 : 1 = genes independentes
9 : 6 : 1 = epistasia
9 : 7 = epistasia
15 : 1 = epistasia*

*=Herança da resistência ao cancro da haste na cv. Tracy-M, com dois genes dominantes
Ex. Dois locos: AB, Ab, aB, ab.

Epistasia: modificação na proporção (herança) genética básica devido à interação entre genes não alélicos que afetam o mesmo caráter fenotípico (Poehlman & Sleper, 1995).

4.2 TIPOS DE CRUZAMENTOS PARA TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA

a) Cruzamentos simples: R x S ou S x R
b) Cruzamentos duplos: $(R_1 \times S_1) \times (R_2 \times S_2)$
c) Cruzamentos triplos: S x (R x S); R x (R x S); S x (R x R)
d) Cruzamentos múltiplos: Diversas combinações para incorporação de distintos genes de resistência a uma ou mais doenças.
e) Retrocruzamentos (melhoramento corretivo)

4.3 MÉTODOS MAIS COMUNS DE MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA À DOENÇAS, PARA LEGUMINOSAS

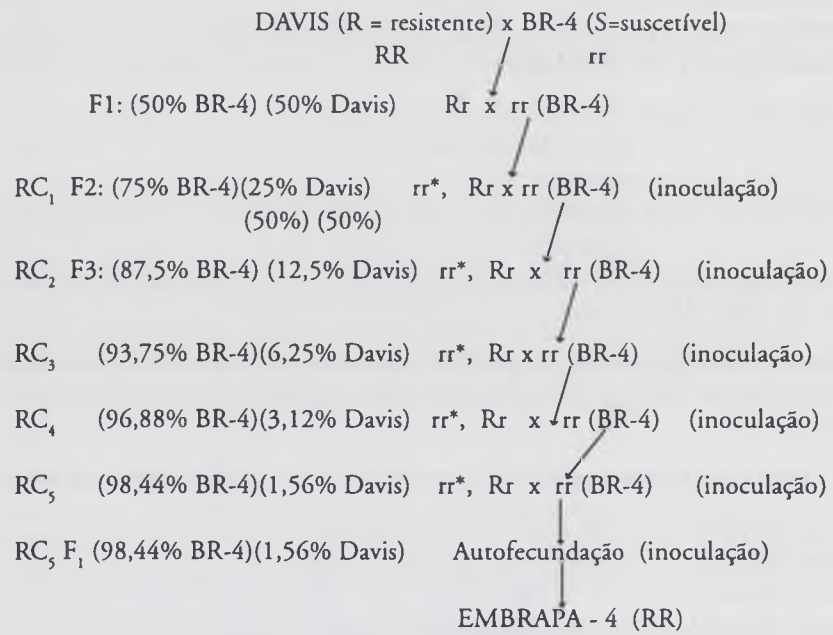
Herança oligogênica dominante

a) Retrocruzamento (*backcross*)
b) Método genealógico
c) SSD (*single seed descent*)
d) MSSD (*modified sigle seed descent*)
e) *Bulk*

a) **Retrocruzamento** (melhoramento corretivo)

O melhoramento através do retrocruzamento é conhecido como um método corretivo, no qual, corrige-se o defeito de uma cultivar já melhorada (ex. suscetibilidade à doença mancha "olho-de-rã" na cultivar BR-4). O retrocruzamento é usado principalmente para transferir características controladas por poucos genes (resistência oligogênica).

Um exemplo de melhoramento para resistência à doença com resistência simples, dominante, através do retrocruzamento (RC) foi o desenvolvimento da cultivar EMBRAPA-4, resistente à mancha "olho-de-rã" (*C. sojina*). Nesse método, a cultivar resistente (Davis) foi cruzada com a cultivar suscetível (BR-4), cuja característica se desejava manter com a adição da resistência à mancha "olho-de-rã". A progênie resistente desse cruzamento foi novamente cruzada com a BR-4 e selecionada nova linhagem resistente. Esse procedimento foi seguido com cinco retrocruzamentos (RC_5), quando praticamente todas as características agronômicas da cultivar Bragg tinham sido restauradas na nova linhagem resistente. A cada etapa foi feita a inoculação de *C. sojina* para seleção da linhagem (Rr) retrocruzada (RC) com a cv. BR-4 (rr).



*Plantas suscetíveis descartadas.

Após RC_5 , segue-se o avanço de gerações por autofecundação, continuando as inoculações e eliminação das eventuais plantas suscetíveis.

OBS: Nos retrocruzamentos foram utilizadas as plantas Rr (resistente heterozigota) como parentais masculinos. A cultivar recorrente (BR-4) foi utilizada como parental feminina.

Em cada etapa (RCs) foram feitas inoculações com *C. sojina* para eliminação das plantas suscetíveis (rr) e seleção das plantas resistentes (Rr), estas utilizadas como parentais masculinos no retrocruzamento.

b) Método genealógico (*pedigree*)

Cruzamento: S (cv. suscetível) x R (cv. resistente)
Gerações: F_1 .... Semear e selecionar 5-20 plantas F_1.
F_2 .... Semear espaçadas de modo a ter 2.000-3.000 plantas. Inocular e colher plantas resistentes, com características superiores.
F_3 a F_5 .... Semear espaçadas as sementes de cada planta em linhas individuais, de modo a distinguir as linhas superiores. Em cada linha superior selecionada, coletar 3-5 melhores plantas resistentes. As sementes das 3-5 plantas de cada linha são identificadas e mantidas separadamente, de modo a constituir uma "família". Ao final da geração F_5, deverá haver 25 a 50 famílias.
F_6 ....Semear as famílias com as respectivas plantas selecionadas em linhas (3-5). As melhores linhas são colhidas, formando linhagens experimentais.
$F_{7:6}$ ... Semear cada linhagem em parcela para avaliação de rendimento, comparando com uma cultivar padrão.
$F_{8:6}$ a $F_{10:6}$ .... Seguir com os ensaios de rendimentos, em vários locais, comparando com uma cultivar padrão comercial.

c) Método SSD (*single seed descent*) – descendência de uma semente

Nesse método, de cada planta F_2, resultante de um cruzamento, é tomada uma semente a qual é semeada na safra seguinte e novamente tomada uma semente de cada planta selecionada. Esse procedimento é repetido até a geração F_5, quando então, são selecionadas e colhidas plantas. As sementes de cada planta são semeadas em linhas individuais. Em F_6, as linhas selecionadas são colhidas separadamente, cada linha constituindo novas linhagens. As linhagens selecionadas farão parte do primeiro ensaio preliminar. Nos dois anos seguintes, serão realizados ensaios de rendimento em diferentes localidades. As melhores linhagens terão suas sementes multiplicadas e serão liberadas como novas cultivares.

OBS: No procedimento usando o método "SSD", a cultivar pode ser originada da primeira semente tomada de uma vagem e suas gerações cultivadas continuamente em linhas separadas, mantendo-se sua identidade original, como descrita acima (Poehlman & Sleper, 1995). Na Embrapa Soja, Londrina, esse método foi ligeiramente modificado e poderia ser denominado de SSD – *bulk*. De cada planta resultante da combinação de um cruzamento, é tomada uma vagem. As sementes assim obtidas, de várias plantas de um cruzamento, são misturadas e semeadas nas gerações futuras, colhendo as plantas em *bulk*, em cada avanço de geração. De modo geral, em cada geração são obtidas cerca de 2.000 plantas. A partir da geração F_6, são selecionadas as

melhores plantas, as quais são trilhadas e suas sementes plantadas em linhas que são identificadas como novas linhagens. A partir da geração F_6, as linhagens selecionadas farão parte do primeiro ensaio de competição de rendimento. Segue-se daí, o procedimento normal, com testes de rendimento, avaliação das demais características agronômicas, lançamento como nova cultivar e multiplicação de semente.

d) MSSD = SSD modificado

De cada planta F_2, resultante de um cruzamento, é obtida uma vagem com duas ou três sementes. Nesse caso, diferente do procedimento de SSD, não se garante que as plantas em gerações avançadas se originam, cada uma, de uma planta F_2 diferente. As gerações seguintes (F_3 e F_4) terão uma população de aproximadamente 2000 plantas. Na geração F_5, são selecionadas as melhores plantas e suas sementes semeadas em linhas individuais. As melhores linhas serão selecionadas e suas sementes farão parte do primeiro ensaio de competição de rendimento. Segue-se daí o procedimento normal até o lançamento de uma nova cultivar.

e) *Bulk*

Nesse método, as sementes F_1 (50-100 sementes) de um cruzamento (ex. cv. A x cv. B) são reunidas (*bulked*) e semeadas em linhas ou parcelas. Em F_2 as sementes de todas as plantas de um cruzamento são novamente semeadas,em quantidade que permita ter 3000-5000 plantas. Em F_3 e F_4, repete-se o procedimento. Em F_5 são semeadas 3000-5000 sementes da geração *bulk*-F_4, com espaçamentos mais amplos, de modo a facilitar a seleção das melhores plantas. Na colheita, selecionar 300 a 500 plantas e manter as sementes de cada planta separadamente. Em F_6, as sementes de cada planta são semeadas em linhas individuais e as melhores selecionadas. No ano seguinte é realizado o primeiro ensaio preliminar de rendimento. Após três anos de ensaios de rendimento em várias localidades, as melhores linhagens são multiplicadas para futuro lançamento como novas cultivares.

No programa de melhoramento da Embrapa Soja, em Londrina, segue-se o mesmo procedimento descrito acima, com a diferença de que, cada população em *bulk*, pode ser constituída da reunião de vários cruzamentos, perdendo-se a identidade genealógica da cultivar.

5. INOCULAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

A partir da geração F_2, em cada uma das etapas, poderão ser feitas as inoculações para seleção das plantas resistentes à doença em estudo. Quanto mais cedo (gerações iniciais) forem realizadas as inoculações e selecionadas as melhores plantas resistentes, maior será a chance de obter plantas resistentes, com as características agronômicas desejadas e com menor custo do programa de melhoramento.

6. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA

O primeiro passo para se iniciar um programa de melhoramento de plantas visando ao controle de doenças através da resistência genética, é conhecer o quadro de doenças que afetam a cultura em questão, as fontes e a herança da resistência para cada

doença. Para isso, inicialmente, deve-se recorrer as literaturas disponíveis, que hoje são bastante fartas, atendendo a praticamente todas as espécies de importância econômica, como o algodão (Watkins, 1981), o amendoim (Porter *et al.*, 1984), a batata (Hooker, 1981), a ervilha (Hagedorn, 1985), a cevada (Mathre, 1987), o feijão (Hall, 1994; Sartorato & Rava, 1994; Zaumeyer & Meiners, 1975; Zaumeyer & Thomas, 1957; Zimmerman *et al.*, 1988; Yorinori, 1984), o milho (Shurtleff, 1980), a soja (Gazzoni & Yorinori, 1995; Sinclair & Backman, 1989; Hartman *et al.*, 1999; Tisselli, 1980; Yorinori, 1984; 1994), o sorgo (Frederiksen, 1996), o trigo (Mehta, 1993; Wiese, 1991), e diversas outras culturas (Kimati *et al.*, 1997; Vale & Zambolim, 1997).

Para cada tipo de patógeno (bactéria, fungo, vírus, nematóide, micoplasma) deve-se conhecer a sua forma de multiplicação, ter as metodologias de produção de inóculo, de inoculação e de avaliação dos sintomas expressos, que permitam distinguir entre os diferentes graus ou níveis de severidade da doença entre o germoplasma em estudo. Para isso, é fundamental a existência de infra-estruturas (ex. laboratório, casa de vegetação), recursos humanos e locais adequados (campo experimental ou lavouras) onde o ambiente seja propício para a execução dos testes necessários.

Patógenos necrotróficos (fungos e bactérias) que afetam a parte aérea das plantas e que produzem propágulos (conídios, ascosporos, células bacterianas) com facilidade em meios artificiais, geralmente são os mais fáceis de manipular. Uma vez produzido o inóculo, basta aspergir ou causar ferimento no tecido das plantas em estudo e ter ambiente adequado para reprodução dos sintomas. Por outro lado, diversos fungos necrotróficos [ex. *Phaeosphaeria maydis*, espécies de *Alternaria*, *Corynespora cassiicola* (Berk. & Kurt.) Wei], não esporulam com facilidade em meios artificiais. Nestes casos, é essencial que as avaliações das linhagens, quando em grande número, sejam feitas em áreas ou regiões onde as doenças ocorrem naturalmente.

Patógenos biotróficos, como os fungos das ferrugens, do oídio e do míldio, não são passíveis de cultivo em meios artificias e as inoculações são feitas com esporos coletados de plantas suscetíveis, previamente infectadas, ou através da exposição das linhagens em ambiente onde as doenças ocorrem naturalmente. Diversos patógenos (fungos) que afetam o sistema radicular (*Rhizoctonia solani*, espécies de *Fusarium*, de *Phytophthora* e de *Rosellinia*) são facilmente multiplicados em laboratório, porém, não reproduzem os sintomas com muita facilidade em ambientes de casa de vegetação, necessitando, freqüentemente, complementar os testes a campo, onde as doenças ocorrem naturalmente. Todavia, nem sempre os resultados obtidos são confiáveis. De modo geral, a distribuição da população do patógeno não é uniforme e a ocorrência da doença e sua severidade são afetadas pelas condições climáticas da safra. Nesse caso, deve-se selecionar locais onde a doença costuma ocorrer naturalmente e semear a mesma coleção de linhagens nessas áreas.

O critério de avaliação da reação das doenças pode variar de acordo com os órgãos afetados das plantas. No caso das doenças foliares, normalmente a avaliação é feita pela severidade expressa em porcentagem da área foliar infectada ou pelo número e tamanho das manchas. Quando são afetados os órgãos de reprodução (vagens ou frutos), as avaliações são baseadas na proporção (número) de órgãos afetados ou na severidade dos danos causados. No caso de doenças radiculares, a avaliação da severidade da doença pode ser baseada na porcentagem de plantas mortas ou no grau

de necrose ou dano nas raízes. Freqüentemente, os dados de severidade das doenças são comparados com dados de rendimento. Em todos os casos, a discriminação dos níveis de resistência ou suscetibilidade é baseada na comparação com padrões resistente ou suscetível (James, 1971).

Para doenças causadas por nematóides (ex. nematóides de galhas e nematóides de cisto), os nematóides são multiplicados em hospedeiros suscetíveis e as inoculações são feitas com quantidades definidas de ovos ou larvas. No caso dos nematóides de galhas, as reações das linhagens são baseadas na severidade de galhas ou na taxa de reprodução, comparando com padrões resistentes e suscetíveis. No caso do nematóide de cisto da soja, a avaliação da reação das linhagens é feita em torno de 28-30 dias após a semeadura/inoculação, fazendo-se a contagem do número de cistos (fêmeas) visíveis nas raízes das plantas. A definição da reação de cada linhagem é baseada na comparação do número de cistos entre padrões suscetíveis e resistentes (Dias *et al.*, 1999; Riggs & Wrather, 1995).

Para as viroses, os métodos de inoculação e avaliação da reação dos genótipos podem variar grandemente, dependendo da forma de inoculação. No caso do mosaico comum da soja (SMV) e do mosaico comum do feijoeiro (VMCF), por exemplo, os vírus são facilmente transmitidos mecanicamente e através de pulgões (*Aphis gossypii, Myzus persicae* e outros). A avaliação da reação das linhagens pode ser baseada no grau de severidade dos sintomas de mosaico, pela porcentagem de sementes manchadas (semente "café" no caso da soja) e pela transmissibilidade do vírus através das sementes. Os vírus da queima do broto da soja (VQBS) e do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) não são transmitidos mecanicamente, podendo os sintomas serem reproduzidos somente através da inoculação com seus vetores naturais. No caso da soja, o VQBS é transmitido por trips (*Thrips tabaci* e *Frankliniella occidentalis*) (Almeida, 1994) e o VMDF, pela mosca branca, *Bemisia tabacci* (Sartorato & Rava, 1994).

Dependendo da dimensão do programa de melhoramento, do número de doenças para as quais se deseja introduzir resistência e da abrangência geográfica da cultura, o volume de trabalho demandado pode ser bastante grande e oneroso. No programa de melhoramento da Embrapa Soja, em Londrina, são consideradas como doenças prioritárias a mancha "olho-de-rã" (*C. sojina*), o cancro da haste (*P. p.* f.sp. *meridionalis*/*D. p.* f.sp. *meridionalis*), a mancha alvo (*C. cassiicola*] e a podridão vermelha da raiz (PVR/SDS). Somente para cancro da haste são avaliadas, anualmente, cerca de 10.000 linhagens, inoculadas pelo método do palito-de-dente. Para mancha "olho-de-rã", cerca de 25 ha de linhagens são inoculadas por aspersão na área experimental da Embrapa Soja. Paralelamente, linhagens em gerações avançadas são avaliadas para rendimento e reações de doenças a campo, em cerca de 20 localidades, envolvendo os Estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Bahia, com o envolvimento de diversas instituições: Fundação MT (Rondonópolis), Fundação Goiás/ Embrapa Cerrados – CPAC (Brasília), Fundação Bahia (Barreiras), FUNAP/EPAMIG (Uberaba) e participação de cooperativas e Associações de produtores de sementes.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Na agricultura, a batalha entre a planta e o patógeno é uma luta contínua em que, para seu equilíbrio, exige um esforço conjunto, multidisciplinar. Os

conhecimentos acumulados em mais de 100 anos de pesquisas sobre controle das doenças das plantas cultivadas não conseguiram evitar o pesado fardo imposto pelos patógenos na produção de alimentos e matérias-primas. Apesar do grande avanço da Ciência Agrícola, cujo nome já é considerado ultrapassado e pejorativo em muitos países desenvolvidos, com os novos conceitos de soluções modernas que preferem denominar de biotecnologia, biologia molecular ou engenharia genética, as velhas doenças como a ferrugem do trigo, a requeima da batata e tantas outras, ainda exigem ou são controladas com os velhos métodos do melhoramento convencional e químicos tradicionais. O avanço da ciência nos países desenvolvidos e a tendência do patenteamento e cobrança de direitos de propriedade sobre genes descobertos em germoplasma selvagem, poderá dificultar o acesso a materiais essenciais para solução de futuros problemas em países que fazem pouco investimento em pesquisa agrícola. Nesses países, como no Brasil, onde pouco se investe na busca e preservação de germoplasma, a solução de problemas de doenças poderá ser cada vez mais onerosa e difícil. A modernização é essencial como parte da evolução, porém, é fundamental que ela esteja apoiada em alicerces firmes, bem fundados, do conhecimento básico da epidemiologia, da genética e da interação planta-patógeno-ambiente.

Nem sempre o desenvolvimento científico e a geração de conhecimentos representam progresso na agricultura. Freqüentemente, a falta de mecanismos ou condições para disseminar os conhecimentos e torná-los de uso rotineiro, tornam inúteis os investimentos realizados e as perdas seguem ocorrendo nas lavouras. O mesmo ocorre com a sociedade humana, onde o desenvolvimento científico e tecnológico nem sempre reflete no bem estar da população. O Brasil é, reconhecidamente, um dos países onde a medicina está em níveis mais avançados, porém, é também, um dos países onde a população como um todo, menos se beneficia dessa situação. A agricultura de países ricos, que dispõem da tecnologia e a utilizam adequadamente, tem menos problemas do que os países, onde, mesmo tendo acesso às tecnologias, negligenciam o seu uso.

Com o aumento da população mundial e a migração da população rural para os grandes centros urbanos, cada vez mais, menos pessoas estarão sendo responsáveis pelas atividades de produção de alimentos e matérias-primas no campo. Nesse processo, torna-se inevitável o aumento do risco de ocorrência de epidemias capazes de dizimar lavouras inteiras, até que novas fontes de resistência ou estratégias de controle sejam incorporadas para contra-atacar o novo patógeno ou raça surgida. A grande questão é quem terá mais agilidade para vencer: o homem, com sua inteligência e desenvolvimento científico, porém, muitas vezes distante da realidade do campo, ou os patógenos que seguem as leis da natureza e não estão interessados em política e nem em meios escusos para desvio das verbas, mas encontram terreno fértil e vicejante a cada vez que novas cultivares desafiam sua sobrevivência. O contra-ataque a uma epidemia, seja em seres humanos, animais ou plantas, exige ação rápida, infra-estrutura, conhecimento da causa, treinamento especializado e um eficiente meio de comunicação. Nesse jogo da vida, é fundamental que o País seja dotado de instituições de pesquisa competentes e bem estruturadas, com pessoal científico e técnicos treinados, em todos os níveis, da ciência mais sofisticada ao nível do produtor. O que normalmente acontece, é a falta de técnicos treinados e motivados no campo, a

ausência de recursos no momento oportuno e os produtores demoram a responder ao chamado de adotar as tecnologias preconizadas, mesmo quando disponíveis. De modo geral, as ações curativas são adotadas de acordo com o montante do estrago ocorrido e não para evitar o desastre.

A fim de que as perdas de rendimento por doenças sejam minimizadas, é importante que sejam fortalecidos os programas de pesquisa e desenvolvimento científico, de ensino e assistência técnica, com maior interação pesquisa-ensino-extensão, maior empenho governamental e da iniciativa privada no estímulo à diversificação agrícola, viabilizando o sistema de produção (rotação-sucessão de culturas e pecuária); maior dotação de infra-estrutura no meio rural, e, principalmente, determinar o uso adequado dos recursos disponíveis para que a pesquisa básica esteja sempre a serviço da solução dos problemas e não puramente a serviço da ciência, pela ciência. Todo recurso, público ou privado, deve ter sempre uma finalidade social.

A diversidade genética é a maior garantia da estabilidade de produção, da produtividade e da sobrevivência da humanidade, porém, a evolução da produtividade agrícola tem sido baseada, principalmente, na uniformidade genética, colocando a atividade agrícola em situação de contínua vulnerabilidade genética e risco de perdas por doenças. Ao nível mundial, a cada ano, menos agricultores estarão envolvidos na produção de alimentos e matérias-primas para um maior contingente urbano; e a agricultura estará cada vez mais especializada e cultivando plantas geneticamente mais uniformes. Nesse cenário, a sobrevivência da humanidade dependerá da existência de uma estrutura de pesquisa capaz de reagir prontamente ao surto de novas epidemias. A natureza é muito mais sábia do que se imagina e a cada momento pode surpreender com novos biótipos ou raças capazes de causar grandes estragos. O melhoramento genético, sem considerar a variabilidade patogênica pode levar à perda de genes de resistência, resultando na erosão genética. Por outro lado, o contínuo melhoramento para resistência vertical, por sua facilidade de identificação, de manipulação e incorporação em novas cultivares, e pelo alto nível de resistência, pode conduzir à perda da resistência horizontal, o que foi denominado de "efeito Vertifolia", em alusão à cultivar de batata Vertifolia, selecionada para resistência vertical e que, no processo, perdeu a resistência horizontal. A resistência horizontal enfatiza a resistência vertical (Van der Plank, 1963).

O melhoramento contínuo para produtividade e demais características agronômicas, sem levar em conta os testes contra doenças de importância econômica, pode, ao longo do tempo, eliminar os genes de resistência. Isso é o que, provavelmente, ocorreu com os híbridos e cultivares de milho que, durante décadas estiveram confinados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. À medida que o milho se expandiu para as regiões Central e Norte do País, onde as condições climáticas são mais favoráveis aos patógenos, passou a ser severamente afetado pelas ferrugens (*Puccinia sorghi* Schw e *P. polysora* Underw.), pela mancha foliar de Phaeosphaeria [*P. maydis* (P. Henn.) Rane, Payak & Renfro] e a mancha foliar de Helminthosporium [*H. turcicum* Pass. (syn. *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs] (Shurtleff, 1980).

A recente epidemia de mancha de Cercospora no milho (*Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels e *Cercospora sorghi* var. *maydis* Ell. & Ev.) pode ser um

novo exemplo de perda de resistência e de variação patogênica de fungos que, durante muito tempo, foram considerados como de pouca importância econômica e para os quais, não se deu a devida importância nos programas de melhoramento do milho.

Na cultura da soja, o Brasil necessita estar preparado para a ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd.) (Bromfield, 1984), ausente apenas no continente americano (Sinclair & Hartman, 1995), e para a mancha vermelha (*red leaf blotch*) [*Pyrenochaeta glycines* R.B.Stewart/*Dactuliochaeta glycines* (R.B. Stewart) Hartman & Sinclair], presentes em alguns países da África, principalmente na Zambia e no Zimbábue (Datnoff *et al.*, 1987; Hartman *et al.*, 1987). Essas duas doenças, para as quais não há resistência vertical, poderão causar perdas significativas à soja brasileira, principalmente na região dos Cerrados.

Uma afirmação que continua válida após mais de 40 anos, foi feita por Walker (1959): "O sucesso final da resistência como medida de controle depende da busca contínua de informação básica, da contínua busca de germoplasma e da integração contínua em um amplo programa de melhoramento da cultura considerada".

8. BANCOS MUNDIAIS DE GERMOPLASMA

Os bancos de germoplasma têm a finalidade de coletar, identificar, conservar e colocar à disposição da pesquisa e da sociedade o acervo genético da flora mundial, em benefício da humanidade. Lamentavelmente, o que se observa, é a rápida devastação dos recursos genéticos mundiais, em conseqüência do aumento populacional e ocupação das áreas agricultáveis. Esse problema é mais grave nas regiões tropicais onde há maior densidade populacional, maior devastação dos recursos naturais, maior índice de pobreza, menor investimento em pesquisa, porém, é justamente onde está concentrada a maior biodiversidade. A seguir são listadas as principais fontes de germoplasma disponíveis no mundo.

I. Bancos naturais - Centros de origem das espécies cultivadas (Lenné & Wood, 1991; Leppik, 1970):

Culturas: Amendoim - Brasil e países vizinhos
Arroz - Ásia
Batata - Guatemala, México, Peru
Cacau - Amazônia
Girassol - América do Norte
Milho - México, Peru e Colômbia
Seringueira - Amazônia
Soja - China (Ásia)
Trigo - Oriente Médio

II. Bancos de conservação de germoplasma naturais e/ou introduzidos (artificiais)

1. ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER - AVRDC
Tainan, República da China (Taiwan).
Culturas: Feijão mungo (Mungbean), soja, arroz, feijão, caupi, trigo, milho, essências nativas e hortaliças (batata-doce, tomate, hortaliças folhosas e outras).

2. EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA - CENARGEN
Brasília, DF (Brasil)
Culturas: Espécies de importância econômica para o País e essências nativas.

OBS. Além do acervo geral localizado no CENARGEN, os Centros Nacionais de Pesquisa por Produtos (por exemplo: Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia-GO; Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG; Embrapa Soja, Londrina-PR etc.) mantêm os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), que é a parte do acervo utilizada nos programas de melhoramento de cada Unidade da Embrapa.

3. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DO ALGODÃO - Embrapa Algodão
Campina Grande, Paraíba
Cultura: algodão

4. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ E FEIJÃO - Embrapa Arroz e Feijão
Goiânia, Goiás
Culturas: arroz, feijão, caupi

5. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - Embrapa Soja
Londrina, PR
Culturas: soja e girassol

6. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO - Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, Minas Gerais
Culturas: milho e sorgo

7. CENTRO NACIONAL DE PESQUISAS DE HORTALIÇAS - Embrapa Hortaliças
Brasília, DF
Culturas: hortaliças diversas

8. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT Cali, Colômbia.
Culturas: Arroz, feijão e mandioca.

9. INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS – IAC
Campinas, São Paulo
Culturas: algodão, amendoim, café, citrus, mamona, milho, soja e outras espécies.

10. INTERNATIONAL CENTER FOR AGRICULTURAL RESEARCH IN DRY AREAS – ICARDA
Síria
Culturas: lentilhas e favas.

11. INTERNATIONAL CROPS RESEARCH INSTITUTE FOR THE SEMI-ARID TROPICS - ICRISAT
Índia
Culturas: guandu, milheto e sorgo

12. CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO – CIMMYT
México
Culturas: milho e trigo.

13. INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE - IRRI
Los Baños, Filipinas.
Cultura: arroz

14. DELTA BRANCH EXPERIMENT STATION
Stoneville, Mississippi
Culturas: soja dos grupos de maturação V às mais tardias:

15. NATIONAL SOYBEAN RESEARCH LABORATORY - NSRL
University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois.
Cultura: soja de todos os grupos de maturação

16. NATIONAL SEED STORAGE LABORATORY - Fort Collins, Colorado.
Culturas: feijão e as principais culturas de interesse dos Estados Unidos

17. PLANT INTRODUCTION STATION
Pullman, Washington.
Culturas: feijão, trigo e diversas espécies.

18. PLANT GENETICS AND GERMPLASM INSTITUTE
Beltsville, Maryland
Culturas: diversas espécies cultivadas

19. BANCO MUNDIAL DE GERMOPLASMA
Mantida pela Comissão Internacional para Preservação de Recursos Genéticos, da qual o Brasil faz parte.
Genebra, Suíça.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.S.B.de; BASTOS, C.N.; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.; GOMES, B.E.G. Seleção de genótipos de cacaueiro resistentes a *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.261,1999. Suplemento.

ALMEIDA, A.M.R. Vírus diseases. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome: FAO, 1994. p.65-73. (Plant Production and Protection Series, 27).

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da fitopatologia, In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, p.2-12.

BROMFIELD, K.R. **Soybean rust**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65p. (Monograph 11).

BROWNING, J.R.; SIMONS, M.D.; TORRES, E. Managing host genes:epidemiologic and genetic concepts. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. **Plant disease**: an advanced treatise; how disease is managed. New York: Academic Press, 1977. v.1, 465 p.191-212.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ed.Agronômica Ceres, 1995. p.729-760.

DALL PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A Doenças do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas, 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, p.176-183.

DATNOFF, L.E.; NAIK, D.M.; SINCLAIR, J.B. Effect of red leaf blotch on soybean yields in Zambia. **Plant Disease**, v.71, p.32-135, 1987.

DEADMAN, M.L. Epidemiological consequences of plant disease resistance. In: JONES, D.G. (Ed.) **The epidemiology of plant diseases.** Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.123-137.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; WAIN, A.L.; PEREIRA, J.E. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **O nematóide de cisto da soja: a experiência brasileira.** Jaboticabal: SBN; Artsigner Editores; 1999. p.95-103.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, p.261-296.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development.** New York: McGraw Hill, 1987. v.1, 563p.

FREDERIKSEN, R.A. (Ed.) **Compendium of sorghum diseases.** St. Paul: APS Press, 1996. 82p.

GAZZONI , D.L.; YORINORI, J.T. **Manual de identificação de pragas e de doenças da soja.** Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 128p. (Manual de Identificação de Pragas e Doenças, 1).

GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. p.184-200.

HAGEDORN, D.J. (Ed.) **Compendium of pea diseases.** St. Paul: APS Press, 1985. 57 p.

HARTMAN, G.L.; DATNOFF, L.E.; LEVY, C.; SINCLAIR, J.B.; COLE, D.L.; JAVAHERI, R. Red leaf blotch of soybeans. **Plant Disease**, v.71, p.113-118, 1987.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Ed.) **Compendium of soybean diseases.** 4.ed. St. Paul: APS Press, 1999. 128 p.

HALL, R. (Ed.) **Compendium of bean diseases.** St. Paul: APS Press, 1994. 73p.

HOLTON, C.S.; FISCHER, G.W.; FULTON, R.W.; HART, H.; McCALLAN, S.E.A. (Ed.) **Plant pathology:** problems and progress 1908-1958. Madison: University of Wisconsin Press, 1959. 588p.

HOOKER, W.J. (Ed.) **Compendium of potato diseases.** St. Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125p.

HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. Some epidemics man has known. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (Ed.) **Plant disease an advanced treatise:** how disease develop in populations. New York: Academic Press, 1978. v.2, p.17-32.

JAMES, C.A **Manual of assessment keys for plant diseases.** St. Paul: APS Press, 1971. 90p. (Publication, 1458.)

JONES, S.S.; MURRAY, T.D.; ALLAN, R.E. Use of alien genes for the development of disease resistance in wheat. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.429-433, 1995.

JONES, D.G. (Ed.) **The epidemiology of plant diseases.** Boston: Kluwer, 1998. 460p.

KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, 774p.

LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Ed: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.507-538.

LENNÉ, J.M.; WOOD, D. Plant disease and the use of wild germplasm. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p.35-63, 1991.

LEPPIK, E.E. Gene centers of plants as sources of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.8, p.323-344, 1970.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Avaliação a campo de progênies de cacaueiro para resistência a vassoura de bruxa na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.300, 1999. Suplemento.

MATHRE, D.E. **Compendium of Barley Diseases.** St. Paul: APS PRESS, 1987. 78 p.

MEHTA, Y.R. **Manejo integrado de enfermedades del trigo.** Londrina: Y.R. MEHTA; IAPAR, 1993. 314p.

PADMANABHAN, S.Y. The great Bengal famine. **Annual Review of Phytopathology**, v.11, p.11-26, 1973.

POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D.A. **Breeding field crops.** 4.ed. Ames: Iowa State University Press, 1995. 494p.

PORTER, D.M.; SMITH, D.H.; RODRIGUEZ-KABANA, R. (Ed.) **Compendium of peanut diseases.** St. Paul: American Phytopathological Society,1984. 73p.

RIGGS, R.D.; WRATHER, J.A. (Ed.) **Biology and management of the soybean cyst nematode.** 2.ed. St. Paul: APS Press, 1995. 186 p.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 300p. (Documentos, 50).

SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases.** 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1980. 105 p.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N. Avaliação de matrizes de cacaueiro selecionadas em áreas altamente infectadas para resistência à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.283, 1998. Suplemento.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (Ed.) **Compendium of soybean diseases.** 3.ed. St. Paul: APS Press, 1989. 106p.

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. (Ed.) In: SOYBEAN RUST WORKSHOP, Illinois, 1995. **Proceedings.** Champaign: National Soybean Research Laboratory, 1995. 68p. (Publication, 1).

STACKMAN, E.C. The role of plant pathology in the scientific and social development of the world. In: HOLTON, C.S.; FISCHER, G.W.; FULTON, R.W.; HART, H.; McCALLAN, S.E.A. (Ed.) **Plant pathology:** problems and progress; 1908-1958. Madison: University of Wisconsin Press, 1959. p.3-13.

THURSTON, H.D. Threatening plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, v.11, p.12-52, 1973.

TISSELLI, O.; SINCLAIR, J.B.; HYMOWITZ, T. **Sources of resistance to selected fungal, bacterial, viral and nematode diseases of soybeans.** Champaign: College Agriculture, University of Champaign, 1980. 134 p. (INTSOY Series,18).

TRINDADE, D.R.; FURTADO, E.L. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, p.628-641.

VALE, F.X.R do; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, Depto. de Fitopatologia, 1997. 2v.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases:** epidemics and control. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206p.

WALKER, J.C. The role of pest resistance in new varieties. In: FREY, K.J. **Plant breeding**: a Symposium; papers. Ames: Iowa State University Press, 1966. p.219-242.

WALKER, J.C. Progress and problems in controlling plant diseases by host resistance, In: HOLTON, C.S.; FISCHER, G.W.; FULTON, R.W.; HART, H.; McCALLAN, S.E.A. (Ed.) **Plant pathology:** problems and progress 1908-1958. Madison: University of Wisconsin Press, 1959. p.32-41.

WATKINS, G.M. (Ed.) **Compendium of cotton diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1981. 87p.

WIESE, M.V. (Ed.) **Compendium of wheat diseases**. 2.ed. St. Paul: APS Press, 1991. 112p.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v.81, p.107-110, 1997.

YORINORI, J.T. Genetics of resistance to diseases in beans, chickpeas, cowpeas, pigeon peas and soybeans. In: INTERNATIONAL WORKSHOP IN INTEGRATED PEST CONTROL FOR GRAIN LEGUMES, Goiânia, 1983. **Proceedings**. Brasília: EMBRAPA, DDT, 1984. p.130-152.

YORINORI, J.T. Frogeye leaf spot of soybean (*Cercospora sojina* Hara). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., Buenos Aires, 1989. **Actas-Proceedings**. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soja-AASOJA, 1989. v.3, p.1275-1284.

YORINORI, J.T.; GARCIA, A.; KIIHL, R.A.S.; HIROOKA, T. Nova raça de *Cercospora sojina* Hara, patogênica ao gene de resistência da cultivar Santa Rosa. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 5., Campo Grande, 1989. **Resumos**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1989. p.13.

YORINORI, J.T. Fungal diseases. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome: FAO, 1994. p.37-60. (Plant Production and Protection Series, 27)

YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja:** epidemiologia e controle. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1996. 75p. (Circular Técnica, 14).

YORINORI, J.T.; KLINGELFUSS, L.H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.509-512, 1999.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control** USDA. Wasgington: US Dept. Agriculture, 1957. 255p. (Technical. Bulletin, 868.)

ZAUMEYER, W.J.; MEINERS, J.P. Disease resistance in beans. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.313-334, 1975.

ZIMMERMAN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.) **Cultura do feijoeiro:** fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e Fosfato, 1988. 589p.

24

MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA A INSETOS

JOSÉ DJAIR VENDRAMIM[1]
MARCELO AKIRA NAIME NISHIKAWA[2]

[1]Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - USP/ESALQ, C.P. 9 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.
[2]Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas - Depto. de Genética, USP/ESALQ.

1. INTRODUÇÃO

O modelo de agricultura atual apresenta uma série de problemas, destacando-se entre os mais importantes o ataque de pragas e doenças responsável por perdas de cerca de um quinto da produção agrícola. Outro problema, associado ao primeiro, refere-se às perdas pelo uso inadequado de inseticidas e fungicidas químicos, que oneram em milhões de dólares a cada ano, a produção mundial de alimentos. Nos países industrializados, o uso de alguns tipos de agroquímicos aumentou cerca de dez vezes desde a Segunda Guerra Mundial. A produção agrícola aumentou consideravelmente, porém, mesmo com o incremento no uso de inseticidas e fungicidas, a severidade dos danos das pragas e doenças aumentaram também (Robinson, 1996).

Esses problemas se tornam ainda mais graves quando são confrontados com o crescimento populacional. Estima-se que entre os anos de 1995 e 2020, a população mundial crescerá 35%, o que corresponde a 7,7 bilhões de pessoas (UN, 1996), ou seja, cerca de 80 milhões de pessoas por ano. O atual modelo de agricultura, considerando a tecnologia disponível, não garantirá a produção de todo o alimento necessário para o ano de 2020, segundo Pinstrup-Andersen & Pandya-Lorch (1997). De acordo com esses autores, as instituições nacionais e internacionais de pesquisa em agricultura devem direcionar seus esforços para desenvolver tecnologias e práticas agrícolas otimizadas, entre elas, a redução na aplicação de produtos químicos e a preservação do ambiente.

Não há atualmente uma quantificação exata dos prejuízos causados por pragas e doenças nas culturas exploradas comercialmente, em função das dificuldades de mensuração desse parâmetro. Muitos pesquisadores, entretanto, aceitam a estimativa de que esses organismos destroem cerca de 20% da produção agrícola mundial (Robinson, 1996), sem considerar os danos pós-colheita, o que permitiria alimentar cerca de um bilhão de pessoas. Esse problema fica mais evidente quando se leva em conta que isso ocorre mesmo com o uso de inseticidas e fungicidas.

Ainda considerando o atual modelo de agricultura, uma maior produção de alimentos só poderá ser obtida com o aumento das áreas de plantio, o que implica num avanço das fronteiras agrícolas para áreas selvagens, ou com o aumento da produtividade, o que corresponde a um aumento proporcional no uso de insumos e, dentre eles, inseticidas e fungicidas mais potentes e em maior quantidade. Essas duas alternativas certamente contribuirão para um maior risco de contaminação e degradação do ambiente. Por outro lado, no atual modelo, a redução do uso desses produtos químicos, provocará um aumento nas perdas devido ao ataque de pragas e doenças. Esse dualismo cria, segundo Robinson (1996), um grande dilema que os agricultores, pesquisadores e ambientalistas nem sempre têm plena consciência: "a escolha entre alimento-poluição e fome-preservação." A maioria dos centros nacionais e internacionais de pesquisa tem como meta principal encontrar uma solução para este dilema através da busca de métodos alternativos de controle que, se não podem

substituir totalmente os produtos químicos tradicionais, ao menos podem ser utilizados em associação a estes, permitindo a redução das dosagens ou do número de aplicações.

Dentre os vários métodos alternativos de controle de pragas e doenças, inclui-se o que se utiliza de resistência varietal obtida através de melhoramento genético. Basicamente os objetivos principais do melhoramento genético vegetal são: aumento da produção, melhoria da qualidade e das características agronômicas e obtenção de resistência a pragas e doenças. Desde os primeiros trabalhos de melhoramento genético de plantas, têm sido obtidos excelentes resultados, principalmente em relação aos primeiros objetivos. Contudo, a obtenção de resistência a pragas e doenças tem apresentado resultados esporádicos, o que pode ser justificado em parte pela complexidade das pesquisas nessa área.

No que se refere aos insetos, são necessários muitos conhecimentos prévios antes de se iniciar qualquer programa de melhoramento visando à obtenção de resistência varietal. Essas informações são relativas tanto aos insetos quanto às plantas hospedeiras, bem como às interações entre praga e planta, e são obtidas em programas de pesquisa específicos, tornando imprescindível a associação entre entomologistas, melhoristas e pesquisadores de áreas afins. Além disso, mesmo com um programa bem planejado e uma equipe multidisciplinar de pesquisadores, a obtenção de uma variedade resistente pode levar anos, devido ao fato do caráter resistência estar, muitas vezes, em uma variedade selvagem, sem valor comercial, sendo necessários métodos especiais para a introdução do caráter resistência em variedades melhoradas. Atualmente, a resistência de plantas a insetos vem crescendo de importância dentro dos programas de melhoramento de plantas o que leva a prever que brevemente essa técnica deverá ser definitivamente incorporada nos programas de controle de pragas.

2. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

O emprego da resistência varietal é normalmente considerado o método ideal de controle de pragas pela possibilidade de se manter a população desses organismos abaixo do nível de dano econômico, sem causar distúrbios ou prejuízos ao ambiente e, ainda, sem trazer ônus adicional ao agricultor. Além disso, pela facilidade de utilização, não interferência nas demais práticas culturais e pelo fato de normalmente apresentar compatibilidade com outros métodos de controle, torna-se uma técnica adequada para ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas. Apesar dessas vantagens, o emprego dessa técnica tem sido restrita por alguns fatores limitantes como: a) o longo tempo necessário para obtenção de variedades resistentes e, ao mesmo tempo, produtivas; b) a especificidade dos fatores de resistência que, em alguns casos, atuam contra apenas uma espécie de inseto, podendo mesmo aumentar a população de outras pragas; c) a possibilidade de perda de resistência pela adaptação do inseto ao material resistente.

Particularmente no Brasil, a demora para obtenção de genótipos resistentes se deve a diversos fatores como: a) reduzido número de pesquisadores especializados na área; b) falta de intercâmbio entre entomologistas, melhoristas, bioquímicos, botânicos e outros pesquisadores de áreas afins, dificultando a formação de equipes multidiciplinares de pesquisa; c) dificuldade para obtenção e principalmente manutenção de coleções de germoplasma; d) dificuldade para obtenção de insetos

em número adequado para a realização de experimentos; e) falta de conhecimentos sobre fitoquímica e de infra-estrutura para a obtenção dessas informações; f) descontinuidade das pesquisas. Considerando-se que os projetos visando à obtenção de resistência varietal a insetos são planejados para desenvolvimento a longo prazo, o corte de verbas e/ou a não renovação de financiamentos são fatores limitantes que também dificultam o sucesso na obtenção de materiais resistentes.

2.1 HISTÓRICO

O relato de Havens, em 1782, a respeito da resistência da cultivar Underhill'de trigo à mosca de Hesse (*Mayetiola destructor*), é normalmente considerado o primeiro registro de um genótipo resistente a inseto. Entretanto, apenas algumas décadas após é que foi notificado o emprego dessa técnica para controle de um inseto, com a utilização da cultivar Winter Majetin de maçã resistente ao pulgão lanígero (*Eriosoma lanigerum*). O caso clássico de sucesso no controle de praga através de resistência de plantas refere-se à filoxera *Phylloxera vitifoliae*, praga que, no final do século XIX, causou enormes prejuízos na Europa, principalmente na França, onde, em menos de 10 anos, destruiu mais de 1.200.000ha de videira (mais de um terço da área cultivada), provocando prejuízo superior a 2 bilhões de dólares. A filoxera ataca tanto as raízes como as folhas, mas os maiores danos decorrem do ataque às raízes, onde se formam tuberosidades que se rompem, permitindo a entrada de microrganismos do solo, o que leva ao apodrecimento das raízes e morte da planta. Nas folhas, o ataque produz galhas em reação às picadas, mas de modo geral, não afeta a produção. A partir do conhecimento do hábito alimentar da praga, foi possível estabelecer o controle através de enxertia, utilizando-se, como porta-enxerto, variedades americanas altamente resistentes (ainda que produtoras de uvas e vinhos de qualidade inferior) e, como enxerto, variedades européias suscetíveis, que já eram tradicionalmente cultivadas pelas suas boas qualidades agro-industriais. Desse modo, foi possível o controle dessa praga, sendo esta técnica, bastante simples, utilizada até hoje, cerca de 100 anos após ter sido empregada pela primeira vez (Ortman & Peters, 1980; Panda & Khush, 1995).

As primeiras pesquisas visando à obtenção de variedades resistentes a insetos, foram iniciadas, em 1881, no Estado da Califórnia (EUA), onde, num período de cerca de 10 anos, mais de 100 cultivares de cereais (principalmente trigo) foram expostas ao ataque da mosca *M. destructor*; os resultados foram registrados mas o trabalho não teve continuidade. Foi no período 1920/30 que o aprimoramento das técnicas de melhoramento de plantas tornou possível aplicar essa informação visando à incorporação de fatores genéticos de resistência a genótipos de trigo. Provavelmente, os primeiros estudos de herança da resistência tenham sido feitos nos anos de 1916/17, envolvendo a resistência de algodão à cochonilha *Saissetia nigra* e ao ácaro *Eriophies gossypii*. Estudos em condições de campo e casa de vegetação, iniciados na Estação Experimental de Kansas (EUA), em 1914, visando obter variedades de trigo resistentes à mosca de Hesse permitiram a liberação dos primeiros materiais resistentes em 1931(Panda, 1979).

O estudo da resistência de plantas como ciência propriamente dita geralmente é dividido em três períodos: a) período anterior à 2ª Guerra Mundial, em que a evolução da pesquisa nessa área ocorria de forma relativamente lenta, em

função da evolução nas pesquisas na área de Genética; b) período imediatamente posterior à 2ª Guerra Mundial, em que a resistência de plantas, juntamente com os demais métodos alternativos de controle, foi relegada a plano secundário, em função da descoberta das propriedades inseticidas do DDT e BHC, que pareciam ser a solução para controle de todas as pragas, e c) período atual (após 1960), em que ocorreu novo incremento no estudo de plantas resistentes devido basicamente aos problemas decorrentes do uso de inseticidas, principalmente o surgimento de insetos resistentes e a poluição ambiental (Ortman & Peters, 1980). A obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos, através dos recursos de engenharia genética está, sem dúvida, marcando o início de um novo período de pesquisas com resistência de plantas.

2.2 CONCEITOS

A resistência de plantas é definida como a soma relativa de qualidades hereditárias apresentadas pela planta as quais influenciam a intensidade do dano provocado pelo inseto (Painter, 1951), o que na prática agrícola, representa a capacidade de certas variedades apresentarem maior quantidade de produtos de boa qualidade que as demais, num mesmo nível de população do inseto. Assim, pode-se considerar que uma planta ou variedade é resistente quando, devido a sua constituição genotípica, ela é menos danificada que outras em condições de igualdade para o ataque da praga.

Levando-se em conta esses conceitos, algumas considerações são necessárias: a) a resistência é **relativa**, não existindo uma escala objetiva para medi-la, o que torna necessário, para sua caracterização, a comparação do genótipo avaliado com outros genótipos; b) a resistência é **hereditária**, ou seja, as progênies de uma variedade resistente devem manter o seu comportamento quando testadas nas mesmas condições em que a resistência foi constatada; c) a resistência é **específica**, já que uma variedade resistente a uma praga normalmente é suscetível a outras pragas; d) a variedade resistente é aquela menos **danificada** e não, necessariamente, menos **atacada**, pois um genótipo pode ser mais atacado que outro, e ainda assim ser menos danificado (resistente) por apresentar tolerância; e) a resistência ocorre em **determinadas condições**, podendo ou não ser mantida quando as condições são alteradas; f) a resistência pode ocorrer tanto em **materiais comerciais** como em **selvagens** ou **não cultivados**; em alguns casos, a resistência nos materiais comerciais em relação aos selvagens passa despercebida pela falta de comparações entre eles.

A comparação de um grupo de genótipos em relação ao ataque de uma praga evidencia diferentes níveis de respostas, o que caracteriza os diferentes graus de resistência: a) **imunidade**, quando o genótipo não sofre qualquer dano do inseto (não é consumido e nem injuriado) sob quaisquer condições; b) **alta resistência**, quando, sob determinadas condições, o genótipo sofre pequeno dano em relação ao dano médio apresentado pelos demais genótipos; c) **resistência moderada**, quando o dano sofrido pelo genótipo é um pouco menor que o dano médio sofrido pelos demais; d) **suscetibilidade**, quando o genótipo sofre um dano semelhante ao dano médio apresentado pelos demais; e) **alta suscetibilidade**, quando o dano sofrido pelo genótipo é maior que o dano médio sofrido pelos demais.

2.3 PARÂMETROS E TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO

Embora o que interessa ao produtor, usuário final da variedade resistente, é dispor de um material que apresente, em relação aos demais, menor redução na produção quando atacado por uma praga, as pesquisas visando à obtenção de resistência varietal não devem se restringir apenas ao parâmetro produção. Primeiramente porque, em alguns casos, como, por exemplo, quando a praga ataca a fase inicial da cultura e provoca a morte da planta, é desnecessário esperar até a colheita, uma vez que a avaliação da infestação ou dos sintomas de ataque já permite a caracterização da resistência, com ganho de tempo e mão-de-obra, por possibilitar vários ciclos de seleção num mesmo ano agrícola. Um outro aspecto é que, trabalhando-se com áreas (parcelas) relativamente pequenas – o que, na maioria das vezes, é uma necessidade em função do elevado número de genótipos testados simultaneamente – os dados de produção dificilmente serão confiáveis, o que fica caracterizado quando os mesmos são extrapolados para áreas maiores. Além disso, se for avaliada apenas a diferença na produção, não poderão ser determinados os mecanismos de resistência envolvidos, os quais são importantes para o estabelecimento de um programa de melhoramento visando à obtenção de resistência varietal a pragas. Desse modo, além da redução da produção, podem e devem ser avaliados outros parâmetros, procurando-se, através de um melhor conhecimento da relação inseto-planta, aumentar a probabilidade de obtenção de materiais resistentes. Além disso, deve-se considerar que quanto maior o número de parâmetros avaliados, maior será a confiabilidade dos dados obtidos.

A avaliação dos parâmetros visando à seleção de variedades resistentes pode ser feita em condições de campo, casa de vegetação (ou telado) e laboratório. Normalmente, quando nada se conhece a respeito da relação inseto-planta, são feitas seleções iniciais no campo, incluindo, sempre que possível, padrões resistente e suscetível, visando selecionar os materiais mais promissores. Quando a população da praga não ocorre naturalmente em densidade suficiente, deverão ser providenciadas infestações artificiais com ovos, larvas ou ninfas, ou mesmo adultos. O tipo mais comum de infestação artificial é aquela feita com ovos ou larvas recém-eclodidas que são misturados em material inerte (sabugo de milho moído, por exemplo) e distribuídos nas plantas com equipamentos apropriados, sendo um dos mais comuns o conhecido por bazuca (Wiseman *et al.*, 1980). Apesar dos bons resultados normalmente obtidos com infestação artificial, não será possível, com esse procedimento avaliar a preferência para oviposição desse inseto, importante mecanismo de resistência varietal.

A partir das informações obtidas no campo, os materiais deverão ser avaliados em laboratório ou casa de vegetação, com o objetivo de obter informações sobre os mecanismos de resistência, o que permitirá uma melhor definição dos tipos de ensaios a serem utilizados e dos fatores de resistência envolvidos. Dependendo do número de genótipos promissores e do programa de melhoramento, os estudos poderão se alternar ou se desenvolver simultaneamente em condições de campo e em condições de laboratório ou casa de vegetação. De qualquer forma, independente dos tipos de ensaios e dos parâmetros utilizados, os estudos finais que precederão a liberação dos materiais resistentes para cultivo, deverão ser efetuados obrigatoriamente no campo,

em condições semelhantes (região, época de plantio, tratos culturais, adubação etc.) àquelas em que será feito o cultivo comercial.

Considerando-se, por outro lado, os diversos parâmetros que podem ser utilizados para a discriminação de variedades resistentes, os mesmos podem ser divididos em parâmetros relativos ao inseto e parâmetros relativos à planta.

2.3.1 PARÂMETROS RELATIVOS AO INSETO

Diferença na população – Determinada através da avaliação do número de indivíduos (no estágio imaturo e/ou na fase adulta) em cada genótipo estudado. Para isso, é necessário que seja previamente estabelecido o tipo de amostragem e a época e número de avaliações, o que irá depender do período de suscetibilidade da cultura.

Diferença na oviposição – Avaliada no campo de modo semelhante à população. Também pode ser avaliado em casa de vegetação, liberando-se os insetos em gaiolas (ou telados) contendo os genótipos em teste. As dimensões das gaiolas irão depender do tamanho e principalmente do comportamento do inseto nas atividades de acasalamento e postura. Nos casos em que os ovos são pouco visíveis, em função da cor, tamanho e localização (no interior dos tecidos vegetais), é recomendado o tratamento da parte vegetal a ser avaliada com corantes.

Diferença na alimentação – Avaliada diretamente através da quantificação da área ou peso do alimento ingerido ou do tempo que o inseto permanece se alimentando ou indiretamente, principalmente no caso de insetos sugadores, através da quantidade de resíduos fecais produzidos (*honeydew*) durante o período de alimentação. Deverá ser caracterizado como resistente, o genótipo menos consumido.

Diferença no peso e tamanho – A avaliação é feita após a manutenção do inseto se alimentando nos diferentes genótipos por um tempo determinado. De modo geral, os materiais que propiciarem menor peso e tamanho deverão ser considerados resistentes.

Diferença na duração do ciclo biológico – Avaliada através da comparação dos tempos que o inseto permanece em cada fase do seu ciclo quando criado nos diferentes genótipos em teste. Há necessidade de que as fases imaturas do inseto (ovo, larva ou ninfa e pupa) sejam avaliadas separadamente das fases adultas (pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição), já que enquanto para a fase imatura é o prolongamento da fase que caracteriza uma variedade resistente, para a fase adulta ocorre exatamente o inverso, ou seja, é o encurtamento dessa fase que caracteriza a variedade resistente. Desse modo, caso as duas fases sejam consideradas em conjunto, há uma tendência de que os efeitos sejam neutralizados dificultando a discriminação das variedades.

Diferença na mortalidade – A avaliação da mortalidade das fases de ninfa, larva e pupa é um dos parâmetros mais importantes para a definição de uma variedade resistente a um inseto, já que o aumento na porcentagem de indivíduos mortos é um forte indicativo de resistência. Esse parâmetro pode ser avaliado ao final de cada ínstar ninfal ou larval, ao final das fases ninfal, larval ou pupal, ou durante um período pré-determinado. Na avaliação da sobrevivência da fase adulta, é necessário que os indivíduos sejam criados numa variedade comum (padrão suscetível) e posteriormente os adultos sejam mantidos sobre as variedades testes, durante um intervalo de tempo menor que o tempo normal de vida (longevidade) do inseto nessa fase.

Diferença na fecundidade – Pode ser medida através do número total ou diário de ovos produzidos por fêmea, caracterizando-se como resistentes os genótipos que propiciarem insetos menos fecundos. Nos testes para avaliação da fecundidade, é imprescindível que se utilize o mesmo substrato de postura para todos os tratamentos (grupos de casais provenientes de cada genótipo em teste). Caso sejam utilizadas as respectivas variedades onde as fêmeas se desenvolveram, os resultados podem ser mascarados por fatores varietais (morfológicos e químicos, principalmente) que influenciam na preferência para oviposição. Por outro lado, como normalmente há variabilidade relativamente elevada nos dados, há necessidade de utilização de um grande número de repetições (no mínimo, 15 a 20 casais).

2.3.2 PARÂMETROS RELATIVOS À PLANTA

Diferença na mortalidade – O número ou a porcentagem de plantas mortas é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliação de variedades resistentes principalmente com plantas em estágios iniciais de desenvolvimento, casos em que o ataque do inseto chega a provocar a morte das mesmas, como pode ocorrer, por exemplo, com pulgões em sorgo, trigo, alfafa etc. Os testes podem ser feitos em condições de campo com infestações naturais do inseto ou em condições de casa de vegetação quando as plantas são submetidas à infestação artificial.

Diferença na destruição dos órgãos vegetais – Avaliada através do número ou da área dos órgãos vegetais destruídos ou danificados por um número determinado ou indeterminado de indivíduos. Em função das dificuldades para determinação direta da área destruída, principalmente no caso de insetos sugadores, em muitos casos, são utilizadas escalas de notas para a quantificação dos danos (Tabela 1). O sistema de notas tem a desvantagem de ser subjetivo, sendo necessário, por isso, um perfeito conhecimento, por parte do avaliador, do tipo de dano causado pela praga. Por isso, é interessante que, no mínimo, duas pessoas façam a avaliação estabelecendo-se, como nota final, a média entre essas notas.

Diferença na produção – A avaliação desse parâmetro é feita diretamente através da comparação da produção nas parcelas infestadas e não infestadas (testemunhas) das diversas variedades. Pode-se trabalhar com infestações naturais ou artificiais. Deve-se evitar parcelas muito pequenas, já que isso aumenta a probabilidade de erros no cálculo da redução da produção. Quando o ataque do inseto se dá no fruto e este representa o produto final, a diferença na produção pode ser avaliada pela porcentagem de frutos atacados nas diferentes variedades, considerando-se, nesse caso, fruto atacado como fruto perdido. No caso de produtos armazenados, a perda será determinada pela diferença de peso de amostras de cada variedade antes e após a infestação com um determinado número de insetos. É imprescindível, nesse caso, que se faça a correção do peso em função de eventuais alterações devido à variação da umidade no ambiente, o que pode ser feito através de pesagem de amostras não infestadas (alíquotas), no início e no final do ensaio.

Diferença na qualidade do produto – Em alguns casos, embora a redução de produção seja semelhante nas diversas variedades, pode haver diferença na qualidade do produto obtido (teores de óleo, aminoácidos, proteínas etc.). Nesses casos, a diferença na qualidade do produto pode ser avaliada através de testes semelhantes àqueles utilizados

para avaliar a diferença de produção, comparando-se, então parcelas infestadas e não infestadas em relação ao caráter qualitativo afetado.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Analisando-se os meios pelos quais uma planta ou variedade apresenta resistência ao ataque de uma praga, verifica-se que, na maioria das vezes, esse fenômeno envolve a alteração do comportamento ou da biologia do inseto, enquanto, em outros casos, a resistência se deve à reação da planta que em nada afeta o inseto. Estes mecanismos são governados geneticamente e o conhecimento deles pode ser de grande importância em programas de melhoramento por: a) auxiliar na identificação das fontes de resistência; b) orientar o programa de cruzamentos e seleção de progênies; c) aumentar a base genética das variedades resistentes; d) permitir o desenvolvimento de linhagens isogênicas empregadas no estudo dos fatores de resistência.

2.4.1 TIPOS DE RESISTÊNCIA

Estudando os mecanismo através dos quais as plantas apresentam resistência aos insetos, Painter (1951) classificou a resistência em três tipos: não-preferência (antixenose, segundo Kogan & Ortman, 1978), antibiose e tolerância.

Antixenose ou não-preferência – Ocorre quando a planta ou variedade é menos utilizada pelo inseto para alimentação, oviposição ou abrigo, que outras variedades ou plantas em igualdade de condições, ou seja, a variedade ou planta provoca uma resposta negativa do inseto durante o processo de seleção hospedeira para alimentação, oviposição ou abrigo.

TABELA 1. Exemplos de escalas de notas para a avaliação de danos causados por insetos.

Inseto	Cultura	Escala de nota	Referência
Cigarrinhas	Pastagens	0 = ausência de cigarrinhas 1= presença de cigarrinhas, ausência de danos 2 = pontuação ou listras cloróticas nas folhas 3 = áreas cloróticas nas folhas 4 = folhas com a ponta seca 5 = folhas inteiramente secas	Cosenza (1981)
Diabrotica spp. (larva)	Milho (raiz)	1 = sistema radicular pouco desenvolvido ... até 5 = sistema radicular muito desenvolvido	Wilson & Peters (1973)
Frankliniella fusca	Amendoim (folha)	1 = 10% de dano ... até 10 = 100% de dano	Leuck *et al.* (1967)
Schizaphis graminum	Sorgo (planta)	0 = nenhum dano 1 = 1 a 10% de necrose nas plantas ... até 9 = 81 a 100% de necrose nas plantas	Teetes (1980)
Spodoptera frugiperda	Milho (cartucho)	0 = folhas sem dano 1 = folhas raspadas 2 = folhas furadas 3 = folhas com lesões 4 = cartucho com lesões 5 = cartucho destruído	Carvalho (1970)
Thrips tabaci	Cebola (folha)	1 a 3 = dano leve ... até 7 a 9 = dano severo	Coudriet *et al.* (1979)

A seleção hospedeira ocorre através de uma cadeia de estímulos onde podem ser caracterizados três estágios: a) orientação para o hospedeiro, b) início da alimentação ou oviposição e c) manutenção da alimentação ou oviposição. Estas etapas apresentam uma seqüência contínua e as respostas do inseto variam de acordo com os estímulos positivos ou negativos produzidos pela planta Estes estímulos podem ser de natureza química, física ou morfológica, podendo um determinado fator (substância, cor, pilosidade etc.) atuar como um estímulo independente dos demais ou provocar mais de uma reação no inseto. Além disso, no caso de substâncias químicas, tanto os estímulos positivos como os negativos podem ocorrer numa mesma planta, de tal modo que a resposta do inseto, irá depender daquele que estiver predominando. Comparando-se as três modalidades de antixenose, a que se refere ao abrigo parece ser a menos importante e certamente é a menos estudada.

A antixenose para oviposição pode ser determinada através de testes com e sem chance de escolha pelo inseto. Os testes com chance de escolha podem ser realizados em condições de campo, casa de vegetação ou laboratório. No campo, as variedades ficam sujeitas à infestação natural do inseto, enquanto que, em casa de vegetação, as plantas de cada variedade, cultivadas em vasos, são distribuídas ao acaso e sujeitas aos insetos liberados mediante infestação artificial. Testes com insetos pequenos e pragas de produtos armazenados geralmente são feitos em laboratório, utilizando-se partes vegetais (discos foliares, botões florais, pedaços de raiz ou grãos) mantidos em placas (arenas) ou outros recipientes fechados onde são liberados insetos adultos. A contagem dos ovos é feita após períodos variáveis (desde algumas horas em laboratório até vários dias em campo), dependendo do inseto e das demais condições do teste. Nos testes em confinamento, em casa de vegetação, cada genótipo (representado por uma ou mais plantas) é isolado numa gaiola, onde é liberado um número de casais preestabelecido. Em laboratório, a parte vegetal de cada genótipo é mantida no interior de uma placa, gaiola, caixa plástica ou outro recipiente qualquer, onde são liberados os adultos. Igualmente, a contagem dos ovos é feita após períodos variáveis. Ao contrário do teste com livre escolha em que o número e a idade dos insetos liberados em cada bloco pode sofrer alguma variação, nos testes em confinamento, estas condições devem ser bem padronizadas nos diversos tratamentos. Na avaliação da antixenose para oviposição, os adultos devem ser provenientes de substratos alimentares diferentes daqueles em que estão sendo testados para evitar que haja efeito na condição fisiológica dos insetos, mascarando, conseqüentemente, a avaliação da antixenose.

A antixenose para alimentação pode ser avaliada pela diferença no número de insetos que é atraído para as diversas variedades ou pela diferença no consumo (com ou sem chance de escolha) nas variedades em teste. No primeiro caso, o inseto deve apresentar boa capacidade de dispersão para que possa dirigir-se ao material preferido em função da atratividade deste. Testes com pulgões ápteros e lagartas, por exemplo, deverão ser realizados em recipientes pequenos em laboratório ou casa de vegetação, pois embora tenham boa mobilidade, esses insetos percorrem pequenas distâncias. Os testes com insetos que se dispersam pelo vôo, como os besouros, percevejos e pulgões alados, podem ser feitos no campo e em casa de vegetação considerando-se sempre que, no campo, serão válidos apenas os dados obtidos antes que os insetos atraídos tenham tido o seu desenvolvimento e reprodução afetados

pela planta. Em laboratório, as diversas variedades (representadas pelas estruturas utilizadas pelo inseto para alimentação) são distribuídas numa arena em pontos eqüidistantes entre si e à mesma distância de um ponto central onde são liberados os insetos, procedendo-se, após certo tempo, a contagem destes em cada material vegetal. No caso de lagartas, deve-se dar preferência para insetos recém-eclodidos pela facilidade de colocação de um grande número de indivíduos na arena e porque, geralmente, é nessa fase que o inseto, no campo, seleciona o hospedeiro.

A diferença de consumo pode ser avaliada através de testes com e sem chance de escolha, porém as técnicas variam bastante em função do hábito alimentar do inseto. Para insetos mastigadores que se alimentam de folhas, pode-se avaliar diretamente a área ou peso do alimento consumido. Já para insetos mastigadores que se alimentam de outras estruturas vegetais como frutos, raízes, vagens, sementes etc., o consumo pode ser avaliado de forma indireta através de extratos dessas estruturas impregnados em papel filtro ou em folhas de um hospedeiro alternativo ou mesmo através da contagem do número de puncturas de alimentação. Para insetos sugadores em que, na maioria das vezes, não é possível determinar diretamente a quantidade de alimento ingerido, essa estimativa também é feita de forma indireta através da quantificação do *honeydew*; do tempo de alimentação, do número de picadas etc.

Antibiose. Ocorre quando o inseto se alimenta normalmente da planta ou variedade, mas esta exerce um efeito adverso sobre a sua biologia. A antibiose pode ser caracterizada por diversos parâmetros do inseto como: prolongamento do período de desenvolvimento, redução do tamanho e peso, mortalidade da fase imatura, redução da fecundidade, fertilidade e período de oviposição etc.

Esse tipo de resistência pode ser causado por fatores como: presença na planta de alomônios (metabolitos tóxicos) que provocam intoxicação aguda ou crônica do inseto; antimetabólitos que tornam indisponíveis certos nutrientes essenciais ou atuam como inibidores enzimáticos; enzimas que inibem ou reduzem os processos normais de digestão do alimento; compostos que interferem na reprodução; impropriedade nutricional (deficiência qualitativa e quantitativa de nutrientes) da planta para o inseto etc. (Whittaker & Feeny, 1971; Kogan, 1975; Lara, 1991; Panda & Khush, 1995). Nem sempre é fácil distinguir entre um elevado grau de antixenose para alimentação e antibiose, já que a redução da alimentação também pode provocar alterações significativas na biologia do inseto.

Tolerância. É definida como o tipo de resistência em que a planta ou variedade é menos danificada que as demais, sob um mesmo nível de infestação do inseto, sem que haja efeito no comportamento ou biologia deste. Isso ocorre quando o genótipo apresenta capacidade de tolerar o ataque da praga, o que leva a uma menor redução na quantidade e ou qualidade de sua produção. Esse tipo de resistência depende exclusivamente da planta e não atua sobre o inseto. Os estudos visando à obtenção de variedades tolerantes requerem um bom conhecimento do comportamento do inseto, bem como das reações fisiológicas das plantas para evitar o dano. Entre as causas da tolerância podem ser citadas: a) maior capacidade da planta compensar a área destruída através do crescimento ou regeneração dos tecidos ou mesmo formação (mais rápida que nas não tolerantes) de novas folhas, raízes ou perfilhos; b) menor retirada de hormônios de crescimento das plantas por insetos sugadores; c) maior

capacidade de degradação das substâncias injetadas por insetos toxicogênicos; d) maior vigor ou área foliar; e) maior rigidez dos colmos reduzindo a possibilidade de acamamento ou quebra por ocasião do ataque de insetos broqueadores etc.

A melhor forma de determinar a tolerância é através da avaliação, nas diversas variedades, da redução de produção em parcelas infestadas em comparação às não infestadas (tratadas), cuidando-se sempre de utilizar parcelas com tamanho adequado para avaliação desse tipo de parâmetro. Quando os danos visuais se refletem diretamente na produção, especialmente quando o ataque se dá na fase inicial do desenvolvimento da planta, a tolerância também pode ser determinada pela diferença de altura e do peso fresco ou seco entre plantas infestadas e não infestadas, ou mesmo com base nos sintomas (notas de dano) situação em que não haverá necessidade de plantas testemunhas (não infestadas).

A resistência governada por genes e, conseqüentemente, herdável, é geralmente denominada resistência genética em oposição à resistência ecológica (Kogan, 1975; Panda & Khush, 1995) também denominada pseudo-resistência em que, sob determinadas condições, uma planta ou variedade se apresenta pouco danificada, embora não seja resistente. Existem duas modalidades principais de resistência ecológica: a evasão hospedeira e a resistência induzida. A **evasão hospedeira** (ou **assincronia fenológica**, segundo Kogan,1975) ocorre quando a planta passa rapidamente pela sua fase de maior suscetibilidade ou essa fase coincide com uma baixa densidade populacional da praga. Isso pode ocorrer quando são avaliados genótipos com diferentes durações de ciclo vegetativo. Em sorgo, por exemplo, variedades suscetíveis precoces pouco danificadas pela mosca-do-sorgo podem ser erroneamente consideradas resistentes quando na realidade o menor dano foi devido à baixa população da praga por ocasião do florescimento dos referidos materiais. A **resistência induzida** é uma manifestação temporária da resistência, resultante de condições especiais da planta ou ambiente, que quando cessadas, a planta retorna a sua condição de suscetibilidade. Mais recentemente, esse tipo de resistência tem sido considerado como resultante do processo de ativação qualitativa e quantitativa dos mecanismos responsáveis pela produção de substâncias químicas de defesa da planta (fitoalexinas) através de fatores extrínsecos (bióticos e abióticos), chamados de indutores de fitoalexinas. Anteriormente, considerava-se que a produção de fitoalexinas ocorria apenas a partir do aparecimento de doenças. Atualmente, incluem-se também os insetos como fatores bióticos e a temperatura, umidade, luz ultravioleta, certos nutrientes etc. como fatores abióticos. No caso dos insetos, os ataques iniciais provocariam, através de um processo semelhante ao de imunização dos mamíferos, a proteção posterior da planta (Kogan & Paxton, 1983). Pode ocorrer ainda um tipo de pseudo-resistência denominado **escape** em que a planta ou variedade não é infestada por mero acaso. Embora mais comum sob baixa infestação da praga, o escape também pode ocorrer sob alta infestação; normalmente é detectado nas repetições dos experimentos ou em testes de progênie.

2.4.2 CAUSAS DA RESISTÊNCIA

As interações dos insetos fitófagos com as plantas hospedeiras são o resultado de um longo e contínuo processo evolutivo. Nesse processo, os fatores de resistência

da planta tendem a provocar uma pressão de seleção sobre os insetos, os quais, através de recombinação gênica ou mutação, tornam-se aptos a neutralizar tais fatores. Esta quebra da resistência, por sua vez, aumenta a pressão de seleção dos insetos sobre a planta, fazendo com que esta, também por recombinação genética ou mutação, produza novos mecanismos de defesa e, assim, sucessivamente. Desse modo, a relação inseto-planta não é um processo estático, mas dinâmico, em que, para cada adaptação da planta, tende a ocorrer, uma contra-adaptação do inseto. Estes fatores representam as causas da resistência que são classificadas em físicas, morfológicas e químicas.

Causas Físicas – São representadas basicamente pelas cores do substrato vegetal que, em muitos casos, afetam não apenas a seleção hospedeira para alimentação e oviposição, mas também a biologia do inseto. As cores são resultantes da absorção e reflexão seletiva, por um substrato qualquer, de radiação eletromagnética que se propaga no ambiente em diferentes comprimentos de onda.

Têm sido citados diversos casos de diferença de ataque de insetos em função da cor do substrato vegetal, como, por exemplo, o menor ataque do bicudo *Anthonomus grandis* em genótipos de algodoeiro com folhas vermelhas comparado àqueles de cor verde (Jones & Brand, 1981; Jones *et al.*, 1987) e a menor oviposição de *Pieris rapae* em variedades avermelhadas de repolho em relação às esverdeadas (Radcliffe & Chapmann, 1966; Shelton *et al.*, 1988). A maioria dos autores, entretanto, não considera essas situações como sendo casos concretos de resistência já que essa menor preferência só se manifesta em condições de múltipla escolha entre os genótipos com diferentes cores, o que, de certa forma, limita a sua utilização.

Causas Químicas – São representadas basicamente por substâncias químicas que atuam no comportamento ou metabolismo do inseto e por impropriedades nutricionais da planta.

A alteração do comportamento do inseto ocorre principalmente durante a seleção hospedeira para alimentação e oviposição e resulta na resistência por antixenose. As substâncias responsáveis pelas interações químicas entre organismos são denominadas aleloquímicos. Segundo Whittaker & Feeny (1971), dois tipos de aleloquímicos são de interesse particular para as relações inseto-planta: os alomônios que tendem a conferir uma vantagem adaptativa ao organismo produtor (no caso, a planta hospedeira) e os cairomônios que tendem a conferir uma vantagem adaptativa ao organismo receptor (no caso, o inseto fitófago). Assim, numa relação inseto-planta, os alomônios são desfavoráveis aos insetos e os cairomônios, favoráveis. Kogan (1975) resumiu as principais classes de aleloquímicos de plantas (Tabela 2), citando que a resistência varietal devido ao comportamento do inseto pode ocorrer devido à presença, na planta, de repelente, estimulante locomotor, supressor ou deterrente, ou à ausência de atraente, arrestante, incitante ou estimulante.

O efeito no metabolismo é decorrente principalmente da ingestão pelo inseto de alomônios (metabolitos tóxicos, inibidores enzimáticos, inibidores reprodutivos, etc.) ou da impropriedade nutricional da planta (deficiência qualitativa ou quantitativa de nutrientes), resultando na resistência por antibiose. Citações de aleloquímicos com os respectivos efeitos sobre insetos são freqüentes na literatura (Tabelas 3 e 4).

TABELA 2. Principais classes de aleloquímicos das plantas e efeitos correspondentes no comportamento do inseto.

Aleloquímicos	Efeito nos insetos
Cairomônios	**Favorável**
Atraente	Orienta em direção à planta
Arrestante	Pára ou torna vagaroso o movimento
Incitante	Induz à picada, mordida, penetração ou início da oviposição
Estimulante	Promove a continuidade da alimentação ou oviposição
Alomônios	**Desfavorável**
Repelente	Orienta em direção contrária à planta
Estimulante locomotor	Inicia ou acelera o movimento
Supressor	Inibe a picada, mordida, penetração ou início da oviposição
Deterrente	Impede a manutenção da alimentação ou oviposição.

Fonte: Kogan (1975)

TABELA 3. Aleloquímicos produzidos por plantas que afetam o comportamento de insetos.

Aleloquímicos	Planta	Efeito[1]	Inseto afetado
Ácidos fenólicos	*Sorghum* spp.	Da	*Schizaphis graminum*
α-conidendrina	*Ulmus* spp.	Ea	*Scolytus multistriatus*
α-pineno	*Pinus silvestris*	R	*Blastophagus piniperda*
α-pineno	*Pinus taeda*	At	*Dendroctonus frontalis*
Amônia	*Gossypium* spp.	At	*Anthonomus grandis*
Citral	*Morus* spp.	At	*Bombyx mori*
Cucurbitacinas	Cucurbitáceas	At, Ar, Ea	*Diabrotica* spp.
Demissina	*Solanum* spp.	Da	*Leptinotarsa decemlineata*
DIMBOA	*Zea mays*	Da	*Ostrinia nubilalis*
Ergosterol	*Morus* spp.	Ea	*B. mori*
Florizina	*Malus* spp.	Da	*Myzus persicae*
Furfural	*Pinus* spp.	Da	Cupins
Geraniol	*Andropogon nardus*	At	*Dacus dorsalis*
Gossipol	*Gossypium* spp.	Da	*Epicauta* spp.
Limoneno	*Gossypium* spp.	At	*A. grandis*
Maisina	*Z. mays*	Da	*Helicoverpa zea*
Óleo de mostarda	Crucíferas	At, Ea	*Pieris brassicae, Pieris rapae*
Orizina	*Oryza sativa*	At	*Chilo suppressalis*
Sinigrina	Crucíferas	At, Ea	*M. persicae, Plutela maculipennis*
Solanina	*Solanum* spp.	Da	*L. decemlineata*
Terpentina	*Pinus* spp.	R	*Liparis monarcha*
3-careno	*P. silvestris*	R	*B. piniperda*
Vapores de monoterpenos	*Abies grandis*	R	*Scolytus ventralis*

[1]Ar = Arrestante; At = Atraente; Da = Deterrente de alimentação; Ea = Estimulante de alimentação; R = Repelente.
Fontes: Norris & Kogan (1980) e Lara (1991)

TABELA 4. Aleloquímicos produzidos por plantas que afetam o metabolismo de insetos.

Aleloquímicos	Planta	Efeito[1]	Inseto afetado
DIMBOA	*Zea mays*	Id	*Ostrinia nubilalis*
Gossipol	*Gossypium* spp.	Id	*Heliothis* spp., *Lygus hesperus*
Quercetina	*Gossypium* spp.	Id	*Heliothis* spp., *Schizaphis graminum*, *Pectinophora gossypiella*
		Ed	*Anthonomus grandis*
Pinitol	*Glycine max*	Id	*Helicoverpa zea*
Sesamina	*Magnolia kobus*	Id	*Bombyx mori*
Solanina	*Solanum* spp.	Id	*Leptinotarsa decemlineata*
Tomatina	*Lycopersicon* spp.	Id	*H. zea, Spodoptera exigua*
2- Tridecanona	*Lycopersicon* spp.	Id	*H. zea, Manduca sexta, Aphis gossypii*

[1] Ed = Estimulante do desenvolvimento; Id = Inibidor do desenvolvimento
Fontes: Norris & Kogan (1980) e Lara (1991)

Causas Morfológicas - Os fatores morfológicos de resistência são representados por diversas características da planta que podem ser agrupadas basicamente em fatores estruturais e fatores da epiderme. Os fatores estruturais estão relacionados à dimensão e à disposição das estruturas vegetais. Verifica-se em gramíneas, por exemplo, que órgãos vegetais com menor comprimento, largura e diâmetro bem como plantas mais baixas têm sido associados, em alguns casos, com menor infestação e menor dano por insetos e, desse modo, considerados como causa de resistência (Lara *et al.*, 1979; Martins *et al.*, 1981; Lourenção *et al.*, 1982; Ukwungwu & Odebiyi, 1985). Entretanto, além dos resultados nem sempre concordantes, normalmente tais fatores de resistência são agronomicamente indesejáveis, o que limita a sua utilização no melhoramento vegetal. Em relação à disposição das estruturas vegetais, a compressão ou compactação das folhas tem sido bastante estudada, tendo-se verificado, por exemplo, menor ataque da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* em variedades de cana-de-açúcar com bainhas foliares mais compactadas ("agarradas"), já que isso dificulta a penetração das lagartas no colmo (Agarwal, 1969; Macedo, 1978). A compressão das palhas que protegem os estilos-estigmas em milho, dificultando a penetração larval também é um fator de resistência a *Helicoverpa zea* (Linduska & Harrison, 1977; Wiseman & Isenhour, 1992; 1994). Em algodoeiro, as brácteas levemente retorcidas e perpendiculares ao eixo das flores e maçãs, não as recobrindo totalmente (bráctea "frego") têm sido consideradas causa de resistência ao bicudo *A. grandis* já que inibe a oviposição do inseto (Mitchell *et al.*, 1973; Smith, 1992). A disposição da pálea e lema da casca dos grãos de arroz pode constituir causa de resistência a *Sitophilus* spp. e *Sitotroga cerealella*, uma vez que grãos íntegros são menos atacados que aqueles com defeito na casca (fenda lateral ou ponta aberta) (Link & Rossetto, 1972; Vendramim *et al.*, 1989; Nunes *et al.*, 1992).

Os principais fatores de resistência vegetal relacionados à epiderme são espessura, dureza, textura, cerosidade e pilosidade. Epidermes mais espessas normalmente afetam negativamente os insetos reduzindo a alimentação (principalmente insetos sugadores), impedindo ou dificultando a penetração de insetos minadores ou dificultando a oviposição endofítica, constituindo-se assim em fatores de resistência. Um exemplo disso ocorre em tomateiro selvagem, em que o maior

espessamento do córtex do caule confere resistência ao pulgão *Macrosiphum euphorbiae* já que impede que o aparelho bucal do inseto atinja o tecido vascular (Quiras *et al.*, 1977). Cultivares de trigo apresentando caules com maior solidez (maior compactação de tecidos internos), por outro lado, têm sido freqüentemente referidas como resistentes a insetos que atacam o caule dessa planta (Wallace *et al.*, 1973; Miller *et al.*, 1993; DePauw *et al.*, 1994).

Epidermes com textura mais dura, devido à disposição dos tecidos e deposição de sílica e lignina, também constituem barreiras mecânicas para algumas espécies, como tem sido constatado em sorgo onde as variedades com maiores quantidades de sílica e lignina são menos atacadas pela mosca *Atherigona varia soccata* (Blum, 1968). A correlação negativa entre a quantidade de sílica e o ataque de insetos tem sido observada em diversas culturas, como em arroz em relação à diversas espécies de brocas-do-colmo (Djamin & Pathak, 1967; Ukwungwu & Odebiyi, 1985; Sudhakar *et al.*, 1991) e em batata atacada pelo besouro *Cylas formicarius* (Singh *et al.*, 1993). Correlação semelhante tem sido verificada entre a quantidade de lignina e o ataque de pragas em feijoeiro e alfafa (Springer *et al.*, 1990; Cipollini Jr., 1997). A maior dureza da casca do internódio em cana-de-açúcar, por outro lado, é fator de resistência à broca (Martin *et al.*, 1975). Diversos outros casos de resistência associada à dureza dos órgãos vegetais têm sido citados envolvendo diversas espécies de insetos (Ramalho *et al.*, 1976; Azhar & Long, 1996; Howard & Giblin-Davis, 1997).

A textura da epiderme dos grãos pode afetar o comportamento do inseto, principalmente a oviposição, tendo sido constatado que as fêmeas de *Callosobruchus* spp. preferem ovipositar em sementes lisas, evitando as superfícies rugosas (Nwanze *et al.*, 1975; Nwanze & Horber; 1976; Ahmed *et al.*, 1993).

A cerosidade das folhas causa efeitos diferenciados dependendo da planta e do inseto. Assim, enquanto em *Brassica oleracea* var. *itálica* a cerosidade confere resistência ao besouro *Phyllotreta albionica*, ela é fator de suscetibilidade de *Brassica oleracea* var. *acephala* ao pulgão *Brevicoryne brassicae* e à mosca branca *Aleurodes brassicae* (Norris & Kogan, 1980).

Outro fator da epiderme que afeta o comportamento e a biologia dos insetos é a pilosidade que, em alguns casos, é fator de suscetibilidade e, em outros, de resistência. A pilosidade pode atuar diretamente sobre o inseto, afetando a oviposição, alimentação, locomoção ou indiretamente através dos exsudatos secretados por tricomas glandulares. Um dos efeitos mais marcantes dos tricomas é observado na oviposição do inseto. Para alguns insetos, eles provocam a redução da oviposição, podendo-se citar, como exemplos, *Empoasca* spp. e *Spodoptera littoralis* em algodoeiro, *Oulema melanopus* e *M. destructor* em trigo, *Chilo suppressalis* em arroz, *Epilachna varivestis* em sorgo, enquanto para outros a pilosidade estimula a oviposição, como por exemplo, para *H. zea* em milho e *A. grandis*, *Heliothis* spp. e *Trichoplusia ni* em algodoeiro (Norris & Kogan, 1980). Os tricomas podem também dificultar a locomoção dos insetos, o que ocorre, principalmente, com densa pubescência (Smith *et al.*, 1975; Cosenza, 1981; Ramalho *et al.*, 1984). Esta dificuldade se torna mais acentuada nos casos em que os tricomas, por apresentarem forma de gancho, capturam insetos pequenos como pulgões e cigarrinhas (Johnson, 1954; Pillemer &Tingey, 1976, 1978; Quiring *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1994). As exsudações produzidas por

tricomas glandulares, presentes em diversas plantas como, por exemplo, tomate e batata também são importantes fatores de resistência, já que podem dificultar a locomoção do inseto, provocar repelência; reduzir a oviposição e causar aderência do inseto à superfície vegetal, além de ocluir o aparelho bucal, levando o inseto à morte por inanição (Tingey & Gibson, 1978; Tingey *et al.*, 1982; Neal *et al.*,1989; Museti & Neal, 1997).

3. GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

O desenvolvimento de variedades resistentes deve sempre envolver considerações sobre a variabilidade genética das populações da praga e da cultura (Hooker, 1983). A resistência de muitas variedades é efetiva somente por um período de tempo devido ao desenvolvimento de novos biótipos da praga, aos quais as variedades resistentes são suscetíveis. A durabilidade do caráter resistência em uma variedade é uma consideração importante dentro do melhoramento de plantas visando à resistência a insetos e depende fundamentalmente de seu controle genético.

A resistência de plantas a insetos pode ser considerada tanto um caráter qualitativo como quantitativo. A resistência que é controlada efetivamente por um ou poucos genes, resultando em classes distintas de fenótipos, em termos de presença ou ausência do caráter, sem estágios intermediários, é denominada de resistência vertical ou específica. Esse tipo de resistência ocorre quando o ataque em uma série de variedades de uma espécie vegetal, infestada por uma série de biótipos de um inseto, apresenta interação diferencial. A resistência vertical é controlada por genes maiores ou oligogenes; é mais fácil de ser incorporada em novas variedades e, geralmente, de alto nível. A maior desvantagem é que este tipo de resistência pode ser o ponto de partida para a seleção de novos biótipos, os quais podem ser capazes de atacar as variedades resistentes. A resistência controlada por vários genes, apresentando distribuição contínua e ocorrendo em vários níveis entre um máximo e um mínimo, é denominada resistência horizontal ou geral. Esse tipo de resistência ocorre quando o ataque de uma série de variedades de uma espécie vegetal, infestada por uma série de biótipos de um inseto, não apresenta interação diferencial. A resistência horizontal apresenta um controle genético poligênico, é mais estável, porém de nível inferior em relação à resistência vertical e geralmente com baixa herdabilidade, o que resulta em maior dificuldade de incorporação no material vegetal.

Embora o controle genético seja bem diferenciado entre resistência horizontal e vertical, uma espécie de planta pode apresentar ambas para uma mesma praga, ou ser específica e diferencial para os diferentes insetos que danificam a cultura (Tabela 5).

3.1 RESISTÊNCIA VERTICAL

A resistência que é qualitativamente herdada é normalmente denominada de resistência específica (Fehr, 1987) ou vertical (Van der Plank, 1963) e é controlada por um ou poucos genes, que resultam em classes distintas de plantas resistentes e suscetíveis, sem estágios intermediários. A resistência vertical está relacionada com a capacidade de genes maiores da planta controlarem raças específicas (biótipos) da praga. Os alelos individuais de um gene maior podem ser prontamente identificados e transferidos de um genótipo para outro. A segregação de um gene maior pode ser prevista facilmente com base nos genótipos dos parentais de um cruzamento. Além

TABELA 5. Herança e tipo de ação gênica envolvidos na resistência a insetos em algumas culturas.

Cultura	Inseto	Natureza da Resistência
Arroz	*Chilo suppressalis*	Poligênica; Monogênica-dominante[1]
	Nephotettix impicticeps	Monogênica-dominante[1]
	Nilaparvata lugens	Poligênica; Monogênica-dominante[1]
	Sogatella furcifera	Monogênica-dominante[1]
Cevada	*Mayetiola destructor*	Monogênica-dominante[1]
		Genes complementares[1]
Feijão-guandu	*Helicoverpa armigera*	Monogênica-dominante[3]
	Melanagromyza obtusa	Poligênica; Monogênica-dominante[3]
Milho	*Diabrotica speciosa*	Poligênica-aditiva[6]
	Diatraea saccharallis	Poligênica-aditiva[6]
	Elasmopalpus lignosellus	Poligênica[6]
	Helicoverpa zea	Poligênica-aditiva e não-aditiva[6];
		Monogênica dominante[6]
	Sitophilus zeamais	Poligênica-aditiva[6]
	Spodoptera frugiperda	Poligênica-aditiva[6];
		Monogênica-dominante[6]
Soja	*Pseudoplusia includens*	Poligênica-aditiva[2, 4]
Sorgo	*Atherigona varia soccata*	Poligênica-aditiva; Efeitos epistáticos[1]
	Rhopalosiphum maidis	Monogênica- dominante[1]
Tomate	*Macrosiphum euphorbiae*	Poligênica; Efeitos epistáticos[5]
Trigo	*M. destructor*	Poligênica; Monogênica-dominante[1]
	Oulema melanopus	Poligênica-aditiva[1]
	Schizaphis graminum	Monogênica-dominante[1]
	Diuraphis noxia	Poligênica; Efeitos epistáticos;
		Monogênica dominante[1]

Fontes: [1]Pathak (1970); [2]Kilen & Lambert (1998); [3]Verulkar *et al.* (1997); [4]Kenty *et al.* (1996); [5]Mutschler *et al.* (1996), [6]Mihm *et al.* (1994).

disso, a presença do alelo em um genótipo pode ser determinada expondo uma planta em particular ou sua progênie a um biótipo específico da praga. A primeira desvantagem da resistência vertical é sua vulnerabilidade a novos biótipos da praga. Quando uma variedade com um gene maior para resistência é exposta a uma população geneticamente variável da praga, normalmente é suscetível a um ou mais biótipos. Porém, estes últimos ocorrem com freqüências muito baixas dentro da população da praga, causando danos não mensuráveis na variedade. O uso contínuo dessa variedade resistente pode resultar em um aumento na freqüência de biótipos aos quais essa variedade é suscetível e a praga pode então, causar prejuízos maiores.

Uma característica importante da resistência vertical é que existem genes específicos de resistência na planta, assim como a praga também tem genes específicos para a capacidade de ataque. Este é um fenômeno conhecido como relação gene-a-gene. Esta teoria foi apresentada por Flor (1942), pesquisando o fungo *Melampsora lini*, causador da ferrugem no linho. Esse pesquisador demonstrou que, para cada gene de resistência no hospedeiro (planta), há um gene correspondente no parasita. Pode-se afirmar que essa relação gene-a-gene funciona como um sistema de chave e cadeado (Robinson, 1996). Cada gene de resistência no hospedeiro corresponde a um cadeado e cada gene de agressividade no parasita, a uma chave. Quando um

parasita ataca o hospedeiro, sua chave pode ou não servir no cadeado da planta. Caso sirva, o ataque tem sucesso, porque a porta da resistência foi aberta. Quando isso ocorre, a resistência vertical foi quebrada. Caso a chave do parasita não abra o cadeado da planta hospedeira, o ataque é barrado.

O conceito gene-a-gene foi idealizado para a ferrugem no linho e algumas considerações devem ser adicionadas na teoria, em relação ao ataque de insetos. A chave do inseto quando abre o cadeado possibilita o ataque à planta. Não há alteração em sua biologia e o ataque causa danos apenas na planta. Quando a chave não serve ainda assim podem ocorrer alguns danos na planta hospedeira, porém são bem inferiores aos da condição anterior e o inseto é afetado negativamente em sua biologia. Diehl & Bush (1984) questionam a aplicabilidade dessa teoria em todos os sistemas inseto-planta, porém, Robinson (1996) relatou que em todos os casos de resistência vertical existe a relação gene-a-gene. Em outras palavras, a resistência vertical é o resultado de uma relação gene-a-gene (Panda & Khush, 1995).

Um exemplo da teoria gene-a-gene em insetos pode ser representado pela relação mosca de Hesse e trigo (Panda & Khush, 1995). As larvas dessa praga se alimentam do trigo suscetível resultando em folhas reduzidas, mal formadas, de coloração verde-escura. As folhas novas de plantas atacadas não se formam. As plantas resistentes permanecem verde-claras, assim como as plantas suscetíveis não atacadas. As larvas que se alimentam de plantas resistentes geralmente morrem. O pequeno número que sobrevive apresenta um período larval mais longo que o normal e não causam sintomas de ataque na planta. Devido a essa última característica, larvas agressivas – aquelas que conseguem sobreviver e causam danos às plantas – podem ser diferenciadas das não agressivas pela reação da planta, ou pela reação do inseto em plantas de genótipo conhecido. A distinção do genótipo, portanto, é baseada na agressividade/não agressividade das larvas a diferentes genótipos de trigo com genes conhecidos de resistência. Um biótipo pode ser agressivo a uma linhagem específica, enquanto que outro biótipo pode ser não agressivo. Portanto os termos agressividade e não agressividade descrevem a reação do inseto à planta, enquanto que resistência e suscetibilidade descrevem a reação da planta ao inseto. O biótipo pode ser determinado pelo *ranking* da reação da planta às larvas da praga e a habilidade das mesmas em sobreviver.

A partir dessa relação de ataque do inseto e resposta da planta, foram identificados cinco locos para agressividade (*t*, *s*, *m*, *k* e *a*) e oito biótipos na mosca de Hesse (Gallun, 1977). Esses cinco locos de agressividade da praga correspondem a cinco genes de resistência no trigo. A agressividade de um biótipo do inseto em uma variedade de trigo é condicionada pela homozigosidade de um alelo recessivo para agressividade em um loco específico, que corresponde a um gene dominante específico do trigo que condiciona resistência. Portanto, um biótipo de mosca de Hesse pode ser agressivo a uma variedade específica de trigo somente se este biótipo for homozigoto para alelos recessivos agressivos em todos os locos, os quais correspondem aos locos em que as plantas de trigo devem possuir alelos dominantes para condicionar a resistência. Assim, os caracteres agressividade nos biótipos e suscetibilidade nas variedades são recessivos e, conseqüentemente, a não agressividade e a resistência, dominantes. Na Tabela 6 são apresentados oito biótipos de mosca de Hesse e a expressão do caráter resistência em relação a cinco cultivares de trigo.

TABELA 6. Biótipos da mosca de Hesse e a expressão da resistência em cinco cultivares de trigo.

Biótipos	Cultivares de trigo				
	Turkey	Seneca	Monon	Knox 62	Abe
GP	tt	S_	M_	K_	A_
A	tt	ss	M_	K_	A_
B	tt	ss	mm	K_	A_
C	tt	ss	M_	kk	A_
D	tt	ss	mm	kk	A_
E	tt	S_	mm	K_	A_
F	tt	S_	mm	kk	A_
G	tt	S_	mm	kk	A_

Biótipos homozigotos para alelos recessivos são cultivares de trigo que possuem pelo menos um alelo dominante no loco correspondente que condiciona resistência.
Fonte: Panda & Khush (1995)

A cultivar de trigo Turkey é suscetível a todos os biótipos porque não tem nenhum gene de resistência. As cultivares Seneca, Monon, Knox 62 e Abe são resistentes ao biótipo GP, porque o mesmo possui, no mínimo, um alelo dominante para não agressividade nos locos correspondentes aos locos do trigo, que possuem alelos dominantes que condicionam resistência. A capacidade de agressividade ocorre somente quando há homozigosidade recessiva para os alelos agressivos em um loco do biótipo que corresponde ao loco para resistência na planta. Dessa forma, o biótipo A, além de ser agressivo a cultivar Turkey, também é agressivo a cultivar Seneca, porque apresenta homozigosidade recessiva para o gene agressivo *s*, que corresponde a um gene de resistência dominante em Seneca. Porém, é não agressivo às cultivares Monon, Knox 62 e Abe porque possui alelos não agressivos dominantes nos locos correspondentes aos que carregam alelos dominantes para resistência nas cultivares. O biótipo D é homozigoto recessivo para os alelos nos locos agressivos *s*, *m* e *k* e portanto é agressivo as cultivares Seneca, Monon e Knox 62, assim como para Turkey. Porém, é não agressivo a 'Abe' porque o biótipo possui um alelo não agressivo dominante no loco A, que corresponde ao gene de resistência dessa cultivar. Nesse exemplo, para uma correta interpretação, assume-se que quando ocorre o ataque do inseto, a planta não possui genes de resistência e o inseto apresenta os genes de agressividade, uma condição de homozigosidade recessiva para ambos organismos. Da mesma forma, quando o inseto não consegue atacar a planta, presume-se que o inseto possui pelo menos um gene dominante que condiciona não agressividade, e a planta também possui pelo menos um gene dominante, que condiciona resistência, uma condição heterozigota ou homozigota dominante nos locos de ambos organismos.

3.2 RESISTÊNCIA HORIZONTAL

A resistência controlada por vários genes é considerada um caráter quantitativo e é denominada não específica, geral, poligênica (Fehr, 1987), parcial (Parlevliet, 1992) ou horizontal (Van der Plank, 1963). Cada um dos termos descreve alguns aspectos de natureza da resistência genética nas plantas relacionada com a variabilidade genética dos insetos.

A resistência horizontal é causada pela expressão de genes de resistência em vários locos, cada qual com um pequeno efeito aditivo. A grande vantagem da resistência horizontal consiste na sua habilidade em controlar um amplo espectro de biótipos do inseto. Novos biótipos têm grande dificuldade em transpor as barreiras impostas pelos vários alelos de resistência. A grande desvantagem desse tipo de resistência consiste na dificuldade de transferi-la de um genótipo para outro. Os alelos individuais nos parentais não podem ser identificados, sendo muito difícil de predizer a freqüência dos indivíduos desejados na progênie de um cruzamento. A probabilidade de se transferir todos os alelos desejados de um genótipo resistente a um suscetível é muito baixa quando um grande número de genes está envolvido.

Segundo Panda & Khush (1995), a resistência horizontal ou poligênica a insetos tem sido encontrada em muitas culturas. Enquanto que para genes maiores, os fenótipos podem ser classificados em classes distintas, na herança poligênica, os níveis de resistência entre indivíduos diferem em graus e apresentam variação contínua. Segundo Falconer (1987), a herança de caracteres poligênicos é complexa. O conceito básico se refere a muitos genes com efeitos pequenos, porém uniformes, que governam o caráter e a expressão da resistência quantitativa é fortemente influenciada pelo ambiente. Sua herdabilidade e os componentes genéticos de variação são inferiores aos da resistência vertical (monogênica). Contudo, segundo Allard (1960), os genes que determinam uma variação contínua apresentam a tendência de se comportar como genes maiores.

Além dos pequenos efeitos aditivos de muitos genes, a genética quantitativa também pressupõe que a expressão fenotípica da característica de resistência pode ser modificada por interações intra-alélicas (dominância), inter-alélicas (epistasia), efeitos de genes em outros caracteres (pleiotropia) e finalmente pelo ambiente. Na sua forma mais simples, de acordo com Falconer (1987) e Panda & Khush (1995), a variação fenotípica total de um caráter herdado quantitativamente pode ser representada por:

$V_F = V_G + V_E$, onde:

V_F é a variância fenotípica total; V_G é a variância genotípica e V_E, a variância ambiental.

A variância genotípica pode ainda ser dividida em aditiva e não-aditiva. A variância não-aditiva pode também ser dividida em interações dominante (intra-alélica) e epistática (inter-alélica). Estes parâmetros podem ser utilizados para estimar a herdabilidade do caráter, cuja estimativa influencia na estratégia de melhoramento genético a ser adotada.

Devido à complexidade da herança dos caracteres quantitativos, procedimentos de genética biométrica são utilizados para inferir sobre a existência e propriedades dos genes que os controlam. Os componentes de variância podem ser estimados tanto a partir de médias de parentais, F_1's e gerações segregantes, como a partir das variâncias dos parentais e F_1's em uma série de cruzamentos (análise dialélica).

3.3 RESISTÊNCIA VERTICAL *VERSUS* RESISTÊNCIA HORIZONTAL

A resistência vertical geralmente proporciona um alto nível de resistência contra insetos herbívoros. Existem algumas vantagens em se utilizar esse tipo de resistência em programas de melhoramento, entre elas, a facilidade de se transferir de

uma variedade a outra e o maior nível de resistência. Quando o inseto-praga é um vetor de vírus, a resistência vertical ao inseto confere indiretamente, resistência à infecção do vírus, já que o inseto não se alimentando da planta resistente, não inocula o vírus. Contudo, sua maior desvantagem consiste na forte pressão de seleção na população do inseto, o que pode levar ao desenvolvimento de novos genótipos (biótipos), os quais são capazes de atacar as variedades resistentes com genes específicos.

Segundo Panda & Khush (1995), muitos autores questionam o uso da resistência vertical no melhoramento de plantas, porém há alguns relatos de sucesso do emprego da resistência vertical no controle de insetos em algumas culturas, entre eles, o melhoramento de variedades de trigo para resistência à mosca de Hesse nos Estados Unidos (Painter, 1968) e o melhoramento de variedades de arroz para resistência à cigarrinha *Nilaparvata lugens* na Ásia (Khush, 1992). Dentro de um programa dinâmico de melhoramento genético, o problema de surgimento de novos biótipos podem ser contornados. Os pesquisadores que trabalham com resistência de plantas a insetos devem dominar métodos para coletar germoplasma, avaliar e identificar as fontes de resistência, analisar geneticamente o material resistente, identificar genes distintos para resistência e incorporar os diversos genes no germoplasma elite (Panda & Khush, 1995). Se uma variedade resistente com um gene específico se torna suscetível devido ao surgimento de um novo biótipo, uma outra variedade com um gene diferente pode ser criada em um espaço de tempo relativamente curto.

A grande vantagem da resistência horizontal consiste em sua atuação sobre um grande número de biótipos do inseto. O nível de resistência geralmente não é muito alto e, por isso, não exerce uma forte pressão de seleção no inseto, sendo, conseqüentemente mais estável. A grande desvantagem da utilização da resistência horizontal é o longo tempo necessário para se acumular poligenes a partir de diversas fontes de germoplasma e, assim, construir um nível de resistência desejável. Em plantas alógamas, a resistência horizontal é mais facilmente trabalhada, pois novos recombinantes são produzidos a cada geração e o ciclo de seleção é repetido por várias gerações, aumentando a freqüência de alelos favoráveis para resistência. Porém, o sucesso do melhoramento genético depende muito da eficiência das técnicas de avaliação e da herdabilidade do caráter de resistência. Em plantas autógamas como o arroz, métodos de melhoramento especiais são utilizados para gerar novos recombinantes após um ciclo inicial de cruzamentos entre parentais com algum nível de resistência. Por exemplo, o cruzamento pode ser induzido em autógamas pela introdução de genes de macho-esterilidade em uma população. Por seleção recorrente, os poligenes de diferentes fontes podem ser acumulados e assim um nível cada vez maior de resistência pode ser alcançado (Panda & Khush, 1995).

4. FATORES DO AMBIENTE QUE AFETAM A MANIFESTAÇÃO DA RESISTÊNCIA

Os parâmetros climáticos, edáficos e nutricionais afetam os fatores químicos e fisiológicos da planta, o que provoca, conseqüentemente, efeitos sobre a manifestação da resistência.

Temperatura – É o principal fator que influencia os processos fisiológicos da planta e do inseto incluindo a magnitude e a expressão da resistência. Tanto as altas como as baixas temperaturas podem causar a perda de resistência. Segundo Tingey & Singh (1980), a temperatura pode modificar o nível e a expressão da resistência, principalmente através de três formas: a) influência nos processos fisiológicos da planta afetando a adequação da planta hospedeira, o que indiretamente altera a biologia das pragas; b) influência direta nas respostas fisiológica e de crescimento da planta devido ao dano provocado pela alimentação da praga; c) influência direta na biologia e comportamento da praga. A maioria dos efeitos induzidos pela temperatura na expressão genética da resistência parece envolver os dois primeiros efeitos, isoladamente ou combinados.

A perda da resistência em função da redução da temperatura tem sido registrada principalmente para pulgões, encontrando-se na literatura exemplos nas culturas de alfafa (Hackerott & Harvey, 1959; Kindler & Staples, 1969), sorgo (Wood & Starks, 1972; Starks *et al.*, 1973), trigo (Thindwa & Teetes, 1994) e cevada (Corcuera, 1993). Perda de resistência com aumento de temperatura, por outro lado, também tem sido registrada, por exemplo, com *M. destructor* em trigo (Cartwright *et al.*, 1946; Sosa Jr. & Foster, 1976). Um outro aspecto importante é que os resultados obtidos com temperaturas constantes (normalmente utilizadas em condições de laboratório) nem sempre se mantêm quando os genótipos são mantidos em temperaturas variáveis como as que ocorrem em condições de campo (Kindler & Staples, 1969; Stamp, 1994), o que deve ser considerado ao se extrapolar os resultados de um local para outro.

Umidade – A influência da umidade relativa na expressão da resistência tem sido observada principalmente com pragas de grãos armazenados. De forma similar ao constatado com a temperatura, também no caso da umidade, os valores extremos podem alterar a resistência. Assim, em ambientes com umidade muito baixa, os grãos têm o teor de umidade reduzido, atingindo níveis inadequados ao inseto, o que faz com que materiais suscetíveis em condições normais de umidade, se assemelhem aos resistentes. Esse efeito sobre o inseto, ocorre igualmente com excesso de umidade, que proporciona boas condições para o desenvolvimento de fungos, tornando tanto os materiais resistentes como os suscetíveis inadequados aos insetos. Em alguns casos, mesmo a variação da umidade dentro de faixas adequadas pode afetar a manifestação da resistência conforme observado com *Sitophilus oryzae* e *S. zeamais* (Russell, 1966; Rogers & Mills, 1974), o que foi atribuído ao efeito diferenciado da umidade sobre os genótipos.

O efeito da umidade do solo na manifestação da resistência ainda não é muito bem conhecido porque a maioria dos trabalhos tem restringido esse estudo a apenas um genótipo. Apesar dessa restrição, esse tipo de efeito fica evidenciado em diversos trabalhos. Um dos estudos mais completos sobre o assunto foi feito com pulgões, tendo sido constatado que a população desses insetos pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada em plantas submetidas a estresse hídrico. Diversos pesquisadores têm tentado explicar esses resultados aparentemente contraditórios argumentando que existem dois fatores de interação e que eles provocam efeitos opostos. Um desses efeitos é que o estresse provocado pela umidade acelera a quebra

e mobilização de proteínas e de amido, aumentando conseqüentemente o teor de nitrogênio e de açúcares, o que geralmente, tende a provocar aumento na população de pulgões. Um outro efeito é que o estresse hídrico reduz a pressão celular, alterando a viscosidade da seiva no floema, o que afeta os pulgões que dependem de uma pressão adequada da seiva para a ingestão de nutrientes solúveis. Assim, a influência do enriquecimento da seiva predominaria trazendo efeitos benéficos em situações de estresse moderado, enquanto em situações de estresse severo e contínuo, a redução na tomada de alimento resultante do menor turgor celular predominaria, limitando a *performance* do pulgão (Kennedy *et al.*, 1958; Kennedy & Booth, 1959). Evidências experimentais desses efeitos foram comprovadas com pulgões em diversas plantas hospedeiras (Wearing, 1967, 1972a,b; Wearing & Van Emden, 1967). Em termos práticos, os resultados desse tipo de estudo sugere que a manutenção de níveis adequados de umidade de solo confere um grau relativo de proteção, limitando o crescimento da população de pulgões.

Intensidade de luz – Um exemplo do efeito da intensidade de luz na manifestação da resistência ocorre em trigo, cuja resistência à larva da vespa *Cephus cinctus* é diminuída pela redução na dureza do caule provocada pela baixa intensidade de luz (Holmes *et al.*., 1960; Roberts & Tyrrell, 1961). Efeitos diferenciados da intensidade de luz provocando variação na resistência de genótipos de beterraba açucareira ao pulgão *Myzus persicae* também foram observados (Lowe, 1974). A redução na quantidade de aleloquímicos na planta em função da menor intensidade de luz, provocando a diminuição da resistência varietal também foi registrada em diversos casos, envolvendo, por exemplo, o teor de glicoalcalóides totais, fator de resistência em genótipos de batata a *Leptinotarsa decemlineata* e o teor de benzoxazolinonas e seus ácidos hidroxâmicos precursores que conferem resistência do milho a *Ostrinia nubilalis* (Norris & Kogan, 1980).

Fertilidade do solo – O desenvolvimento das plantas é dependente dos nutrientes do solo. Variações na quantidade de macro e micronutrientes do solo podem criar condições ambientais mais ou menos favoráveis aos insetos. Em alguns casos, os próprios nutrientes afetam os fatores de resistência, alterando conseqüentemente a expressão desta. Dentre os nutrientes, o nitrogênio é o que tem sido mais estudado. Geralmente, a deficiência de nitrogênio no solo provoca efeitos negativos no inseto limitando o seu crescimento, sobrevivência e fecundidade (Norris & Kogan, 1980). Entretanto, em alguns casos, os efeitos desse nutriente têm sido contraditórios, como por exemplo, em gramíneas e *Spodoptera frugiperda*, em que em um experimento foi constatado que a fertilização nitrogenada afetou negativamente o desenvolvimento larval (Leuck, 1972), enquanto, em outro, essa condição proporcionou maior consumo alimentar desse inseto (Chang *et al.*, 1985). A influência do fósforo e do potássio têm sido estudada em menor escala e varia consideravelmente em função da espécie de cultura e de inseto. McMurtry (1962) registrou maior sobrevivência e reprodução de *Terioaphis maculata* em clones resistentes de alfafa com deficiência de potássio, constatando o inverso em plantas deficientes de fósforo. Considerando que nas plantas suscetíveis não houve efeito desses nutrientes, a expressão relativa da resistência acabou sendo alterada. Kindler & Staples (1969) observaram também menor resistência a essa praga em clones de alfafa com deficiência de cálcio ou excesso de magnésio e

nitrogênio. Em tabaco, a população de *Epitrix hirtipennis* diminuiu com a adubação nitrogenada e fosfatada e aumentou com a adubação potássica (Semtner *et al.*, 1980). Por outro lado, enquanto a *performance* do gafanhoto *Melanoplus bilituratus* foi melhorada em trigo deficiente em fósforo (Smith, 1960), o inverso ocorreu com deficiência desse elemento com o pulgão *Schizaphis graminum* em trigo (Daniels *et al.*, 1968). Estes efeitos diferenciados muitas vezes ocorrem porque há uma complexa interação dos macronutrientes com o pH, umidade e outras características químicas e físicas do solo e dificilmente essas condições são homogêneas nos diversos experimentos.

Outros fatores – Existem diversos outros como a densidade e a época de plantio, a cultura precedente, as plantas adjacentes, os inimigos naturais, o pH do solo, os defensivos agrícolas etc., que também influenciam direta ou indiretamente a planta e o inseto, modificando conseqüentemente a expressão da resistência. Em função disso, recomenda-se que os experimentos de campo visando a obtenção de resistência varietal a insetos sejam desenvolvidos numa situação a mais próxima possível de um cultivo comercial.

5. ETAPAS DE UM PROGRAMA DE MELHORAMENTO

Um programa de melhoramento visando resistência a insetos envolve diversas etapas e, por isso, tem que ser muito bem planejado. Segundo Jenkins (1981) e Wiseman (1987), uma série de informações sobre a planta e sobre o inseto, bem como sobre a interação inseto-planta devem preceder qualquer programa. Além disso, é essencial que o programa conte com a participação simultânea de entomologistas e melhoristas, bem como que haja intercâmbio com pesquisadores de áreas afins. Em relação ao espaço físico, são necessários um laboratório de entomologia, para a obtenção de dados sobre o inseto e a sua posterior criação para as liberações no campo; um laboratório de melhoramento de plantas, onde serão realizadas as práticas em relação às plantas; e campos experimentais, telados e/ou casas de vegetação, onde serão conduzidos os ensaios de resistência e melhoramento.

Inicialmente deve-se estabelecer para qual praga ou pragas a resistência de plantas será direcionada. Geralmente, o objetivo é atingir a praga-chave, ou seja, aquela responsável pelos maiores danos na cultura. A etapa seguinte se refere à identificação e coleta de fontes de resistência. Muitas vezes, os genes de resistência estão em materiais exóticos, selvagens e/ou acessos internacionais, cuja introdução envolve uma outra série de etapas. Estas fontes de resistência são então multiplicadas e avaliadas, geralmente em condições de campo sob a presença da praga. As fontes de resistência mais promissoras são selecionadas e, a partir desse ponto, inicia-se o melhoramento genético, visando uma variedade resistente com características agronômicas ideais.

5.1 DEFINIÇÃO DA PRAGA-CHAVE

Qualquer organismo que venha a competir com o homem pelo alimento por ele produzido pode ser considerado praga. Portanto, os insetos são considerados pragas quando a sua densidade populacional acarreta perdas econômicas ao homem. Conceitualmente, a praga-chave se refere a uma determinada espécie de inseto que

ataca uma determinada cultura, causando maior dano que aquele causado pelas demais pragas na mesma cultura. A avaliação ou quantificação dos danos pode ser direta (perdas na produção) e/ou indiretas (gastos na prevenção e controle). Ainda dentro desse conceito, deve ser mencionado que uma cultura pode possuir mais de uma praga-chave. Por exemplo, na cultura do milho existem 20 pragas principais (Cruz *et al.*, 1997). A praga que causa o maior dano econômico em condições de campo é a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, porém em relação aos grãos armazenados, a praga-chave é o gorgulho-do-milho, *S. zeamais*. Portanto, esse conceito não é fixo a uma espécie de inseto, ou seja, a praga-chave de uma cultura pode variar nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, bem como entre microrregiões e anos agrícolas diferentes. Portanto, a definição da praga-chave determina o objetivo inicial do programa de melhoramento, e com essa informação, inicia-se a procura de fontes de resistência.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E COLETA DE FONTES DE RESISTÊNCIA

O sucesso de um programa de melhoramento genético de plantas depende da variabilidade genética existente no germoplasma inicial. Essa variabilidade pode ser encontrada em coleções ou bancos de germoplasma e o acesso a essas coleções de base genética ampla é de fundamental importância nos programas que visam resistência de plantas a insetos, considerando-se que as populações da praga alteram seus padrões de agressividade e novos genes de resistência necessitam ser continuamente introduzidos (Panda & Khush, 1995).

Segundo Hoyt (1992), o germoplasma pode ser dividido em cinco categorias: a) parentes silvestres, b) populações locais e cultivares primitivas, c) cultivares obsoletas, d) linhas avançadas de melhoramento e mutações ou outros produtos de programas de melhoramento, e e) cultivares modernas. Essas categorias cobrem toda a variabilidade genética passada e presente de uma planta cultivada, ou seja, seu *pool* genético, constituindo a matéria-prima do melhorista.

As coletas de materiais genéticos geralmente são realizadas nos centros de diversidade da espécie. Estes novos acessos são caracterizados, classificados e mantidos em um banco de germoplasma específico com um arquivo de informações. A pesquisa inicial do melhorista ou entomologista é baseada nesses arquivos do banco de germoplasma, os quais podem ser solicitados ou encontram-se publicados em periódicos ou revistas especializadas. Se a praga alvo já foi bem estudada, provavelmente existem informações catalogadas sobre as fontes de resistência. Geralmente, os pesquisadores que buscam materiais resistentes a insetos recorrem ao centro de diversidade da planta. Isto porque as fontes de resistência ocorrem mais freqüentemente onde a praga é endêmica e coevoluiu com a planta hospedeira (Panda & Khush, 1995).

Quando não são encontradas informações sobre acessos resistentes, os pesquisadores coletam vários materiais seguindo diversos critérios informais (comunicações pessoais, observações de campo, entre outros) e os avaliam para resistência, identificando as fontes de interesse.

Identificado o material genético a ser utilizado como fonte de resistência, este pode ser solicitado tanto nos bancos de germoplasma da espécie, quando for integrante de coleções, como em centros de pesquisa, universidades, programas de melhoramento públicos ou privados que o utilizam. O intercâmbio de materiais

genéticos é muito comum entre centros de pesquisa e universidades. Uma observação importante nesse contexto é que a introdução de materiais estrangeiros deve seguir as normas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Decreto-lei nº 24.114, Portarias nºs 224 e 148, segundo Batista *et al.*, 1998), que coordena esse tipo de atividade no Brasil.

O material identificado como fonte de resistência pode pertencer a qualquer uma das cinco categorias mencionadas e isto vai influenciar na estratégia a ser adotada na transferência dos genes de resistência para cultivares comerciais, ou transformar a fonte de resistência em materiais com boas características agronômicas.

5.3 DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE MELHORAMENTO A SER UTILIZADO

A definição da estratégia ou método a ser adotado para se obter um material resistente começa a ser planejada após a identificação dos genitores detentores de genes de interesse (fontes de resistência). Quando esses genitores possuem boas características agronômicas, ou seja, apresentam um bom grau de melhoramento genético, a fonte de resistência pode ser incorporada dentro dos programas em andamento. Materiais comerciais conhecidos podem se revelar boas fontes de resistência. Isto porque esse caráter nunca foi avaliado em experimentos específicos e esses materiais sempre foram plantados sob pulverizações de inseticidas. Troyer (1990) ressaltou o uso de linhagens elite de milho como a melhor fonte de resistência, simplesmente porque esses materiais já contêm uma combinação das características genéticas produtivas desejáveis. Em outras palavras, materiais já melhorados e resistentes já estariam muito próximos do objetivo final do programa de melhoramento. Contudo, essa não é uma situação muito comum.

Quando as fontes de resistência são representadas por espécies selvagens, raças locais ou por materiais exóticos com pouco ou nenhum grau de melhoramento genético, há necessidade de serem cruzados com materiais que compõem o germoplasma elite. Isto porque nesse caso, só interessa o caráter resistência, sendo descartados os demais caracteres da fonte de resistência. A utilização de germoplasma exótico, não melhorado é complexa, porém a introgressão de diversidade genética a partir desses materiais exóticos em materiais elite tem sido utilizada para resistência a insetos (Rasmusson & Phillips, 1997). Os genes potencialmente úteis mantidos nas coleções de germoplasma somente serão utilizados caso sejam incorporados nos materiais considerados elite (Nass, 1999).

Quando o controle genético do caráter resistência é quantitativo, as fontes de resistência exóticas necessitam passar por um processo denominado pré-melhoramento (*pre-breeding*), através do qual são formadas populações base especificamente sintetizadas com uma ampla base genética.

Além do grau de melhoramento (*breeding status*) do germoplasma inicial e do controle genético do caráter, o sistema reprodutivo da espécie também influencia na escolha do método de melhoramento, devido principalmente às diferenças de estrutura genética entre populações autógamas e alógamas. Em populações de plantas autógamas, há uma baixíssima freqüência de heterozigotos, sendo composta quase exclusivamente de linhas homozigotas. Os genótipos que compõem uma variedade autógama são plantados lado a lado, porém permanecem independentes, geração

após geração. As plantas individuais de tais espécies são homozigotas altamente vigorosas e o objetivo final do programa de melhoramento é a linha pura.

As populações de plantas alógamas apresentam uma alta freqüência de heterozigotos, e o vigor das plantas é afetado pela endogamia. A heterozigosidade é uma condição fundamental nas cultivares comerciais dessas culturas e os programas de melhoramento são direcionados tanto para mantê-la, como para recuperá-la, transformando linhagens em híbridos.

O caráter resistência a insetos não apresenta grandes diferenças de outros caracteres nos programas de melhoramento (Ventura & Pinheiro, 1999), podendo ser considerado como uma avaliação adicional a ser acrescentada ao programa. Pode-se dizer, portanto, que o caráter resistência pode ser incluído em qualquer método de melhoramento de plantas, desde que o programa tenha estrutura para avaliar e discriminar materiais resistentes.

6. PRINCIPAIS MÉTODOS DE MELHORAMENTO

6.1 MÉTODOS DE MELHORAMENTO PARA PLANTAS AUTÓGAMAS

Os métodos mais utilizados para plantas autógamas são: seleção massal, método do *pedigree* ou genealógico, método *bulk*, método do retrocruzamento e método *single seed descent* que é uma variante do método genealógico.

Seleção massal – Neste método, são selecionadas centenas de plantas individuais de uma variedade suscetível qualquer com boas características agronômicas. Uma parte das sementes de cada planta é utilizada para testes de resistência. As sementes remanescentes das plantas consideradas resistentes são misturadas uniformemente, formando uma variedade melhorada resistente. Em centros de pesquisa avançados, esse método é raramente utilizado, limitando-se a programas de purificação de variedades (Panda & Khush, 1995).

Método do *pedigree* ou genealógico – Este método é o mais utilizado nos programas de melhoramento de plantas autógamas. A seleção inicial é feita segundo critérios de resistência à praga em questão, porém caracteres como vigor, qualidade, maturidade e resistência a doenças também são considerados. Na geração F_2 , a seleção ocorre em plantas individuais. Em F_3 e nas gerações subseqüentes, a seleção é feita dentro e entre progênies até que se atinja a homozigose desejada. A partir de então, a seleção ocorre entre famílias, até que o número de progênies se reduza a uma quantidade possível de ser avaliada em experimentos de produção. Os parentais são cuidadosamente escolhidos, geralmente uma variedade altamente adaptada e um material escolhido para resistência ao inseto em estudo. A maioria das variedades resistentes a insetos em espécies autógamas tem sido desenvolvida por este método (Singh, 1986). Contudo, segundo Pinto (1995), o método genealógico não seria o mais recomendado em plantas autógamas, pois prioriza os parentais de um cruzamento bem sucedido, enquanto que o sucesso na obtenção da resistência horizontal exige ênfase nas progênies. A obtenção de resistência horizontal que exige adaptação de muitos locos gênicos do inseto para que ele continue a causar danos à planta é um processo lento pelo envolvimento de muitos genes, maior dificuldade de detecção em plantas jovens, baixa herdabilidade e, por isso, de obtenção mais difícil do que a resistência vertical.

Johnson & Teetes (1979) descreveram o uso do método do *pedigree* para o melhoramento da resistência à mosca-do-sorgo *Contarinia sorghicolla*, incluindo as seguintes etapas: a) transferência do alto nível de resistência para tipos agronomicamente aceitáveis através de hibridação e seleção; b) utilização de linhagens agronomicamente aceitáveis com mínima suscetibilidade ao inseto como parental não resistente; c) desenvolvimento de uma população F_2 suficientemente grande (no mínimo 4000 plantas), sendo que a seleção nesse estágio poderia ser realizada sem a presença do inseto. A seleção para tipos com glumas pequenas aumentaria a freqüência de genes para resistência ao inseto praga na população F_2; d) avaliação de linhas F_3 sob infestação do inseto. Para garantir uma grande infestação durante o estágio de florescimento (estágio de maior suscetibilidade da cultura), as linhas F_3 deveriam ser plantadas em mais de uma data ou local; e) avaliação das linhagens F_4 selecionadas em F_3 em linhas repetidas de progênies e retrocruzamentos das plantas superiores para o parental recorrente, se necessário.

O método do *pedigree* tem sido usado em programas de melhoramento para resistência à mosca *A. soccata* e ao pulgão *S. graminum*, em sorgo (Johnson & Teetes, 1979) e às cigarrinhas *N. lugens, Nephotettix virescens e* em arroz (Khush, 1979).

Método *bulk* – No melhoramento visando resistência a insetos, este método foi modificado do original, podendo ser chamado de método *bulk* modificado (Panda & Khush, 1995). A diferença principal desse método em relação ao método do *pedigree* consiste na mistura de sementes das populações híbridas, sem se preocupar com sua origem. Uma amostra representativa da mistura de sementes dos materiais colhidos na geração anterior, é utilizada para originar a próxima geração *bulk*. No método tradicional, a seleção natural elimina os indivíduos inferiores, ocorrendo alterações nas freqüências gênicas da população (Frey, 1975). No método *bulk* modificado, é realizada uma seleção artificial baseada no desempenho de plantas individuais e não em testes de progênies de indivíduos selecionados. A inconveniência desse método é que o mesmo só pode ser aplicado quando a população segregante for conduzida em locais onde ocorrem altos níveis de infestação natural da praga em questão.

Método do retrocruzamento – Uma forma de se transferir resistência é através do método de retrocruzamentos. Assim, considerando-se um material não adaptado qualquer que possui o caráter de resistência controlado por um ou poucos genes, este é considerado o parental doador. Uma variedade elite suscetível é considerada o parental recorrente. Os parentais são cruzados obtendo-se assim a geração F_1. A prole F_1 é cruzada sucessivamente com o parental recorrente (sete ou oito vezes), observando-se sempre se o caráter resistência está presente. Se o caráter é dominante, descartam-se os homozigotos recessivos detectados por testes de resistência. Se o caráter é recessivo, somente as progênies que carregam os genes de resistência são avançadas. Após o último retrocruzamento, o material se constitui em uma variedade com a mesma adaptação, produção e qualidade do parental recorrente, porém superior ao parental resistente. Este método permite ao melhorista ter um alto controle genético das populações (Briggs & Allard, 1953). A eficiência do método de retrocruzamento para introgredir resistência a *Spodoptera exigua*, *H. zea* e *M. euphorbiae* a partir do acesso selvagem LA 716 do tomateiro *Lycopersicon pennelli* (Corr.) D'Arcy para o tomateiro comercial *Lycopersicon esculentum* foi examinada. Os resultados

evidenciaram que o método de retrocruzamento foi usado com sucesso nesse caso, mas o desenvolvimento de variedades comercialmente aceitáveis iria requerer ciclos adicionais de melhoramento (Hartman & St. Clair, 1998).

Os métodos do *pedigree*, *bulk* e do retrocruzamento também são usados freqüentemente com certas modificações, feitas de acordo com a conveniência do melhorista (Singh, 1986). Modificações dos métodos *pedigree* e *bulk* têm sido usadas no melhoramento para resistência a insetos em amendoim (Smith, 1979) e outras culturas (Dent, 1991).

Método *single seed descent* – Quando o caráter resistência é poligênico, a seleção em gerações precoces é complexa devido principalmente às diferenças na maturidade e à dificuldade de mensuração da pequena expressão do caráter resistência. Para superar essas barreiras, os materiais são avançados até as gerações F_6 ou F_7 sem seleção artificial. Para assegurar que a seleção natural não eliminará alguns genótipos, sementes individuais de cada planta F_2 são colhidas e misturadas para originar a população F_3. O processo é repetido até que as plantas atinjam a homozigose desejada (Knott & Kumar; citados por Panda & Khush, 1995). Nesse estágio, são realizadas seleções de plantas que dão origem às progênies individuais. Essas são, então, avaliadas para resistência à praga em questão e as melhores são selecionadas.

Método da mutação – Este método é utilizado quando os genes de resistência não se encontram disponíveis nos tipos cultivados e o germoplasma selvagem apresenta barreiras que dificultam o cruzamento ou a obtenção de híbridos viáveis. Freqüentemente, as variedades cultivadas apresentam alta produtividade e são amplamente adaptadas, mas são suscetíveis a um inseto em particular ou a um biótipo. Assim, o melhorista tem interesse em alterar os alelos suscetíveis para resistentes sem causar mudanças em outros caracteres. Sob essas circunstâncias, o melhoramento para resistência por mutação é uma escolha conveniente. No entanto, a probabilidade de se obter mutantes resistentes e com boas características agronômicas é extremamente baixa. A obtenção de variedades resistentes através de indução de mutação tem sido feita com sucesso em arroz (Singh, 1986).

Outras estratégias de melhoramento – Quando se pretende fazer a manipulação do conjunto gênico envolvendo uma grande população de hospedeiros com alta taxa de polinização cruzada casual, há necessidade de um método de policruzamentos em larga escala. Como isto exigiria cruzamentos múltiplos, em autógamas, há algumas alternativas como, por exemplo: a) em espécies onde um só fruto produz várias sementes (tomate, batata, fumo), é viável a emasculação manual e a polinização com pólen misturado de plantas selecionadas; b) em cereais, pode-se usar macho-esterilidade; c) em leguminosas, podem ser usados os usuais 1% a 5% de fecundação cruzada, observando-se os cruzamentos com genes marcadores apropriados.

O uso da seleção recorrente já está sendo implantado em plantas autógamas, como arroz e soja, para o melhoramento de caracteres quantitativos, como a produtividade de grãos. Representa um método potencial para incorporação de resistência a pragas com controle genético poligênico. A necessidade de vários cruzamentos cíclicos foi um empecilho no passado para o seu uso, sendo um fato já superado, uma vez que foram desenvolvidos novos esquemas de cruzamentos adaptados a plantas autógamas.

Outra possibilidade é a de combinar a resistência vertical de vários parentais num material comum. Em trigo, por exemplo, a repetição do mesmo parental recorrente em um composto aumenta a adaptação imediata do composto mas reduz a porcentagem de resistência teórica dada pelos outros pais (Pinto, 1995).

No caso de culturas arbóreas, tais como o citros, o melhoramento para resistência a insetos é menos simples do que para culturas anuais, devido, principalmente, ao longo tempo de uma geração (geralmente, de quatro a sete anos da fase de plântula à frutificação). Conseqüentemente, é necessário um longo tempo (cerca de 20 anos) para seleção e incorporação da resistência e a produção de uma variedade resistente a insetos. As etapas básicas a serem seguidas no melhoramento para resistência em culturas frutíferas, de acordo com Lamb & Aldwinckle (1979), são: a) identificação de indivíduos com resistência múltipla; b) desenvolvimento de uma técnica para avaliar plântulas e árvores adultas; c) realização de cruzamentos entre indivíduos resistentes e aqueles com características horticulturais disponíveis; d) plantio e teste para resistência de sementes desses cruzamentos, selecionando-se os indivíduos com boas características horticulturais que deverão ser usados como parentais para futuro melhoramento e multiplicação vegetativa.

6.2 MÉTODOS DE MELHORAMENTO PARA PLANTAS ALÓGAMAS

Em relação às plantas alógamas, a maioria das espécies possui inflorescências manipuláveis, sendo possível direcionar os cruzamentos, ou mesmo desviar a alogamia para a autogamia, por autofecundação (Borém, 1999). Tal procedimento permite o surgimento de linhagens endogâmicas dentro do programa, o que proporciona um maior controle genético por parte do melhorista, sendo a expressão do caráter em estudo melhor interpretada. O único inconveniente são os efeitos negativos da endogamia, que expõe genes deletérios nas progênies. Porém, o vigor é restaurado quando os materiais retornam à condição híbrida, devido ao fenômeno da heterose.

Pela prática da autofecundação em plantas alógamas, alguns métodos de melhoramento de plantas autógamas podem ser adaptados e utilizados sem nenhum problema, porém a maioria dos programas de melhoramento para resistência de plantas a insetos utiliza o método da seleção recorrente e suas variantes.

O método de seleção recorrente é o mais eficiente para acumular genes quantitativos de resistência a um inseto a partir de diferentes variedades. Este método promove a recombinação e aumenta a freqüência de alelos favoráveis de caracteres quantitativos. A seleção recorrente é cíclica e cada ciclo compreende duas fases: seleção de um grupo de genótipos com poligenes para resistência e cruzamento entre os genótipos selecionados para se obter recombinação. Vários parentais (entre 50 e 100) com um desempenho acima da média para resistência são cruzados, produzindo uma população heterozigótica. Os indivíduos dessa população são expostos à praga (em infestação natural ou artificial) e as plantas suscetíveis são descartadas. Os materiais resistentes são recombinados e as progênies extraídas. Estas são novamente expostas à praga e as progênies resistentes são selecionadas e recombinadas. Este ciclo de seleção e recombinação é repetido por quatro a cinco vezes, acumulando poligenes para resistência de vários materiais em uma única população. Geralmente, não se seleciona somente para resistência, embora este seja o principal caráter. Outros caracteres como produção e vigor sempre fazem parte do programa.

Porém, a população obtida, embora possua boas características agronômicas e resistência, ainda não está pronta para ser cultivada, pois o objetivo final de um programa de melhoramento de plantas alógamas é um híbrido uniforme e estável. Portanto, os produtos finais da seleção recorrente são transferidos para outro programa, no qual o objetivo é obter linhagens endogâmicas para obtenção de híbridos. As plantas das populações obtidas na seleção recorrente são então autofecundadas, obtendo-se progênies S_1 (100 a 200), as quais são plantadas e expostas à praga. Os materiais resistentes e superiores são autofecundados, obtendo-se as progênies S_2. Este procedimento se repete, sempre expondo as progênies à praga em estudo e selecionando materiais resistentes com boas características agronômicas. Quando as progênies atingem o estágio S_6, os materiais selecionados estão prontos para serem cruzados com outras linhagens de outra população, testada previamente para capacidade de combinação.

A seleção recorrente geralmente é praticada em instituições públicas, por envolver um grande número de genótipos e técnicas específicas. A obtenção de linhagens endogâmicas e híbridos geralmente é realizada em instituições privadas.

Williams & Davis (1987) relataram que nos seus trabalhos de melhoramento visando resistência às lagartas *Diatraea grandiosella* e *S. frugiperda*, na cultura do milho, no Departamento de Agricultura no Mississipi (EUA), o objetivo sempre foi produzir populações e/ou linhagens que pudessem ser utilizadas como fontes de resistência por melhoristas de outros programas. Widstrom *et al.* (1992) desenvolveram uma população de milho com um excelente nível de resistência a *S. frugiperda*, acumulando poligenes de 50 populações através da seleção recorrente. Nishikawa (1999) analisou três populações de milho previamente melhoradas para resistência a *S. frugiperda*, através de suas linhagens S_2, encontrando linhagens endogâmicas com boas características agronômicas e altos níveis de resistência.

7. RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A INSETOS

Como já foi mencionado, o conceito de praga-chave não é fixo a uma única espécie de inseto, podendo variar entre regiões e anos agrícolas. De um ano para outro, uma praga secundária ou ocasional pode causar sérios danos na cultura, transformando a variedade resistente em suscetível à nova praga. Para minimizar essas perdas, são necessárias variedades com resistência múltipla às principais pragas da cultura.

Em autógamas, o método das multilinhas parece ser eficiente no controle de múltiplas pragas. Consiste de populações formadas por uma mistura de isolinhas, diferindo apenas em um ou poucos genes que controlam um caráter, no caso a resistência. Genes de resistência às diferentes pragas ou diferentes biótipos de uma praga podem ser transferidos para uma variedade elite em programas independentes de retrocruzamentos. Cada programa origina uma isolinha da variedade elite com um determinado gene de resistência. As isolinhas são multiplicadas separadamente e depois misturadas nas proporções desejadas para formar uma multilinha.

Basicamente, a resistência múltipla em autógamas pode ser resumida em uma mistura de genótipos com características agronômicas semelhantes, porém resistentes a diferentes pragas. Em arroz, Khush (1992) desenvolveu germoplasma com múltipla resistência às principais pragas da cultura nas Filipinas.

Em alógamas, não há um método específico e a obtenção de variedades com múltipla resistência é baseada na seleção e recombinação de linhagens endogâmicas resistentes a diferentes pragas. A população MIRT (*Multiple Insect Resistance*) de milho com resistência às principais pragas dessa cultura foi formada pelos pesquisadores do CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento del Maiz y Trigo*) no México, a partir da recombinação de 40 famílias que foram as mais resistentes às cinco espécies de inseto avaliadas – *Busseola fusca*, *D. grandiosella*, *D. saccharalis*, *O. nubilalis* e *S. frugiperda* (Mihm *et al.*, 1994). As progênies dessas variedades com múltipla resistência podem ser avançadas até S_6, sempre testando a resistência em cada geração de autofecundação, para compor híbridos.

8. SELEÇÃO BASEADA EM MARCADORES PARA RESISTÊNCIA A INSETOS

Alguns genes de resistência a inseto se apresentam fortemente ligados a um caráter morfológico da planta que não interfere na expressão da resistência, de tal forma que ambos segregam juntos. As plantas selecionadas para esse caráter morfológico são resistentes ao inseto. Porém, segundo Panda & Khush (1995), estes marcadores morfológicos são raros, possuem efeitos deletérios no desempenho da planta e são, em sua maioria, dominantes. Como exemplo, pode ser citado a coloração do estilo-estigma do milho. Os estilo-estigmas claros (amarelos, esverdeados) conferem maior resistência à oviposição de *H. zea* do que os escuros (vermelhos, róseos ou marrons). A coloração mais clara dessa estrutura implica em um pH maior (Ferreira, 1974; Byrne *et al.*, 1989). Nessa situação, o caráter resistência é o pH do estilo-estigma, o qual pode ser selecionado pela cor nas populações de milho.

Os marcadores moleculares, tais como isoenzimas e RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), também podem ser utilizados para discriminar genes de importância para resistência a insetos. Se os genes para resistência a insetos puderem ser detectados por uma forte ligação com o marcador molecular, a eficiência da seleção será maior, reduzindo o tempo para transferência desses genes de um material a outro. Desta forma, a presença ou ausência do marcador molecular associado indicaria em uma geração precoce, a presença ou ausência do gene desejado. A eficiência dessa técnica de seleção foi demonstrada em tomateiro. O gene *Mi* para resistência a *Meloydogyne* spp. está fortemente ligado a um alelo raro, *Aps-1*, no cromossomo 6 (Rick & Fobes, 1974). Esse marcador é determinado por isoenzimas (ácido fosfatase). Muitos programas de melhoramento de tomateiro selecionam as progênies resistentes pela presença do alelo *Aps-1*, ao invés de testes para avaliação de resistência ao nematóide.

Quando a resistência a insetos é condicionada por genes quantitativos, é possível verificar ligações entre marcadores moleculares e os poligenes (QTL-*Quantitative Traits Loci*) do caráter resistência ao inseto em questão. Tal procedimento aumenta a eficiência da seleção na incorporação de resistência poligênica a insetos. Nienhuis *et al.* (1987) encontraram QTL para resistência a inseto através de marcadores RFLP em acessos do tomateiro selvagem *Lycopersicon hirsutum*.

9. ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA À RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

A transferência de genes exógenos para as plantas cultivadas pode ser considerado um dos avanços mais significativos dentro das ciências biológicas nos últimos anos (Panda & Khush, 1995). Até há pouco tempo, os pesquisadores só conseguiam utilizar os conjuntos gênicos primário e secundário de espécies cultivadas no melhoramento genético. Porém, os recentes avanços nas técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular tornaram possíveis a introdução, nas plantas cultivadas, de genes provenientes de diversas fontes tais como bactérias, vírus, animais, e plantas de espécies diferentes. A expressão desses genes exógenos nas plantas transformadas ou transgênicas é tal que pode aumentar funções já existentes ou criar novas características. Estas novas técnicas podem ser utilizadas para criar cultivos transgênicos com novos genes para resistência a insetos. No melhoramento genético clássico, grande parte do genoma é transferido por hibridização. As técnicas de engenharia genética permitem que genes simples (isolados) sejam introduzidos nas variedades.

Desde o primeiro relato de plantas transgênicas de tabaco para expressão de proteínas (Herrera-Estrella *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1985), muitas outras foram produzidas em dezenas de espécies vegetais (Uchimiya *et al.*, 1989; Hiatt, 1993).

Os genes para resistência a insetos mais conhecidos e estudados até o momento são aqueles que expressam as proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt); os inibidores de proteinase , os inibidores de alfa-amilase e as lectinas (Hilder & Boulter, 1999).

Segundo Panda & Khush (1995), *B. thuringiensis* produz várias proteínas inseticidas, porém as mais eficientes são as proteínas cristais. O cristal é o responsável pela ação inseticida da bactéria e é composto por uma ou mais proteínas (proteínas Bt), que inativam as células do intestino. As proteínas cristais são dissolvidas no suco gástrico no lúmen do intestino e pela ação das proteases intestinais do inseto, são transformadas em partículas tóxicas. As células do epitélio do intestino, em contato com essas partículas incham e eventualmente estouram, causando a morte do inseto. Os genes que codificam para as proteínas cristais têm sido isolados e introduzidos nas plantas cultivadas através de técnicas de transformação de plantas. Na cultura do milho, os genes Bt são introduzidos no genoma da planta utilizando-se as técnicas de biobalística e protoplastos (Sagers *et al.*, 1997). No método da biobalística, partículas microscópicas de tungstênio recobertas com o DNA exógeno (Bt) são propelidas através das paredes celulares para o citoplasma e núcleo das células a serem transformadas. Pelo método de protoplastos, as paredes celulares são removidas, deixando a membrana celular permeável ao DNA exógeno. O movimento do DNA exógeno através da membrana celular pode ser facilitado tanto pela aplicação de correntes elétricas (eletroporação) como pela adição de PEG (polietilenoglicol). O DNA exógeno em solução ao redor da célula ultrapassa a membrana e é incorporado ao núcleo da célula. Segundo Sagers *et al.* (1997), em ambos os métodos, aproximadamente 120 a 210 dias após a transformação, são colhidas as primeiras sementes da planta de milho transformada. Avaliando os materiais transformados para resistência, foi constatado que os mesmos mataram rapidamente as lagartas de *O. nubilalis* infestadas artificialmente na planta. Estruch *et al.* (1997) analisaram a

expressão do gene *Cry*IA(b) de *B. thuringiensis* introduzidos por biobalística em embriões imaturos de linhagens elite de milho, constatando que as plantas transformadas não foram danificadas por *O. nubilalis*, mesmo em simulações severas de ataque. Perlak *et al.* (1990) introduziram os genes *Cry*A(b) e *Cry*A(c) em plantas de algodão e constataram que as plantas transformadas apresentaram um alto nível de resistência às larvas de *H. zea*. O gene Bt foi transferido para as progênies e o caráter resistência segregou como um gene simples, dominante. Esse tipo de ação gênica dominante também foi observado por Estruch *et al.* (1997) em milho. Isso facilitaria a introdução do caráter resistência a partir de linhagens homozigóticas para esse caráter.

As técnicas da engenharia molecular permitiram determinar a seqüência de nucleotídeos do gene Bt. Tal conhecimento torna possível a síntese do mesmo em laboratório. Koziel *et al.* (1993) introduziram um gene *Bt* sintético em plantas de milho, as quais apresentaram alto nível de resistência a *O. nubilalis*.

Já foram identificadas mais de uma dezena de proteínas cristais – *Cry*A(a) até *Cry*IVD – as quais são efetivas contra o ataque de diferentes espécies de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Não foi relatado nenhum gene Bt efetivo contra insetos em homópteros (Panda & Khush, 1995), também considerado um grupo de grande importância agrícola.

Os inibidores de protease, um outro fator de resistência a insetos manipulado através de engenharia genética, são polipeptídeos que participam do sistema de defesa natural das plantas contra a ação de insetos, interferindo no processo digestivo. Os inibidores de protease da planta combinam-se com as enzimas digestivas do inseto de modo estequiométrico, que consiste na inativação de uma molécula de protease do inseto por uma molécula do inibidor. O complexo formado é análogo ao modelo enzima-substrato em estrutura, com a diferença de ser um complexo estável, não se dissociando, porque a ligação do inibidor é muito forte. Os inibidores ocorrem naturalmente nos tecidos de reserva de uma grande variedade de plantas tais como fumo, batata, tomate, soja etc. (Johnson *et al.*, 1989) e os genes responsáveis por este caráter podem conferir resistência a insetos.

O primeiro caso de sucesso no uso de um inibidor de protease para controle de pragas refere-se ao inibidor de tripsina (CpTi), isolado de plantas de caupi e transferidos para plantas de tabaco (Hilder *et al.*, 1987). Este inibidor proporciona proteção contra vários insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Orthoptera e Coleoptera (Gatehouse *et al.*, 1992), alterando o desenvolvimento e reduzindo a sobrevivência dos mesmos (Panda & Khush, 1995). Johnson *et al.* (1989) avaliaram a expressão dos inibidores dos tipos I e II do tomate e inibidores do tipo II de batata em plantas transgênicas de tabaco. Os inibidores do tipo II, potentes inibidores de tripsina e quimiotripsina, reduziram drasticamente o desenvolvimento larval de *Manduca sexta*. Inibidores de protease do tipo cisteína (orizacistatina) foram isolados de sementes de arroz e fornecidos em dieta artificial para os besouros *S. oryzae* e *Tribolium castaneum*. Em ambas as pragas, houve forte inibição das proteases no intestino dos insetos (Panda & Khush, 1995). Outros inibidores de protease de outras espécies de plantas como o inibidor de tripsina do feijão-mungo e o inibidor dos tipos I e II da batata, estão sendo pesquisados para serem empregados contra as enzimas digestivas das pragas do arroz (Chi, 1990). Mais recentemente, têm sido

estudados intensamente os inibidores de tripsina da soja, os quais anulam a atividade tríptica de proteases intestinais de *S. frugiperda*.

Os inibidores de alfa-amilase também atuam no metabolismo de digestão de alguns insetos, inibindo, nesse caso, a digestão de carboidratos. Os inibidores de alfa-amilase mais estudados são os provenientes do feijoeiro comum e do trigo (Hilder & Boulter, 1999). Os inibidores do feijoeiro quando expressados em sementes de ervilha aumentaram a resistência desse material a *Callosobruchus maculatus* e *C. chinensis*, duas importantes pragas de grãos dessa cultura (Shade *et al.*, 1994). Experimentos preliminares com os inibidores provenientes do trigo, com expressão em tabaco transgênico aumentaram a mortalidade de lagartas de 30% a 40% (Hilder & Boulter, 1999).

As lectinas constituem um heterogêneo grupo de proteínas presentes em sementes de diversas espécies vegetais e que se ligam a açúcares, desempenhando importante ação de proteção contra ataque de insetos. A primeira demonstração do uso dessas proteínas para resistência a insetos ocorreu com uma lectina oriunda da ervilha (P-lec) e introduzida em plantas de tabaco, as quais se tornaram resistentes a *Heliothis virescens* (Boulter *et al.*, 1990). A maior atividade inseticida desses tipos de proteínas é encontrada nas lectinas do feijoeiro comum e do germe de trigo que se ligam à quitina (Hilder & Boulter, 1999).

Mais recentemente, outros genes alternativos vêm sendo estudados podendo-se citar, como exemplos, aqueles que expressam outros grupos de proteínas tóxicas ou enzimas provenientes de microrganismos e peptídeos isolados de aranhas e escorpiões, que também podem ser utilizados como fator de resistência à pragas (Hilder & Boulter, 1999).

10. EXPERIMENTAÇÃO EM RESISTÊNCIA DE PLANTAS EM CAMPO

No item em que foram abordados os parâmetros e técnicas para avaliação da resistência varietal a inseto foram discutidos os tipos de experimentos utilizados em condições de laboratório e casa de vegetação. Quando os experimentos visando à obtenção de resistência varietal são realizados em condições de campo, entretanto, outros aspectos também devem ser considerados, envolvendo principalmente o delineamento experimental e a disponibilidade de insetos em densidade adequada.

Muitos fatores influenciam a escolha do delineamento experimental mais apropriado para utilização em ensaios de seleção e melhoramento para resistência a insetos. Entre os principais, podem ser citados: a) quantidade de germoplasma a ser selecionado; b) quantidade de sementes disponíveis; c) número de insetos disponíveis para infestação artificial; d) tamanho da área experimental; e) tipo de germoplasma a ser selecionado (grau de melhoramento); f) eficiência do manejo no método de seleção (mão-de-obra e infra-estrutura disponível); g) método de melhoramento a ser utilizado; h) precisão experimental a ser utilizada. Na escolha do delineamento, devem ser considerados esses fatores, levando-se em conta ainda o objetivo final e o que é prático e possível.

Em viveiros de seleção, por exemplo, geralmente o número de materiais é elevado e o número de repetições, quando são utilizadas, é pequeno. O objetivo nesse caso, é identificar fontes potenciais de resistência.

TABELA 7. Plantas transgênicas com genes exógenos para resistência a insetos.

Cultura	Gene[1]	Inseto	Referência
Algodão	Bt	*Helicoverpa zea, Trichoplusia ni* e *Spodoptera exigua*	Perlak *et al.* (1990)
Arroz	Bt	*Chilo suppressalis* e *Cnaphalocrosis medinalis*	Fujimoto *et al.* (1993)
Batata	Bt	*Phthorimaea operculella*	Peferoen *et al.* (1990)
	P-lec	*Macrosiphum euphorbiae*	Gatehouse *et al.* (1995)
Batata-doce	CpTi	*Euscepes postfasciatus*	Golmirizaie *et al.*, (1997)
Ervilha	αA1-Pv	*Callosobruchus maculatus* e *C. chinensis*	Shade *et al.* (1994)
Milho	Bt	*Ostrinia nubilalis*	Koziel *et al.* (1993)
Tabaco	Bt	*Manduca sexta*	Vaeck *et al.* (1987); Barton *et al.* (1987); Warren *et al.* (1992)
	CpTi	*Heliothis virescens*	Hilder *et al.* (1987); Barfoot & Connett (1989)
		M. sexta	Gatehouse *et al.* (1992)
	αA1-Pv	*Tenebrio molitor*	Altabella & Chrispeels (1990)
	P-lec	*H. virescens*	Boulter *et al.* (1990)
Tomate	Bt	*M. Sexta H. zea* e *Keiferia lycopersicella*	Fischhoff *et al.* (1987); Delannay *et al.*(1989) Delannay *et al.* (1989)

[1] Bt = *Bacillus thuringiensis*; αA1-Pv = Inibidor de alfa-amilase (feijão); CpTi = Inibidor de tripsina (caupi); P-lec = lectina (ervilha)

Normalmente, a maioria do germoplasma é exótico ao local do experimento e portanto, pouco se sabe sobre sua adaptação geral. Por esta razão, os lotes iniciais de seleção são plantados sem repetições, para uma simples observação do potencial de resistência e para adquirir informações dos caracteres agronômicos e adaptação. Após essa avaliação inicial, testemunhas resistentes e suscetíveis de adaptação apropriada são incluídas nos lotes de seleção, plantadas em intervalos regulares para comparação. Todo acesso promissor é então reavaliado em experimentos comparativos com muitas repetições e os materiais selecionados podem ser incluídos no programa de melhoramento para resistência. Nesses experimentos iniciais, os materiais são geralmente plantados em esquemas duplicados sem casualização. Como o número de acessos é grande, a casualização torna o processo de seleção muito complexo e contribui para erros (Mihm, 1987). As parcelas duplicadas aumentam a precisão da coleta de dados e permitem a multiplicação dos materiais selecionados.

Um fator importante na seleção inicial de materiais é o conhecimento de seu grau de melhoramento (*breeding status*) e sua inerente variabilidade. Acessos de polinização livre ou de população *bulk* de bancos de germoplasma são geralmente muito heterogêneos e requerem muito mais plantas e repetições infestadas artificialmente do que acessos de linhagens homozigóticas.

Uma vez que os materiais são experimentalmente identificados como portadores de resistência, estes são plantados em experimentos de verificação com repetições adequadas, utilizando delineamentos apropriados com casualização. Nesses experimentos também são avaliados caracteres agronômicos, portanto o delineamento

experimental para estudos de resistência é o mesmo recomendado para experimentos padrões de produção. Os materiais superiores são então promovidos a fontes de resistência e podem ser utilizados no desenvolvimento de variedades, sintéticos ou híbridos resistentes. A parcela experimental deve ser constituída de quatro a oito linhas/parcela (incluindo bordaduras apropriadas), permitindo avaliar o desempenho do material sob infestação artificial (uma linha), sob proteção de defensivos químicos ou sob infestação natural, ou ainda na ausência de ataque (uma linha). Tal procedimento permite coletar dados da produção *per se*, sob o ataque pesado da praga e na ausência da mesma.

Nem todos que trabalham com resistência de plantas concordam com o uso de inseticidas nos lotes de seleção. Contudo, em alguns ensaios são utilizadas sementes tratadas, ou são realizadas aplicações criteriosas de inseticidas para proteger as plantas de uma miscelânea de pragas da fase inicial da cultura, as quais não fazem parte do estudo. Tal procedimento ajuda a prevenir também o ataque de insetos vetores de doenças. Predadores e parasitóides também são indesejáveis em experimentos de resistência por reduzir a população da praga de interesse.

A criação massal de insetos em laboratório é apontada por muitos autores como um fator básico para o planejamento e desenvolvimento de um programa de melhoramento visando resistência de plantas a insetos. Antes que técnicas eficientes para a criação artificial de pragas em larga escala fossem desenvolvidas, melhoristas e entomologistas ficavam restritos à infestação natural nos trabalhos de seleção. Segundo Mihm (1987), em relação aos lepidópteros que atacam o milho, a utilização de infestações naturais em ensaios de avaliação ou seleção, resulta em nenhum ganho, sucesso esporádico ou ganhos demorados insuficientes. As principais razões para isso são o fato de as populações naturais dos insetos estarem mais sujeitas às condições ambientais incontroláveis, o que as torna geralmente imprevisíveis e desuniformes em relação ao tempo, nível ou distribuição da infestação e porque o campo de milho é um ecossistema complexo, onde ocorrem outras pragas, além daquela de interesse, dificultando o esquema de avaliação e seleção para a resistência.

Estes problemas foram, em parte, superados pelo desenvolvimento de técnicas de criação massal de pragas em dietas artificiais, em um número consistente e adequado aos objetivos do melhoramento.

De acordo com Mihm (1987), para se obter germoplasma resistente a insetos, em condições de campo, são necessárias infestações uniformes, adequadas e significativas da praga nos testes de seleção. Portanto, além da criação artificial, há necessidade de se dispor de uma técnica adequada de transporte dos insetos do local de produção até as plantas, simulando um ataque natural.

Em experimentos de milho, as infestações artificiais de alguns lepidópteros inicialmente eram realizadas depositando massas de ovos dentro dos cartuchos ou nas folhas das plantas. Para a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, as infestações artificiais eram realizadas pela aplicação manual de larvas nas plantas através de um pincel (Mihm, 1987). Wiseman *et al.* (1974) desenvolveram um método mais eficiente para infestação artificial utilizando massas de ovos em suspensão numa solução de ágar, a 0,2%, que era aplicada às plantas em quantidades controladas através de seringas hipodérmicas ou frascos graduados. Contudo, apesar de eficientes, a lentidão

e a falta de praticidade destas técnicas limitavam os programas de melhoramento em larga escala. Mihm citado por Wiseman *et al.* (1980) desenvolveu um aplicador de lagartas denominado "bazuca" que viabilizou a realização de experimentos de seleção para resistência em milho em larga escala. Segundo o autor, o emprego da bazuca nas infestações artificiais é mais eficiente porque elimina muitas práticas laboriosas, é mais rápida, utiliza poucos insetos por planta e é mais efetiva do que outras técnicas por minimizar o escape nos campos de seleção (Mihm, 1987). Atualmente, a bazuca já é utilizada para infestação de mais de uma dezena de espécies de lepidópteros em experimentos com milho.

11. ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA

Conforme mencionado anteriormente os fatores de resistência da planta provocam uma pressão de seleção sobre os insetos, os quais, através de recombinação gênica ou mutação, tendem a se tornar aptos a neutralizar tais fatores, o que leva à quebra da resistência varietal com o surgimento de novos biótipos do inseto para os quais a planta resistente torna-se suscetível. A probabilidade da quebra da resistência é tanto maior quanto maior o grau de resistência já que o incremento deste aumenta a pressão de seleção sobre a população do inseto.

Algumas estratégias têm sido estabelecidas com o objetivo de tentar evitar a quebra da resistência. Durante a seleção da variedade resistente, a estratégia mais eficiente é tentar introduzir mais de um fator de resistência, se possível de natureza diversa (por exemplo, um fator químico e um morfológico), que condicionem, preferencialmente, mais de um tipo de resistência, o que aumentará a barreira a ser ultrapassada pelo inseto. A seleção de variedades resistentes com menor grau de pureza também dificultará o aparecimento de novos biótipos.

As estratégias que podem ser utilizadas durante o cultivo incluem: a) mistura de variedades com diferentes mecanismos de resistência; b) rotação de variedades resistentes em anos sucessivos; c) manutenção de uma parte da área cultivada com uma variedade suscetível (área de refúgio). Estas táticas reduzem a pressão de seleção sobre a população do inseto, reduzindo, conseqüentemente, a probabilidade de surgimento de novos biótipos.

Uma outra estratégia que pode ser recomendada é o emprego de variedades moderadamente resistentes associadas a outros métodos de controle, dentro de um sistema de manejo integrado de pragas. Assim, variedades com níveis moderados de resistência podem ser utilizadas com eficiência no controle de pragas quando incorporadas ao sistema de manejo envolvendo outras medidas como antecipação da época de plantio e colheita, manipulação de hospedeiros alternativos (plantas-iscas, por exemplo), emprego de armadilhas com substâncias atrativas, utilização de inseticidas seletivos, em subdosagens e/ou em aplicações mais espaçadas, liberação de parasitóides e predadores, destruição de insetos em restos de cultura etc. Além de contribuir decisivamente para a maior estabilidade da resistência varietal, um sistema desse tipo tem a vantagem de não eliminar totalmente a população da praga, o que permite a preservação dos seus inimigos naturais, contribuindo para a manutenção permanente da população da praga abaixo do nível de dano econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R.A. Morphological characteristics of sugarcane and insect resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.12, p.767-776, 1969.

AHMED,K.; KHALIQUE, F.; KHAN, I.A.; MALIK, B.A. Genetic differences for susceptibility of chickpea to bruchid beetle (*Callosobruchus chinensis* L.) attack. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v.36, p.96-98, 1993.

ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1960. 381p.

ALTABELLA, T.; CHRISPEELS, M.J. Tobacco plants transformed with the bean αai gene express an inhibitor of insect α-amylase in their seeds. **Plant Physiology**, v.93, p.805-810, 1990.

AZHAR, I.; LONG, G.E. Effect of cocoa and pod age on egg distribution and egg parasitism of the cocoa pod borer in Malaysia. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.81, p.81-89, 1996.

BARFOOT, P.D.; CONNETT, R.J.A. AGC's cowpea enzyme inhibitor gene: potential market opportunity. **AgBiotech news information**, v.1, p.177-182, 1989.

BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p.1103-1109, 1987.

BATISTA, M.F.; FONSECA, J.N.L.; TENENTE, R.C.V.; MENDES, M.A.S.; URBEN, A.F.; OLIVEIRA, M.R.V.; FERREIRA, D.N. Intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, p.32-39, 1998.

BLUM, A. Anatomical phenomena in seedlings of sorghum varieties resistant to the sorghum shoot fly (*Atherigona varia soccata*). **Crop Science**, v.8, p.388-391, 1968.

BORÉM, A. **Hibridização artificial em plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 546p.

BOULTER, D.; EDWARDS, G.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; HILDER, V.A. Additive protective effects of different plant-derived insect resistant genes in transgenic tobacco plants. **Crop Protection**, v.9, p.475-493, 1990.

BRIGGS, F.N.; ALLARD, R.W. The current status of the backcross method of plant breeding. **Agronomy journal**, v.45, p.131-138, 1953.

BYRNE, P.F.; COE, E.H.; DARRAH, L.L.; SIMPSOM, K.B. Silk pH, nonbrowing silks, and resistance to corn earworm. **Maize cooperation news letter**, v.63, p.94-95, 1989.

CARTWRIGHT, W.B.; CALDWELL, R.M.; COMPTON, L.E. Relation of temperature to the expression of resistance in wheats to Hessian fly. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.38, p.259-263, 1946.

CARVALHO, R.P.L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1970. 170p. Tese, Doutorado.

CHANG, N.T; WISEMAN, B.R.; LYNCH, R.E.; HABECK, D.H. The influence of N fertilization on the resistance of selected grasses to fall armyworm larvae. **Journal of Agricultural Entomology**, v.2, p.137-146, 1985.

CHI, C.W. Three different kinds of proteinase inhibitors as candidates for insecticidal proteins. In: CHI, C.W. (Ed.) **Molecular and genetic approaches to plant stress**. New Delhi: International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1990. 362p.

CIPOLLINI JR., D.F. Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. **Oecologia**, v.111, p.84-90, 1997.

CORCUERA, L.J. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. **Phytochemistry**, v.33, p.741-747, 1993.

COSENZA, G.W. **Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta* (Stal, 1854)**. Planaltina: Embrapa, CPAC, 1981. 16p. (Boletim de Pesquisa, 7).

COUDRIET, D.L.; KISHABA, J.D.; McCREIGHT, J.D.; BOHN, G.W. Varietal resistance in onions to thrips. **Journal of Economic Entomology**, v.72, p.614-615, 1979.

CRUZ, I.; VALICENTE, F.H.; SANTOS, J.P., WAQUIL, J.M., VIANA, P.A. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1997. 67p.

DANIELS, N.E.; WILSON, G.C.; CLARKE, C.S. Nitrogen and phosphorus content of greenbugs reared on fertilized wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1746-1747, 1968.

DELANNAY, X.; LAVALLEE, B.J.; PROKSCH, R.K.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; MARRONE, P.G.; DODSON, R.B.; AUGUSTINE, J.J.; LAYTON, J.G.; FISCHHOFF, D.A. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. **Biotechnology**, v.7, p.1265-1269, 1989.

DENT, D. **Insect pest management**. Wallingford: CAB. International, 1991. 448p.

DePAUW, R.M.; McLEOD, J.G.; CLARKE, J.M.; McCAIG, T.N.; FERNANDEZ, M.R.; KNOX, R.E. AC Eatonia hard red spring wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, v.74, p.821-823, 1994.

DIEHL, S.R.; BUSH, G.L. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. **Annual Review of Entomolgy**, v.29, p.471-504, 1984.

DJAMIN, A.; PATHAK, M.D. The role of silica in resistance to Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* (Walker) in rice varieties. **Journal of Economic Entomology**, v.60, p.347-351, 1967.

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; WARREN, G.W.; DUCK, N.B.; KOZIEL, M.G. The expression of a synthetic *Cry*IA(b) gene in transgenic maize confers resistance to European corn borer. In: MIHN, J.A. (Ed.) **Insect resistance maize:** recent advances and utilization; proceedings. México: CIMMYT, 1997. 302p.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa.** Viçosa: UFV Imprensa universitária, 1987. 279p.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development.** 2ed. New York: Macmillan, 1987. 536p.

FERREIRA, E. Características do milho associadas com resistência à lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea* Boddie). Piracicaba: ESALQ/USP, 1974. 124p. Dissertação, Mestrado.

FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; McCORMIC, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transge-nic tomato plants. **Biotechnology**, v.5, p.807-813, 1987.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v.32, p.653-659, 1942.

FREY, K.J. Breeding concepts and techniques for self-pollinated crops. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON GRAIN LEGUMES, Pradesh, 1975. **Proceedings.** Pradesh: International Crop Research Institute for Semi-Arid Tropics, 1975. p.278.

FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, p.1151-1155, 1993.

GALLUN, R.L. Genetic basis of Hessian fly epidemics. In: DAY, P.R. (Ed.) **The genetic basis of epidemic in agriculture.** New York: Academy of Sciences, 1977. 465p. (Annals of the New York Academy of Sciences, v.287)

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: GATEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A.; BOULTER, D. **Plant genetic manipulation for crop protection.** Wallingford: Solydus, 1992. 238p.

GATEHOUSE, A.M.R.; POWELL, K.S.; VAN DAMME, E.; PEUMANNS, W.; GATEHOUSE, J.A. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: PUSZTAI, A.J. (Ed.) **Lectins-Biomedical perspectives.** London: Taylor and Francis, 1995. 198p.

GOLMIRIZAE, A.; ZHANG, D.P.; NOPO, L.; NEWELL, C.A.; VERA, A.; CISNEROS, F. Enhanced resistance to West Indian sweetpotato weevil (*Euscepes postfasciatus*) in transgenic 'Jewel' sweetpotato with cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. **Hortscience**, v.32, p.435, 1997.

HACKEROTT, H.L.; HARVEY, T.L. Effect of temperature on spotted alfalfa aphid reaction to resistance in alfalfa aphid reaction to resistance in alfalfa. **Journal of Economic Entomology**, v.52, p.949-953, 1959.

HARTMAN, J. B.; St. CLAIR, D. A. Variation for insect resistance and horticultural traits in tomato inbred backcross populations derived from *Lycopersicon pennellii*. **Crop Science**, v.38, p.1501-1508, 1998.

HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN DEN BROECK, G.; MAENHAUT, R.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; TIMKO, M.; CASHMORE A. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. **Nature**, v.310, p.115-120, 1984.

HIATT, A. **Transgenic plants:** fundamentals and applications. New York: Marcel Dekker, 1993. 423p.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BAKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.160-163, 1987.

HILDER, V.A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. **Crop Protection**, v.18, p.177-191, 1999.

HOLMES, N.D.; LARSON, R.I.; PETERSON, L.K.; MacDONALD, M.D. Influence of periodic shading on the length and solidness of the internodes of Rescue wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, v.40, p.183-187, 1960.

HOOKER, A.L. Breeding to control pests. In: WOOD, D.R. (Ed.) **Crop breeding**. Madison: American Society of Agronomy, 1983. 230p.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMAN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transfering genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-1231, 1985.

HOWARD, F.W.; GIBLIN-DAVIS, R.M. The seasonal abundance and feeding damage of *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) in seed capsules of *Swietenia mahagoni* in Florida. **Florida Entomologist**, v.80, p.34-41, 1997.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas.** Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 1992. 52p.

JENKINS, J.N. Breeding for insect resistance. In: FREY, K.J. (Ed.) **Plant breeding II.** Ames: Iowa University Press, 1981. 497p.

JOHNSON, B. The injurious effects of the hooked epidermal hairs of french beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on *Aphis craccivora* Koch. **Bulletin of Entomological Research**, v.44, p.779-788, 1954.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; ANN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects of natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.9871-9875, 1989.

JOHNSON, J.W.; TEETES, G.L. Breeding for arthropod resistance in sorghum. In: HARRIS, M.K. (Ed.) **Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants**: proceedings. College Station: Texas A & M University, 1979. p.168-180.

JONES, J.E.; BRAND, J.W. Influence of red plant color genes on boll weevil nonpreference and agronomic performance. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, New Orleans, 1981. **Proceedings**. Memphis: National Cotton Council of America, 1981. p.76-77.

JONES, J.E.; DICKSON, J.I; BEASLEY, J.P. Preference and nonpreference of boll weevils to selected cotton. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, Dallas, 1987. **Proceedings**. Dallas: National Cotton Council of America, 1987. p.98-102.

KENNEDY, J.S.; BOOTH, C.O. Responses of *Aphis fabae* Scop. to water shortage in hostplants in the field. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.2, p.1-11, 1959.

KENNEDY, J.S.; LAMB, K.P.; BOOTH, C.O. Responses of *Aphis fabae* Scop. to water shortage in hostplants in pots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.1, p.274-291, 1958.

KENTY, M.M.; HINSON, K.; QUESENBERRY, K.H.; WOFFORD, D.S. Inheritance of resistance to the soybean looper in soybean. **Crop Science**, v.36, p.1532-1537, 1996.

KHUSH, G.S. Genetics and breeding for resistance to brown planthopper. In: KHUSH, G.S. **Brown planthopper**: threat to rice production in Asia. Manilla: IRRI, 1979, 354p.

KHUSH, G.S. Selecting rice for simply inherited resistances. In: STALKER, H.T.; MURPHY, J.P. (Ed.) **Plant breeding in the 1990s**. Melksham: Redwood Press, 1992. 539p.

KILEN, T.C.; LAMBERT, L. Genetic control of insect resistance in soybean germplasm PI 417061. **Crop Science**, v.38, p.652-654, 1998.

KINDLER, S.D.; STAPLES, R. Behavior of the spotted alfalfa aphid on resistant and susceptible alfalfas. **Journal of Economic Entomology**, v.62, p. 474-479, 1969.

KOGAN, M. Plant resistance in pest management. In: R.L. METCALF; W. LUCKMANN. **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley & Sons, 1975. p.103-146.

KOGAN, M.; ORTMAN, E.F. Antixenosis-a new term proposed to define Painter's "Nonpreference" modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v.24, p.175-176, 1978.

KOGAN, M.; PAXTON, J. Natural inducers of plant resistant to insects. In: HEDIN, P.A. (Ed.) **Plant resistance to insects**. Washington: American Chemical Societym, 1983. p.153-171. (Symposium Series, 208)

KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, p.194-200, 1993.

LAMB, R.C.; ALDWINCKLE, H.S. Breeding for disease and insect resistance in tree crops. In: HARRIS, M.K. (Ed.) **Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants**: proceedings. College Station: Texas A & M University, 1979, p.546-560.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

LARA, F.M.; BARBOSA FILHO, G.C.; BUSOLI, A.C.; BARBOSA, J.C. Comportamento de genótipos de sorgo em relação ao ataque de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.8, p.115-124, 1979.

LEUCK, D.B. Induced fall armyworm resistance in pearl millet. **Journal of Economic Entomology**, v.65, p.1608-1611, 1972.

LEUCK, D.B.; HAMMONS, R.O.; MORGAN, L.W.; HARVEY, J.E. Insect preference for peanut varieties. **Journal of Economic Entomology**, v.60, p.1546-1549, 1967.

LINDUSKA, J.J.; HARRISON, F.P. Corn earworm: artificial infestation as a means of evaluating resistance in sweet corn. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p.565-567, 1977.

LINK, D.; ROSSETTO, C.J. Relação entre fissura na casca de arrroz e infestação de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) (Lepidoptera, Gelechiidae). **Revista Peruana de Entomologia**, v.15, p.225-227, 1972.

LOURENÇÃO, A.L.; ROSSETTO, C.J.; GERMEK, E.B.; IGUE, T.; REZENDE, J.A.M.; PEREIRA, J.C.V.N.A. Comportamento de clones de cana-de-açúcar em relação a *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Bragantia**, v.41, p.145-154, 1982.

LOWE, H.J.B. Testing sugar beet for aphid-resistance in the glasshouse: a method and some limiting factors. **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, v.76, p.311-321, 1974.

MACEDO, N. Comportamento varietal, mecanismo e herdabilidade da resistência da cana-de-açúcar ao ataque de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Piracicaba: ESALQ/USP, 1978. 88p.Tese, Doutorado.

MARTIN, F.A.; RICHARD, C.A.; HENSLEY, S.D. Host resistance to *Diatraea saccharalis* (F.): Relationship of sugarcane internode hardness to larval damage. **Environmental Entomology**, v.4, p.687-688, 1975.

MARTINS, J.F. da S.; TAN, N.V.; PINHEIRO, B. da S. Resistência de arroz de sequeiro à broca-do-colmo e sua associação com características morfológicas das plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, p.187-192, 1981.

McMURTRY, J.A. Resistance of alfalfa to spotted alfalfa aphid in relation to environmental factors. **Hilgardia**, v.32, p.501-539, 1962.

MIHM, J.A. **Toward insect resistant maize for the third world**: proceedings. Mexico: CIMMYT, 1987. 327p.

MIHM, J.A.; DEUTSCH, J.A.; JEWELL, D.; HOISINGTON, D.; GONZÁLEZ DE LEÓN, D. Improving maize with resistance to major insect pests. In: EDMEADES, G.E.; DEUTSCH, J.A. **Stress tolerance breeding**: maize that resists insects, drought, low nitrogen, and acid soils. Mexico: CIMMYT, 1994. 114p.

MILLER, R.H.; EL-MASRI, S.; AL-JUNDI, K. Plant density and wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae) resistance in Syrian wheats. **Bulletin of Entomological Research**, v.83, p.95-102, 1993.

MITCHELL, H.C.; CROSS, W.H.; McGOVERNS, W.L.; DAWSON, E.M. Behavior of the boll weevil on frego bract cotton. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.677-680, 1973.

MUSETTI, L.; NEAL, J.J. Resistance to the pink potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*, in two accessions of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v.84, p.137-146, 1997.

MUTSCHLER, M.A.; DOERGE, R.W.; LIU, S.C.; KUAI, J.P.; LIEDL, B.E.; SHAPIRO, J.A. QTL analysis of pest resistance in the wild tomato *Lycopersicon pennellii*: QTLs controlling acylsugar level and composition. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.709-718, 1996.

NASS, L.L. Pré-melhoramento de milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALQ, 2., Brasília, 1999. **Anais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. /CD-ROM/

NEAL, J.J.; STEFFENS, J.C.; TINGEY, W.M. Glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and resistance to the Colorado potato beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.51, p.133-140, 1989.

NIENHUIS, J.; HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; RUGGERO, B.; SCHAEFER, A. Restriction fragment lenght polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. **Crop Science**, v.27, p.797-803, 1987.

NISHIKAWA, M.A.N. Análise genética de populações de milho (*Zea mays* L.) visando resistência à lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* Smith). Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 98p. Tese, Doutorado.

NORRIS, D.M.; KOGAN, M. Biochemical and morphological bases of resistance. In: MAXWELL, F.G.; JENNINGS, P.R. **Breeding plants resistant to insects**. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.23-61.

NUNES, R.C.; SILVA, P.H.S. da; SILVA, L.M.S.R. da. Resistência de cultivares de arroz ao gorgulho *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.107-114, 1992.

NWANZE, K.F.; HORBER, E. Seed coats of cowpeas affect oviposition and larval development of *Callosobruchus maculatus*. **Environmental Entomology**, v.5, p. 213-218, 1976.

NWANZE, K.F.; HORBER, E.; PITTS, C.W. Evidence for ovipositional preference of *Callosobruchus maculatus*. **Environmental Entomology**, v.5, p.409-412, 1975.

ORTMAN, E.E.; PETERS, D.C. Introduction. In: MAXWELL, F.G.; JENNINGS, P.R. **Breeding plants resistant to insects**. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.3-13.

PAINTER, R. H. Insect resistance in crop plants. New York: Macmillan, 1951. 520p.

PAINTER, R.H. Crops that resists insects provide a way to increase world food supply. **Kansas State agricultural technical bulletim**, n.520, 1968. 22p.

PANDA, N. **Principles of host-plant resistance to insect pests**. New York: Allanheld Osmun; Montclair & Universe Books, 1979. 386p.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. **Host plant resistance to insects**. Guildford: Biddles, 1995. 431p.

PARK, S.J.; TIMMINS, P.R.; QUIRING, D.T.; JUI, P.Y. Inheritance of leaf area and hooked trichome density of the first trifoliolate leaf in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v.74, p.235-240, 1994.

PARLEVLIET, J.E. Selecting components of partial resistance. In: STALKER, H.T.; MURPHY, J.P. (Ed.) **Plant breeding in the 1990s**. Melksham: Redwood Press, 1992. 539p.

PATHAK, M.D. Genetics of plants in pest management. In: RABB, R.L.; GUTHRIE, F.E. **Concepts of pest management**. Raleigh: North Caroline State University Press, 1970. p.138-157.

PEFEROEN, M.; JANSENS, S.; REYNAERTS, A.; LEEMANS, J. Potato plants with engineered resistance against insect attack. In: VAYDA, M.E.; PARK, W.C. (Ed.) **Molecular and cellular biology of the potato**. Wallingford: Solydus, 1990. 323p.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSON, L.J.; PARKER, G.B.; McPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF, D.A. Genetically improved potatoes: projection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.313-321, 1990.

PILLEMER, E.A.; TINGEY, W.M. Hooked trichomes and resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Empoasca fabae* (Harris). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, p.83-94, 1978.

PILLEMER, E.A.; TINGEY, W.M. Hooked trichomes: A physical plant barrier to a major agricultural pest. **Science**, v.193, p.482-484, 1976.

PINSTRUP-ANDERSEN, P.; PANDYA-LORCH, R. **Can everybody be well fed by 2020 without damaging natural resourses?** First distinguished economist lecture. Mexico: CIMMYT, 1997. 18p.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1995. 275p.

QUIRAS, C.F.; STEVENS, M.A.; RICK, C.M.; KOK-YOKOMI, M.K. Resistance in tomato to the pink form of the potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae* Thomas): The role of anatomy, epidermal hairs, and foliage composition. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.102, p.166-171, 1977.

QUIRING, D.T.; TIMMINS, P.R.; PARK, S.J. Effect of variations in hooked trichome densities of *Phaseolus vulgaris* on longevity of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) adults. **Environmental Entomology**, v.21, p.1357-1361, 1992.

RADCLIFFE, E.B.; CHAPMAN, R.K. Plant resistance to insect attack in commercial cabbage varieties. **Journal of Economic Entomology**, v.59, p.116-120, 1966.

RAMALHO, F.S.; PARROTT, W.L.; JENKINS, J.N; McCARTY JR., J.C. Effects of cotton leaf trichomes on the mobility of newly hatched tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.77, p.619-621, 1984.

RAMALHO, F.S.; ROSSETTO, C.J.; NAGAI, V. Relação entre dureza do milho e resistência a *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855. **Ciência e Cultura**, v.28, p.1505-1606, 1976.

RASMUSSON, D.C.; PHILLIPS, R.L. Review and interpretation: plant breeding progress and genetic diversity from De Novo variation and elevated epistasis. **Crop science**, v.37, p.303-310, 1997.

RICK, C.M.; FOBES, J.F. Association of an allozyme with nematode resistance. **Tomato Genetics Cooperative**, v.24, p.25, 1974.

ROBERTS, D.W.A.; TYRRELL, C. Sawfly resistance in wheat. IV. Some effects of light intensity on resistance. **Canadian Journal of Plant Science**, v.41, p.457-465, 1961.

ROBINSON, R.A. **Return to resistance:** breeding crops to reduce pesticide dependence. Davis: AgAccess, 1996. 490p.

ROGERS, R.R.; MILLS, R.B. Reactions of sorghum varieties to maize weevil infestation under three relative humidities. **Journal of Economic Entomology**, v.67, p.692, 1974.

RUSSELL, M.P. Effects of four sorghum varieties on the longevity of the lesser rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Journal of Stored Product Research**, v.2, p.75-79, 1966.

SAGERS, J.; MIES, D.; EDWARDS, M.; BOLAN, B.; WANG, A.; METTLER, I.; BARRETT, L.; GARRET, C. Developing maize with resistance to European Corn Borer. In: MIHM, J.A. (Ed.) **Insect resistance maize:** recent advances and utilization. Mexico: CIMMYT, 1997. 302p.

SEMTNER, P.J.; RASNAKE, M.; TERRILL, T.R. Effect of host plant nutrition of tobacco hornworm and tobacco flea beetles on different types of tobacco. **Journal of Economic Entomology**, v.73, p.221-224, 1980.

SHADE, R.E.; SCHOEDER, H.E.; PUEYO, J.J.; TABE, L.M.; MURDOCK, L.L.; HIGGINS, T.J.V.; CHRISPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the α-amylase inhibitor of commom bean are resistant to bruchid beetles. **Biotechnology**, v.12, p.293-296, 1994.

SHELTON, A.M.; HOY, C.W.; NORTH, R.C.; DICKSON, M.H.; BARNARD, J. Analyses of resistance in cabbage varieties to damage by Lepidoptera and Thysanoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.81, p.634-640, 1988.

SINGH, B.; YAZDANI, S.S.; SINGH, R. Relationship between biochemical constituents of sweet potato cultivars and resistance to weevil (*Cylas formicarius* Fab.) damage. **Journal of Entomological Research**, v.17, p.283-288, 1993.

SINGH, D.P. **Breeding for resistance to diseases and insect pests**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 222p.

SMITH, C.W. History and status of host plant resistance in cotton to insects in the United States. **Advances in Agronomy**, v.48, p.251-296, 1992.

SMITH, D.S. Effects of changing the phosphorus content of the food plant on the migratory grasshopper, *Melanoplus bilituratus* (Walker) (Orthoptera: Acrididae). **The Canadian Entomologist**, v.92, p.103-107, 1960.

SMITH, O.D. Biology and breeding of peanut. In: HARRIS, M.K. (Ed.) **Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants**: proceedings. College Station: Texas A & M University, 1979. p.422-430.

SMITH, R.L; WILSON, R.L.; WILSON, F.D. Resistance of cotton plant hairs to mobility of first-instars of the pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v.68, p.679-683, 1975.

SOSA JR., O.; FOSTER, J.E. Temperature and the expression of resistance in wheat to the Hessian fly. **Environmental Entomology**, v.5, p.333-336, 1976.

SPRINGER, T.L.; KINDLER, S.D.; SORENSEN, E.L. Comparison of pod-wall characteristics with seed damage and resistance to the alfalfa seed chalcid (Hymenoptera: Eurytomidae) in *Medicago* species. **Environmental Entomology**, v.19, p.1614-1617, 1990.

STAMP, N.E. Interactive effects of rutin and constant versus alternating temperatures on performance of *Manduca sexta* caterpillars. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p.125-133, 1994.

STARKS, K.J.; WOOD JR., E.A.; TEETES, G.L. Effects of temperature on the preference of two greenbug biotypes for sorghum selections. **Environmental Entomology**, v.2, p.351-354, 1973.

SUDHAKAR, G.K.; SINGH, R.; MISHRA, S.B. Susceptibility of rice varieties of different durations to rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* Guen. evaluated under varied land situations. **Journal of Entomological Research**, v.15, p.79-87, 1991.

TEETES, G.L. Breeding sorghum resistant to insects In: MAXWELL, F.G.; JENNINGS, P.R. **Breeding plants resistant to insects**. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.23-61.

THINDWA, H.P.; TEETES, G.L. Effect of temperature and photoperiod on sorghum resistance to biotype C and E greenbug (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.1366-1372, 1994.

TINGEY, W.M.; GIBSON, R.W. Feeding and mobility of the potato leafhopper impaired by glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. polyadenium*. **Journal of Economic Entomology**, v.71, p.856-858, 1978.

TINGEY, W.M.; PLAISTED, R.L.; LAUBENGAYER, J.E.; MEHLENBACHER, S.A. Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* e *S. berthaultii* hybrids. **American Potato Journal**, v.59, p.241-251, 1982.

TINGEY, W.M.; SINGH, S.R. Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. In: MAXWELL, F.G.; JENNINGS, P.R. **Breeding plants resistant to insects**. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.87-113.

TROYER, A.F. A retrospective view of corn genetic resources. **Journal of Heredity**, v.81, p.17-24, 1990.

UCHIMIYA, H.; HANDA, T.; BRAR, D.S. Transgenic plants. **Journal of Biotechnology**, v.12, p.1-20, 1989.

UKWUNGWU, M.N.; ODEBIYI, J.A. Incidence of *Chilo zacconius* Bleszynski on some rice varieties in relation to plant characters. **Insect Science and its Application**, v.6, p.653-656, 1985.

UN (United Nations). **World population prospects**: the 1996 revision. New York: UN, 1996.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, p.33-37, 1987.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases**: epidemics and control. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VENDRAMIM, J.D.; TAPIA, D.M.T.; REIS, M.T. Influência de defeitos na casca de arroz sobre a infestação de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 e *S. oryzae* (L., 1763) (Col., Curculionidae). **Ecossistema**, v.14, p.125-131, 1989.

VENTURA, M.U.; PINHEIRO, J.B. Resistência a Insetos. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (Ed.) **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. 818p.

VERULKAR, S.B.; SINGH, D.P.; BHATTACHARYA, A.K. Inheritance of resistance to podfly and podborer in the interespecific cross of pigeonpea. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.506-508, 1997.

WALLACE, L.E.; McNEAL, F.H.; BERG, M.A. Minimum stem solidness required in wheat for resistance to the wheat stem sawfly. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.1121-1123, 1973.

WARREN, G.W.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; KOZIEL, M.G. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. **Journal of economic entomology**, v.50, p.1651-1659, 1992.

WEARING, C.H. Responses of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* to leaf age and water stress in Brussels sprouts grown in pots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.15, p.61-80, 1972a.

WEARING, C.H. Selection of Brussels sprouts of different water status by apterous and alate *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* in relation to the age of leaves. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.15, p.139-154, 1972b.

WEARING, C.H. Studies on the relation of insect and host plant: II. Effects of water stress in host plants on the fecundity of *Myzus persicae* (Sulz.) and *Brevicoryne brassicae* (L.). **Nature**, v.213, p.1052-1053, 1967.

WEARING, C.H.; VAN EMDEN, H.F. Studies on the relation of insect and host plant: I. Effects of water stress in host plants on infestation by *Aphis fabae* Scop., *Myzus persicae* (Sulz.) and *Brevicoryne brassicae* (L.). **Nature**, v.213, p.1051-1052, 1967.

WHITTAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochemics: Chemical interactions between species. **Science**, v.171, p.757-770, 1971.

WIDSTROM, N.W.; WILLIAMS, W.P.; WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M. Recurrent selection for resistance to leaf feeding by fall armyworm on maize. **Crop Science**, v.32, p.1171-1174, 1992.

WILLIAMS, W.P.; DAVIS, F.M. Breeding for resistance in maize to Southwestern corn borer and fall armyworm. In: MIHM, J.A. **Toward insect resistant maize for the third world**: proceedings. Mexico: CIMMYT, 1987. 327p.

WILSON, R.L.; PETERS, D.C. Plant introductions of *Zea mays* as sources of corn rootworm tolerance. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.101-104, 1973.

WISEMAN, B.R. Technological advances for determining resistance in maize to *Heliothis zea*. In: MIHM, J.A. **Toward insect resistant maize for the third world**: proceedings. Mexico: CIMMYT, 1987. 327p.

WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M, CAMPBELL, J.E. Mechanical infestation device used in fall armyworm plant resistance programs. **The Florida Entomologist**, v.63, p.425-432, 1980.

WISEMAN, B.R.; ISENHOUR, D.J. Relationship of planting dates and corn earworm developmental parameters and injury to selected maize entries. **Maydica**, v.37, p.149-156, 1992.

WISEMAN, B.R.; ISENHOUR, D.J. Resistance in sweet corn to corn earworm larvae. **Journal of Agricultural Entomology**, v.11, p.157-163, 1994.

WISEMAN, B.R.; McMILLIAN, W.W.; WIDSTROM, N.W. Techniques accomplishments and future potential of breeding for resistance in corn to the corn earworm, fall armyworm, and maize weevil; and in sorghum to the sorghum midge. In: MAXWELL, F.G.; HARRIS, F.A. (Ed.) **Biological control of plant insects and diseases**. Jackson: Mississippi State University and College Press, 1974. 438p.

WOOD JR., E.A.; STARKS, K.J. Effect of temperature and host plant interaction on the biology of three biotypes of the greenbug. **Environmental Entomology**, v.1, p.230-234, 1972.

25

MELHORAMENTO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO COMO FATOR DE ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS

SIDNEY NETTO PARENTONI[1]
VERA MARIA C. ALVES[1]
SANDRA K. MILACH[2]
GERALDO M. ALMEIDA CANÇADO[3]
ANTONIO F.C. BAHIA FILHO[1]

[1]Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 151 - CEP: 35701-970 - Sete Lagoas, MG.
[2]Depto. de Plantas de Lavoura–Faculdade de Agronomia/UFRGS, C.P. 776 - CEP: 91501-970 - Porto Alegre, RS.
[3]Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Caldas, MG.

1. INTRODUÇÃO

Tolerância à toxidez de alumínio em plantas tem sido intensamente estudada não só por ser fator chave na adaptação a solos ácidos mas também como problema de pesquisa relevante em áreas como classificação e física de solos, nutrição mineral de plantas, bioquímica, fisiologia vegetal, genética e melhoramento e, mais recentemente, biologia molecular. Como será discutido ao longo deste capítulo, o Brasil foi pioneiro neste trabalho, iniciando um programa de seleção para tolerância à toxidez de alumínio em trigo, muito antes que fosse identificada uma relação de causa e efeito entre, sintomatologia observada em genótipos de trigo crescidos em solos de alta acidez e a alta saturação de alumínio existente nestes solos. Desde esta observação, feita no início do século XX, até o presente, muito se avançou no entendimento dos processos envolvidos na tolerância ao alumínio em plantas, como por exemplo a criação de técnicas de *screening*, o entendimento de mecanismos envolvidos na tolerância e também estudos de herança desta característica. Entretanto estes conhecimentos são ainda considerados bastante limitados, restando grande número de questões não respondidas. Recentemente, diversos trabalhos têm abordado aspectos da biologia molecular da tolerância ao alumínio em plantas. Por outro lado, informações na área de seleção ou genética e melhoramento de culturas visando tolerância ao alumínio/adaptação a solos ácidos são encontradas na literatura de forma fragmentada e pouco sistematizada.

O foco deste capítulo é voltado no sentido de revisar aspectos que influenciam a abordagem utilizada no melhoramento de plantas para tolerância ao alumínio/adaptação a solos ácidos. Não serão discutidos avanços da biologia molecular nesta área. Uma única exceção que faz-se imperativo mencionar é o trabalho de Fuentes *et al.* (1997). Estes autores superexpressaram o gene da citrato sintase em fumo e mamão (superexpressando a produção de ácido cítrico nestas plantas) e verificaram que as plantas transgênicas mostraram-se tolerantes ao alumínio e, posteriormente, observaram que as mesmas se desenvolveram melhor em solos deficientes em fósforo do que plantas não transgênicas. O uso das ferramentas da biologia molecular deve permitir grandes avanços nesta área, principalmente associando-se estes estudos com o acervo de conhecimentos existentes nas disciplinas tradicionais anteriormente mencionadas. Analisando o tema deste capítulo, deve-se ressaltar que, o melhoramento de plantas para tolerância ao alumínio, tem sido feito no contexto de adaptação de plantas a solos ácidos, existindo grande sobreposição entre estas duas abordagens. Em geral estudos de herança desta característica têm sido feitos em condições controladas (geralmente solução nutritiva), enquanto a determinação de variabilidade genética e a seleção têm sido realizadas em solo com alta saturação de alumínio, onde, além da toxidez de alumínio, diversos outros fatores de restrição ao desenvolvimento de plantas interferem no desempenho dos genótipos avaliados. Ao longo deste capítulo serão abordados tópicos que vão desde a química do alumínio nos solos, passando por mecanismos propostos para tolerância ao

alumínio em plantas, técnicas de *screening* disponíveis e genética da tolerância ao alumínio. A seção destinada ao melhoramento de plantas para tolerância ao alumínio abordará resultados de grande número de avaliações feitas em solo com alta saturação de alumínio onde, como já mencionado anteriormente, existe interferência de diversos outros fatores de solo e planta que também são responsáveis pela adaptação destes genótipos a solos ácidos.

2. TOXIDEZ DE ALUMÍNIO EM SOLOS ÁCIDOS E ADAPTAÇÃO DIFERENCIAL DAS CULTURAS A ESTE AMBIENTE

Em 1992, um estudo do *National Research Council* nos EUA , priorizando linhas de pesquisa mais importantes para um futuro sustentável da agricultura no mundo, colocou o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições específicas de solo como uma das quatro prioridades de pesquisa. Em 2000, outro artigo do USDA classificou o estudo de plantas e fertilizantes com menor capacidade poluidora do meio ambiente e maior eficiência na produção de grãos, como o segundo grande desafio a ser vencido no século XXI, ficando apenas atrás da água potável (USA Geographic Survey, 2000).

Dentre os fatores que restringem o crescimento de plantas em solos ácidos, têm sido verificado que toxidez de Al é um dos mais limitantes (Evers & Huttl, 1990; 1991). Além de ser um metal encontrado em grande quantidade no solo, a química do alumínio é bastante complexa. Sua especiação é afetada pelo pH, constante iônica, e a natureza e concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos presentes na fase sólida do solo (Driscoll & Schecer, 1988; Ritchie, 1989). Em pH < 5 o alumínio está presente como $Al(H_2O)_6^{3+}$ (Martin, 1988). Em pH acima de 5, uma série de espécies de hidróxidos de alumínio aparecem, resultando em precipitação do alumínio presente.

Para ser tóxico o alumínio deve estar em solução (Vlamis, 1953). Uma ou mais espécies de monômeros inorgânicos de alumínio são responsáveis pela toxidez de alumínio (Hue *et al.*, 1986). Em relação à quantidade total de alumínio no solo, a concentração deste íon em solução em solos ácidos é geralmente baixa (<50 μM – Bruce *et al.*, 1989) e a força iônica da solução em solos ácidos é também baixa (geralmente < 5 mM – Edmeades *et al.*, 1985). A atividade do monômero alumínio na solução do solo necessária para reduzir crescimento radicular varia de 4 a 15 μM para diversas espécies de plantas (Adams & Lund, 1966; Wright *et al.*, 1989).

Para uma mesma saturação de alumínio em diferentes solos, pode-se observar diferentes graus de restrição ao desenvolvimento das plantas, tornando difícil comparar resultados de ensaios obtidos em diferentes condições edáficas.

Além da toxidez de alumínio, vários são os fatores que causam redução de produção em plantas cultivadas em solos ácidos: a) baixo crescimento de raízes e redução da capacidade funcional das mesmas devido aos níveis fitotóxicos de Al, Mn e H; b) deficiência de nutrientes essenciais tais como N, Ca, Mg, P, Mo e Fe; c) redução na capacidade de absorção de água devido à restrição ao desenvolvimento do sistema radicular (toxidez de Al e deficiências em geral); d) redução na aquisição de nutrientes e no fluxo de entrada dos mesmos na raiz e no transporte das raízes para a parte aérea.

Quando as condições locais do solo não são aquelas ideais para o crescimento de determinada planta, existem duas opções básicas para se abordar o problema: alterar o solo ou alterar a planta. Freqüentemente existe um contínuo de soluções intermediárias entre estas duas opções, onde se combinam diferentes níveis de correção do solo com diferentes níveis de adaptação da planta ao solo em questão.

O meio mais comum e mais eficiente de reduzir a saturação de alumínio e, ainda, de corrigir a acidez dos solos tem sido a aplicação de calcário. Para ser efetivo o calcário deve ser misturado ao volume de solo que se deseja corrigir, restringindo o poder corretivo do mesmo à camada superficial do solo, devido à dificuldade de incorporação do calcário na camada subsuperficial, abaixo de 20-30 cm. Este fato faz com que uma combinação de níveis mínimos de correção do ambiente com o uso de genótipos adaptados à acidez e eficientes no uso de nutrientes seja o objetivo a ser atingido para uma agricultura sustentável em solos ácidos.

Os principais efeitos do uso de calcário no solo são: a) reduzir a toxidez de Al e Mn; b) aumentar a disponibilidade de P, Ca e Mg; c) aumentar a CTC; d) aumentar a fixação de N, estimular a nitrificação e diminuir a disponibilidade de Mn, Zn, B, Fe e Cu; e) melhorar a estrutura do solo; f) aumentar o número de opções de culturas a serem cultivadas na área; g) em geral, calagem tem um enorme efeito benéfico na capacidade de um solo ácido em suprir nutrientes essenciais e na capacidade das plantas em absorver água e nutrientes devido a um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Por exemplo, o efeito da saturação de alumínio em um Latossolo sobre a massa de raiz de soja, medida em um volume de 1.453 cm^3 de solo é descrito por Arya e colaboradores, citados por Buol (1994). A massa de raiz de soja neste volume de solo foi de 11g, 7g, 3,5g e 1,5g para saturações de alumínio de 10%, 40%, 50% e 60%, respectivamente.

O conceito de criar genótipos adaptados às condições adversas do solo, como por exemplo toxidez de alumínio vem sendo relatado na literatura a cerca de quatro décadas (Foy *et al.*, 1964). A integração desta abordagem com um conceito mais amplo de manejo de nutrientes em geral também tem sido objeto de estudo (Sanchez & Salinas, 1981).

Existe grande variabilidade entre plantas cultivadas quanto ao seu grau de tolerância à toxidez de alumínio (Tabela 1). No grupo das extremamente tolerantes incluem-se mandioca, braquiária e caupi e no extremo de suscetibilidade estão cenoura, espinafre, algodão e feijão de cor.

O Brasil foi o país pioneiro em melhoramento de plantas para adaptação a solos ácidos (principalmente toxidez de alumínio e manganês), e hoje existem programas ativos de melhoramento para estas condições em diversas culturas no Brasil e em países como EUA, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Colômbia, México, Polônia, Rússia e diversos países da África. As culturas que têm recebido maior atenção neste tópico até o momento são trigo, milho, sorgo e arroz, mas também têm sido feitos trabalhos em soja, alfafa, trevo branco e várias forrageiras (Foy, 1997).

No Brasil, a seleção de genótipos de trigo adaptados a solos ácidos iniciou-se em 1914, muito antes da existência de qualquer base teórica sobre os processos

que ocorrem na relação solo x planta em condições de acidez do solo (Borlaug & Doswell, 1997). O país possui grandes formações ecofisiográficas em solos com alta freqüência de toxidez de alumínio, como por exemplo: a região dos Cerrados; a área de Latossolos Amarelos presentes nas chamadas terras altas da região Amazônica e nos tabuleiros costeiros da orla litorânea do país e ainda os planaltos subtropicais que vão do sul do Paraná ao norte do Rio Grande do Sul. Este fato faz com que, estudos em adaptação de plantas a tolerância ao alumínio tenham sido historicamente uma importante linha da pesquisa agrícola no país. O esforço conjunto de várias instituições públicas e privadas de pesquisa tanto na área de manejo e fertilidade de solos, quanto na área de melhoramento de plantas para adaptação a solos ácidos, foi responsável por exemplo, com que de 1970 a 1999, a área cultivada na região dos cerrados mais que dobrasse, com a produtividade média crescendo 60% e a produção de grãos passando de 6 para mais de 27 milhões de toneladas grãos/ano. A produção de soja nestas áreas tornou-se competitiva com os EUA, a área com pastagem melhorada cresceu de quase 0 para 35 milhões de ha e a área de silvicultura aumentou também de quase 0 para 3 milhões de ha. Nas últimas três décadas, 15 milhões de ha de cerrado no Brasil passaram a ser utilizados para produção agrícola, produzindo 30% da safra do país de arroz, milho e soja, 20% do café e 15% do feijão. Outros 35 milhões de ha de pastagens melhoradas implantados na região dos cerrados suportam um rebanho de 53 milhões de cabeça de gado, produzindo 40% da carne e 12% do leite do país.

A seguir é feita uma abordagem dos mecanismos propostos para explicar a tolerância à toxidez de alumínio em plantas.

TABELA 1. Tolerância ao alumínio em várias culturas, a partir de referências de diversos autores.

Extremamente Alta	Muito Alta	Alta	Média	Baixa	Muito Baixa
Andropogon gayanus[2]	Arroz[1,5,8]	Centeio[8]	Batata-doce[10]	Cebola[1]	Cenoura[1]
Brachiaria decubens[2]	Café[4]	Aveia[1]	Milho[2,4,5] Amendoim[10]	Cevada[1]	Espinafre[1]
Mandioca[3]	Batata[8]	*Aegilopis uniarista*[9]	Repolho[1] Trigo[1]	Beterraba[1]	Aipo[1]
Stylosanthes capitata[2]	*Cajanus caja*[8]		Milheto[1] Ervilha[1]	Abóbora[1]	Algodão[6]
Capim Jaraguá (*Hyparrenia rufa*)[2]	*Pueraria phaseoloides*[11]		Berinjela[1] Soja[1]	Sorgo[1,4,7]	Feijão de cor[7]
Caupi (*Vigna unguiculata*)[8]	Seringueira[16]		*Paspalum*[15] Capim Elefante[4]	Nabo[1]	Alfafa[14]
Stylosanthes guianensis[8]	Dendê[16]		*Trifolium subterraneum*[14]	Feijão Preto[4]	
Amendoim[8]			*Lotus penduculatus*	Centrosema[11]	
				Leucena[12]	

1-Tanaka & Hayakawa (1975); 2 - Spain (1979); 3 - Howeler (1985); 4 - Sanchez (1976); 5 - Salina & Sanches (1977); 6 - Kamprath (1970); 7 - Gourley (1987); 8 - Little (1988); 9 - Miller *et al.* (1997); 10 - Howeler (1991); 11- Ziegler *et al.* (1995); 12 - Kerridge *et al.* (1991); 13 - Kurniatun *et al.* (1995); 14 - Wheeler & Dodd (1995); 15 - Mackay (1991); 16 - Yost (1996).

3. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À TOXIDEZ DE ALUMÍNIO

As plantas respondem a toxidez mineral e a deficiências minerais tanto com mudanças morfológicas quanto fisiológicas e bioquímicas. Breckle (1991) observou que o crescimento e iniciação de raízes laterais secundárias e terciárias é estimulado por metais pesados como o alumínio, enquanto a raiz principal e as raízes secundárias primárias (raízes seminal e basal) têm seu crescimento suprimido. As raízes geralmente respondem a toxidez minerais tornando-se mais grossas e reduzindo sua taxa de crescimento (Kafkafi, 1991).

O primeiro sintoma de toxidez de alumínio é a inibição da elongação da raiz (Kochian, 1995). Este autor menciona a dificuldade em separar-se respostas primárias ou iniciais relacionadas à inibição do crescimento de raízes das respostas secundárias que surgem como resultado do dano no sistema radicular (por exemplo, inibição da absorção de água e nutrientes). Dados experimentais indicam que o ápice radicular é o sítio primário de indução da inibição do crescimento causada pelo Al. O ápice radicular acumula mais Al e sofre maior dano físico que os tecidos maduros da raiz (Ryan *et al.*, 1995). Apenas uma porção de 2 a 3 mm do ápice radicular de raízes de milho necessitou ser exposta ao Al para que o crescimento radicular fosse inibido (Ryan *et al.*, 1993), sendo que quando o Al foi seletivamente aplicado na zona de elongação ou em todo o sistema radicular, exceto o ápice, o crescimento não foi afetado.

Mecanismos de toxidez são uma seqüência de disrupções metabólicas que inibem o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Mecanismos de tolerância por sua vez, reduzem o impacto ou a iniciação dos mecanismos de toxidez (Munns & Scott, 1987). Tolerância seria então uma característica específica que confere vantagem a uma cultivar na presença do estresse. Tolerância pode operar em diferentes níveis: ao nível celular, ao nível de tecido, ao nível da planta como um todo ou ao nível da interação da planta com o solo. Diversos mecanismos podem operar em uma planta e os mesmos podem ter distintos controles gênicos. Plantas colhidas em área sob estresse no campo devem integrar diversos mecanismos de tolerância, sendo que alguns mecanismos podem atuar especificamente naquele tipo de solo/clima e em função das condições agrícolas locais.

Várias hipóteses têm sido formuladas para explicar os mecanismos pelos quais as plantas toleram o alumínio. Entretanto, os mecanismos fisiológicos exatos ainda não estão totalmente esclarecidos, provavelmente devido à variedade de efeitos provocados pela toxidez deste elemento (Kochian, 1995). A tolerância pode ser diferente nos níveis inter e intra-específicos, sendo controlada por diferentes genes, os quais agem através de rotas bioquímicas diferentes.

Os mecanismos de tolerância ao Al propostos na literatura podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna (Taylor, 1995; Kochian, 1995). A principal diferença entre esses dois mecanismos é o sítio de detoxificação de Al: simplasto (interno) ou apoplasto (exclusão). Os mecanismos de exclusão previnem o Al de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto. Os mecanismos de tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o Al que penetrou no simplasto (Zheng *et al.*, 1998). Os mecanismos de exclusão

propostos incluem ligação do Al na parede das células, modificação do pH da rizosfera, exsudação pelas raízes de compostos que formam quelatos com o Al, dentre outros.

Certas plantas absorvem preferencialmente nitrato em relação a amônio, liberando íons OH, o que resulta num pH de rizosfera mais alto, o que, por sua vez, reduz a concentração de alumínio na superfície da raiz.

Plantas variam quanto a capacidade de troca de cátions (CTC) da raiz. Aquelas com alta CTC de raiz devem absorver quantidades maiores de alumínio e serem então mais suscetíveis ao mesmo. Entretanto, plantas tolerantes ao alumínio devido a uma baixa CTC de raízes, deverão também ter mais baixa capacidade de absorção de outros nutrientes, podendo levar a uma baixa capacidade de resposta à melhoria do ambiente.

Estudos têm sugerido que os ácidos orgânicos atuam tanto na exclusão, via quelação do Al no apoplasto e na rizosfera (Miyasaka *et al.*, 1991; Delhaize *et al.*, 1993a,b) quanto na detoxificação do Al do simplasto, onde ácidos orgânicos como citrato e malato podem quelar Al e reduzir e/ou prevenir o seu efeito tóxico ao nível celular (Suhayda & Haug, 1986). A exsudação de ácidos orgânicos quelando Al no apoplasto ou rizosfera tem sido reportada em genótipos tolerantes de feijão (cítrico – Miyasaka *et al.*, 1991), trigo (málico e succínico – Delhaize *et al.*, 1993a,b; Ryan *et al.*, 1995; Pellet *et al.*, 1996), milho (cítrico e málico – Pellet *et al.*, 1995; Jorge & Arruda, 1997), trevo branco (málico e cítrico – Gerke *et al.*, 1994), *Arabidopsis thaliana* (cítrico e málico – Degenhardt *et al.*, 1998) e *Fagopyrum esculentum* (oxálico – Shao *et al.*, 1998), dentre outras. Segundo Jorge & Arruda (1997) na presença de Al, genótipos de milho resistentes exsudaram mais citrato e malato que os genótipos sensíveis, sendo que o nível de exsudação de citrato foi de 2 a 4 vezes maior do que o observado para malato. Esses autores também verificaram que o P não induziu exsudação de ácidos orgânicos, sugerindo processo específico de indução por Al. Resultados preliminares obtidos por Alves e colaboradores (Comunicação pessoal) indicam que o alumínio induziu a exsudação de malato por raízes da linhagem de milho Cateto Al237/67, tolerante ao alumínio. Entretanto, trabalhos realizados por Parker & Peddler (1998) e por Campbell (1999) com trigo e alfafa sugerem que a exsudação de ácidos orgânicos não é o único mecanismo envolvido na tolerância ao alumínio e que a criação de um modelo multifacetado é necessário.

Em relação ao conteúdo interno de ácidos orgânicos em raízes de milho, tem sido verificado que a exposição ao Al aumenta o conteúdo de ácidos orgânicos das raízes em cultivares resistentes e sensíveis ao Al, não resultando, entretanto, em tolerância diferencial (Pellet *et al.*, 1995; Pintro *et al.*, 1997).

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes ao Al, apresentaram menores níveis de Al nos ápices das raízes do que os genótipos selvagens. Verificou-se que os mutantes cuja resistência estava ligada ao cromossomo 1 (mutantes Al-R-108, Al-R 128, Al-R 131 e Al-R 139) liberavam grandes quantidades de citrato ou malato quando comparados com os selvagens. Entretanto, quando a resistência estava ligada ao cromossomo 4 (mutante Al-R 104), não ocorria aumento na exsudação de ácidos orgânicos, mas alcalinização da rizosfera (Degenhardt *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1998).

Um efeito ainda pouco estudado da toxidez de alumínio é sua ação induzindo um aumento na freqüência de anormalidades cromossômicas. Dois genótipos de

trigo tolerantes ao alumínio (PAT 7392 e CNT 10) foram estudados em vasos contendo solo com 4 níveis de acidez (Zanella *et al.*, 1991). Foi verificado um aumento da freqüência de diversas aberrações cromossômicas com o aumento da saturação de alumínio no solo. Os autores mencionam que baixo pH e alta saturação de alumínio podem ser, pelo menos parcialmente, responsáveis pelas altas taxas de anormalidades cromossômicas observadas em trigo cultivado em áreas de solo ácido no sul do país.

4. TOXIDEZ DE ALUMÍNIO X EFICIÊNCIA NA UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES

A resposta a redução da toxidez de alumínio em solo sob diferentes níveis de correção tem sido freqüentemente confundida com alteração de outras propriedades do solo que também mudam com o aumento do pH do mesmo. Haynes (1982) menciona que diversos estudos atribuindo resposta de plantas (incremento de produção) causado pela redução dos níveis de toxidez de alumínio no solo, na realidade são parcialmente causadas pelo aumento da disponibilidade de P e N que ocorrem com o aumento de pH em solos ácidos. Outro fator de confundimento entre resposta a correção de solo com redução na toxidez de alumínio é mencionado por Bruce *et al.* (1988). Os autores analisaram separadamente o efeito de correção da toxidez de alumínio no solo com o aumento dos níveis de Ca no mesmo e concluíram que para alguns solos a deficiência de Ca é tão ou mais importante que toxidez de alumínio.

Novais *et al.* (1985) demonstraram que em milho, fornecimento de P a apenas uma parte do sistema radicular reduz o crescimento da parte aérea da planta, apesar de não afetar o crescimento radicular ou a concentração de P na raiz. Este mesmo experimento feito com soja (Machado *et al.*, 1983) encontrou resultados opostos aos observados para milho, onde o melhor tratamento foi o P colocado de forma concentrada em apenas uma parte do sistema radicular. Novais *et al.* (1999) mencionaram que esta seria uma das razões para explicar porque a soja adapta-se melhor do que o milho em áreas de solos ácidos recém-abertas de cerrado (primeiro ano após correção do solo). A razão seria que o milho exigiria uma melhor redistribuição do P no perfil do solo para atingir melhores produções, e isto só ocorreria após alguns anos de cultivo de soja utilizando fertilizantes fosfatados.

Existem evidências de que níveis de molibdênio podem ter grande efeito em estudos de identificação de genótipos de soja tolerantes ao alumínio e ainda vários estudos indicam que os sintomas de toxidez de alumínio nesta cultura são extremamente semelhantes aos observados para deficiência de molibdênio (Miranda *et al.*, 1988; Garland & Carter, 1990; Foy *et al.*, 1992).

5. TOXIDEZ DE ALUMÍNIO X FLORA MICROBIANA DO SOLO

Dentre as várias alternativas para reduzir o problema de uso agrícola de solos ácidos com alta saturação de alumínio está a seleção de genótipos de plantas que levem a uma maior associação das mesmas com microrganismos adaptados às condições de acidez do solo. O maior exemplo de associação benéfica planta x microrganismo está no conjunto soja x *rhizobium*, que levou o Brasil a se tornar a única nação do mundo tropical onde praticamente não se utiliza fertilizante

nitrogenado em quase 10 milhões de ha. Outro exemplo desta associação é aquela entre cana-de-açúcar e microrganismos diazotróficos endofíticos, capazes de suprir o N necessário a esta cultura. Estudos de efeito do alumínio em bactérias têm sido conduzidos em placas com ágar ou meio de cultura, os quais contêm diversos componentes que podem levar a uma complexação do Al e redução em sua toxicidade (Flis *et al.*, 1993). Estudos têm mostrado que tolerância à acidez em bactérias noduladoras, não necessariamente confere tolerância ao alumínio (Rail, 1991; Thornton & Davey, 1983).

Aumento na disponibilidade de P para as plantas causado por micorrizas tem sido demonstrado (Raju *et al.*, 1990; Jasper & Davy, 1993). Disponibilidade de P e crescimento de massa seca para sorgo, milho e mandioca crescidos em solo ácido com toxidez de alumínio, após inoculação de micorriza têm sido 4 a 12 vezes superior que aquele verificado em solo ácido previamente esterilizado (Keltjens, 1997). O número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (AMF) encontrados em áreas de café no sudeste do Brasil foi altamente influenciado pela toxidez de alumínio. Em solos com menos de 1,2 cmol Al/kg, foram encontradas 30 espécies de micorriza, enquanto em solos com valores mais altos de alumínio apenas 3 espécies foram encontradas (Fernandes & Siqueira, 1989). Os autores reportam que em solos com pH menor que 5,5 a toxidez de Al é o fator que mais inibe o desenvolvimento de micorrizas. O efeito do Al seria atuar como um fator fungistático para espécies de micorrizas sensíveis à acidez (Siqueira *et al.*, 1984).

6. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À TOXIDEZ DE ALUMÍNIO

A etapa inicial para o estabelecimento de um programa de melhoramento para tolerância ao alumínio é o desenvolvimento de metodologias de avaliação.

A resposta de cultivares de uma mesma espécie de planta à toxidez de alumínio tem sido avaliada ao nível de campo, em vasos em casa de vegetação e em experimentos com solução nutritiva (Fageria *et al.*, 1988). Um primeiro passo em todos estes experimentos é a identificação de genótipos padrões tanto para tolerância quanto para suscetibilidade ao alumínio, os quais serão utilizados como controles em experimentos futuros.

Em um Latossolo Vermelho Escuro com níveis médios de saturação de alumínio (36%), a eficiência na utilização de fósforo em milho foi mais importante para adaptação dos genótipos a este ambiente do que tolerância à toxidez de alumínio (Parentoni *et al.*, 1995). Neste caso, seleção independente para tolerância ao alumínio e para eficiência na utilização de fósforo, seguida por avaliação em solos com diferentes níveis de saturação de alumínio permitiriam melhor discriminação de genótipos superiores.

Uma vantagem do uso de avaliações em vários estádios é eliminar os indivíduos altamente suscetíveis. Isto aumentaria a precisão dos ensaios em solo a serem realizados posteriormente, devido a uma redução da interação genótipo x ambiente dentro do ensaio, causada pela morte dos indivíduos altamente suscetíveis reduzindo a precisão do ensaio e tornando desigual a competição entre parcelas de acordo com sua posição em relação ao genótipo altamente suscetível. Redução na precisão experimental de ensaios em solos ácidos em culturas alógamas como o milho, pode também ser causada

pela casualização no campo de genótipos com grande variação em ciclo, existindo baixa coincidência entre o florescimento dos mesmos. Neste caso, serão afetados principalmente os genótipos muito precoces ou muito tardios. Em milho, em geral os genótipos do tipo superprecoce tendem a ter pior desempenho em condições de alta saturação de alumínio.

Outro ponto importante a ser considerado na seleção é o nível de estresse a ser utilizado, tanto em solução nutritiva quanto em solo, para maximizar a diferença entre genótipos. Ainda no caso de alógamas onde os efeitos de depressão por endogamia são significativos, como em milho, os níveis de saturação de alumínio nos solos utilizados para avaliação de híbridos podem ser superiores àqueles utilizados para linhagens. Nestas últimas, altos níveis de saturação de alumínio no solo podem danificar drasticamente a maioria dos genótipos avaliados, tornando-os altamente suscetíveis e causando os inconvenientes já mencionados acima. Exemplo disto é relatado por Bahia Filho *et al.* (1978) que, avaliando 363 linhagens de milho em solo com 55% de saturação de Al verificaram que, 60 dias após o plantio, 68,7% delas estavam mortas, 3,6% receberam nota 4 e nenhuma delas recebeu nota 5, numa escala visual de 1 a 5 (1 significando plantas mortas e 5 indicando muito bom aspecto visual).

Existe um nível ótimo de estresse que maximizará a diferença entre genótipos quanto à sua tolerância à toxidez de alumínio. Para que o método de avaliação possa discriminar genótipos de forma confiável, o nível de estresse deve ser bem controlado. Por exemplo, a toxidez de alumínio depende do pH, da mineralogia do solo (Al pode estar na forma amorfa ou ligado à gibbsita, goetita, hematita ou ainda complexado pela matéria orgânica) e de outros íons presentes no solo ou na solução nutritiva. Níveis de Ca e Mg podem reduzir os efeitos deletérios do alumínio (Rengel, 1992). Por outro lado, níveis suficientes de Ca e Mg devem estar presentes no meio usado para avaliação de forma a permitir o funcionamento dos mecanismos de tolerância.

Outros fatores, como temperatura por exemplo, também podem influir no resultado da avaliação. Alta temperatura aumentou o dano causado por alumínio em sorgo (Furlani & Clark, 1981), trigo (Aniol, 1983) e *ryegrass* (Rengel & Robinson, 1990). Avaliações conduzidas em casa de vegetação, principalmente nos meses mais quentes do ano, exigem que a estrutura disponha de perfeito sistema de refrigeração para que se obtenham resultados confiáveis. Estresses como seca ou encharcamento podem também afetar os resultados da avaliação. Krietz & Foy (1988) reportam que, sob baixa disponibilidade hídrica, uma variedade de cevada tolerante ao alumínio se comportou melhor que outra suscetível, enquanto não se observou diferença entre estes genótipos em condição de boa disponibilidade hídrica. Wagatsuma (1983) relatou que a falta de oxigenação na solução nutritiva reduz a tolerância ao alumínio. Já em solo, excesso de água causando anaerobiose pode levar a um aumento do pH e reduzir a toxidez de alumínio, o que pode ocorrer por exemplo em ensaios em vasos onde se utiliza solo ácido mas níveis excessivos de irrigação. O autor também mencionou ainda que um dos mecanismos de tolerância ao alumínio em trigo é baseado na exclusão do alumínio da região sensível do ápice da raiz e que este mecanismo depende de um bom funcionamento metabólico da planta. O autor concluiu que qualquer fator ambiental que reduza esta atividade metabólica deve reduzir o potencial discriminatório da avaliação.

6.1 AVALIAÇÃO EM SOLOS ÁCIDOS COM ALTA SATURAÇÃO DE ALUMÍNIO

Crescer plantas no campo em solos ácidos tem sido a base de programas de seleção para tolerância ao alumínio e adaptação a solos ácidos. Avaliações ao nível de campo envolvem a seleção de plantas individuais (no caso de autógamas) ou linhagens superiores (autógamas ou alógamas) avaliadas em fileiras curtas e teste posterior em ensaios repetidos em vários ambientes. Avaliação ao nível de campo tem a vantagem sobre aquelas conduzidas em casa de vegetação que é o crescimento dos genótipos nas condições naturais de solo e clima, sendo obtidos dados de produção que refletem os efeitos do estresse durante todo o ciclo de desenvolvimento da planta. Os maiores problemas das avaliações em campo são a alta variabilidade das áreas experimentas, o confundimento causado pela resistência diferencial dos genótipos à pragas e doenças, a sua tolerância diferencial a fatores como seca e acamamento, associados ainda ao tempo necessário para a avaliação (uma estação de crescimento). A saturação de alumínio e o nível de nutrientes a serem aplicados para obter-se máxima discriminação entre genótipos variam com o tipo de solo e com a cultura estudada. Culturas altamente tolerantes ao alumínio, como por exemplo arroz, podem ser avaliadas em solos ácidos recebendo pequena dose de calagem (Howeler & Cadavid, 1976). Fato a ser mencionado são os altos níveis de saturação de alumínio (60% a 90%) que são reportados para os solos encontrados nos chamados Lhanos Colombianos. Esses solos em geral têm textura média a arenosa, alto teor de matéria orgânica e estão em região de alta precipitação (2000 mm/ano). Entretanto, em ensaios de milho para adaptação a solos ácidos da Rede Internacional do *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo* (CIMMYT), maiores reduções nos níveis de produção, comparados aos obtidos em solos da Colômbia, têm sido observados em Latossolo Vermelho Amarelo textura argilosa com níveis de saturação de alumínio variando de 45% a 60%, representando solos ácidos da região do cerrado brasileiro. Este caso reforça a idéia de que a saturação de alumínio isoladamente não é diretamente correlacionada com o nível de estresse imposto pelo solo à cultura.

A avaliação ao nível de campo em solos ácidos, torna difícil separar o efeito dos vários estresses minerais que ocorrem nesta situação, sendo inadequada quando o objetivo é estudo detalhado de herança ou mecanismo fisiológico responsável pela tolerância a um fator específico como tolerância ao alumínio, mas sendo apropriada quando se visa selecionar cultivares adaptadas ao conjunto de estresses presentes em determinada área de solos ácidos (Scott & Fisher, 1989).

Dois problemas normalmente encontrados para discriminar cultivares tolerantes e sensíveis ao alumínio, em ensaios de campo, são os níveis de saturação de alumínio utilizados para a avaliação e a escolha de um índice apropriado para esta função.

A importância da escolha de nível adequado de saturação de alumínio para discriminar genótipos é mencionada por Ahlrichs *et al.* (1991). Os autores avaliaram crescimento relativo de raiz seminal (RRL) em solo corrigido e em 2 solos ácidos com 50% e 89% de saturação de alumínio. O valor de RRL (%) no solo com 50% de saturação de Al foi de 88% para o genótipo de sorgo tolerante (SC283) e de 57% para o genótipo sensível (TAM428). Já no solo com 89% de saturação de alumínio as duas cultivares apresentaram RRL de 29%, não sendo possível distinguir entre as

mesmas. Este fato enfatiza a importância da escolha de um nível adequado de alumínio no solo para discriminar cultivares. Deve-se ainda ter em mente que estes níveis podem variar de acordo com o grau de tolerância da espécie estudada.

O índice mais simples utilizado para separar cultivares tolerantes e sensíveis tem sido dividir a produção no nível sem estresse pela produção obtida no nível com estresse. Este índice tem sido amplamente utilizado (Sangalang & Bouwkamp, 1988) e visa separar efeitos variáveis de potencial produtivo entre as diversas cultivares, da resposta ao estresse de cada cultivar individualmente.

O problema de utilizar relação entre produção no nível sem estresse em relação a produção no nível com estresse como o único critério para determinar tolerância é demonstrado graficamente na Figura 1, utilizando dados obtidos por Scott & Fisher (1989). Verifica-se na Figura 1 que, no caso das três cultivares de trigo (linhas contínuas), o uso exclusivo deste índice, não distinguiria entre os mesmos. Este índice já distinguiria por exemplo entre as duas cultivares de cevada. Entretanto, a cultivar de cevada Dayton (D) seria erroneamente classificada como sensível em relação à cultivar Kearney (K), devido a maior capacidade da cultivar tolerante (Dayton) de responder a melhoria ambiental, fazendo com que a mesma seja penalizada com o índice utilizado. Um problema com o uso deste índice é que o mesmo tende a favorecer cultivares não responsivas.

Vários índices para distinguir níveis de tolerância entre cultivares são encontrados na literatura. Como mencionado anteriormente, o uso exclusivo da relação de produção entre o nível sem e com estresse, apesar de ser capaz de separar os genótipos altamente afetados pelo alumínio, tende por outro lado a incluir no grupo dos genótipos tolerantes aqueles genótipos sensíveis ao alumínio mas com baixa capacidade de responder a melhoria do ambiente. Para corrigir esta situação, vários índices têm sido propostos, como mostrado na Tabela 2. Nicholaides & Piha (1987) propuseram plotar em um gráfico no eixo "x" a produção no nível mais alto

TABELA 2. Índices de seleção (IS) utilizados em experimentos de campo onde são avaliados genótipos sob dois níveis de um fator de estresse (exemplo: produção do genótipo i em solo com alta saturação de alumínio e produção do mesmo genótipo em solo corrigido).

1) IS = Ai/Bi = Produção do genótipo i no solo com alto nível alumíno (Ai) /produção do genótipo i no solo com baixo nível de alumínio (Bi).
2) IS = gráfico X,Y onde X= Ai e Y= Ai/Bi. Utilizam-se retas cortando a média dos eixos x e y para determinar 4 quadrantes (Nicholaides & Piha, 1987).
3) IS = (Ai/Bi) x (Ai/T) onde T é a produção do genótipo mais produtivo no nível alto de alumínio (Howeler, 1987).
4) IS = (Ai x Bi) / (A x B) onde A é a média de todos os genótipos no nível alto de alumínio e B é a média de todos os genótipos no nível baixo de alumínio.
5) IS = [(Ai x Bi) / (A x B)] x [Ai /A] onde A é a média dos genótipos no nível alto de alumínio e B é a média dos genótipos no nível baixo de alumínio.
Intervalos de classes entre as curvas 1, 2 e 3 baseados nas seguintes fórmulas:
6 a - Curva 1 XY=C/C= 1
6 b - Curva 2 XY=C1/C onde C1 = (X + 1sdx) x (Y + 1sdy)
6 c - Curva 3 XY=C2/C onde C2 = (X + 2sdx) x (Y + 2sdy)

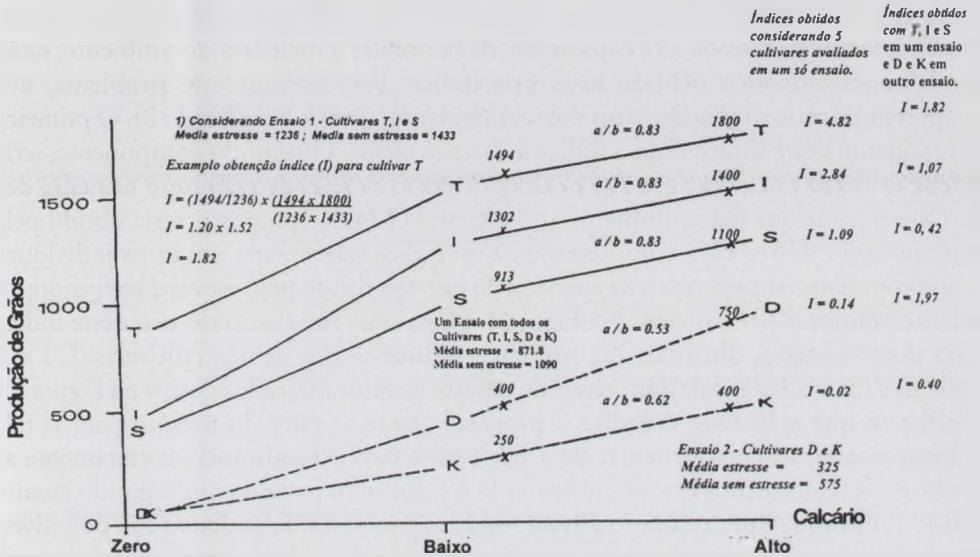


FIGURA 1. Dados adaptados de Scott & Fisher (1989) mostrando avaliação da produção média de grãos de três cultivares de trigo (linhas contínuas) e duas cultivares de cevada (linhas pontilhadas) em diferentes níveis de acidez do solo. Foram simulados dois níveis de estresse para avaliação das 5 cultivares (pontos nos gráficos marcados com x). Dentro deste intervalo foram obtidos os índices (a/b) para cada cultivar e foi calculado o índice 5 (vide Tabela 2) assumindo duas situações distintas: a) as três cultivares de trigo avaliados em um ensaio e as duas cultivares de cevada avaliadas em um segundo ensaio; b) foi simulado uma situação como se as cinco cultivares fossem de uma mesma espécie e tivessem sido avaliadas simultaneamente em um único ensaio.

de acidez e no eixo "y" estaria a relação produção no nível com estresse dividida pela produção no nível sem estresse (índice 2 na Tabela 2). Duas retas traçadas na média de cada um dos dois eixos permitiriam dividir os genótipos em quatro quadrantes incluindo aqueles tolerantes ou sensíveis (acima ou abaixo da média do eixo x) e aqueles responsivos ou não responsivos (acima ou abaixo da média do eixo y). Outro índice proposto (índice 3 na Tabela 2), multiplica o índice 1 pela relação entre a produção da cultivar no nível alto de alumínio dividida pela produção da cultivar mais produtiva no nível alto de alumínio. Este índice dá peso especial aquelas cultivares tendo alta produção em condição de estresse e corrige para variações em dados de produção de ensaios conduzidos em diferentes anos ou locais. Uma outra possibilidade do índice 3 é utilizar em vez da cultivar mais produtiva sob estresse (T), uma média das cultivares mais produtivas sob estresse. O índice 4 tem no numerador a multiplicação da produção no nível alto e baixo de estresse para a cultivar "i" e no denominador a multiplicação da média da produção de todas as cultivares avaliadas no nível alto e baixo de estresse. Este índice seleciona cultivares com altos níveis de produção nos dois níveis de estresse.

O objetivo básico de um programa de *screening* de genótipos para tolerância a determinado estresse é identificar aqueles genótipos que sejam mais produtivos quando submetidos a este estresse, mas que respondam à melhoria do ambiente. Estes ensaios em geral avaliam simultaneamente em ambiente com e sem estresse, um grande número de genótipos. O uso de um índice como o de número 4 (Tabela 2), permite identificar

os genótipos superiores em ambiente com e sem estresse. Entretanto, genótipos com média tolerância, mas de alta capacidade de responder à melhoria do ambiente, serão também selecionados utilizando-se este índice. Para corrigir este problema, nós propusemos um outro índice com dois componentes (índice 5 da Tabela 2). O primeiro componente deste índice seria o índice 4 descrito acima. O segundo componente, seria a relação entre a produção do genótipo "i" em condição de estresse e a média dos genótipos avaliados neste ambiente sob estresse. O índice proposto seria obtido pela multiplicação destes dois componentes. Este índice selecionaria então os indivíduos mais produtivos na presença e na ausência do estresse, dando peso especial aos genótipos mais tolerantes a este estresse. Na Figura 1 é feita uma simulação do uso deste índice para duas situações distintas. Na primeira, assume-se que as três cultivares T, I e S tenham sido avaliadas sob dois níveis de estresse (pontos marcados com x na Figura 1). Verifica-se que aplicando o índice 5 proposto acima, o valor do mesmo para as três cultivares seria, respectivamente, de 1,82, 1,07 e 0,42, classificando corretamente as mesmas. Se assumirmos que as cultivares D e K fizessem parte de um segundo ensaio, e assumindo ainda que as duas cultivares tenham também sido avaliadas sob dois níveis de estresse (pontos marcados com x na Figura 1) o índice obtido para as mesmas seria de 1,97 e 0,40, novamente classificando corretamente as cultivares. Se a seleção fosse feita para cada ensaio independente, as cultivares T e D seriam selecionadas nos ensaios 1 e 2, respectivamente. Deve-se mencionar que nesta hipótese de dois ensaios distintos, as condições de estresse entre ensaios devem ter sido bastante diferentes, baseado no valor das médias de cada um dos ensaios. Nesta hipótese, o ensaio 1 avaliaria as cultivares T, I e S na presença e ausência do estresse e o ensaio 2 avaliaria as cultivares D e K com e sem estresse. Uma segunda simulação que pode ser feita ainda utilizando os dados da Figura 1, seria assumir que as cinco cultivares foram avaliadas em um único ensaio conduzido em ambiente com e sem estresse. Neste caso, o valor do índice obtido para as cultivares T, I, S, D e K, seria respectivamente de 4,82, 2,84, 1,09, 0,14, e 0,02 mostrando a superioridade da cultivar T sobre as demais. O índice proposto (índice 5, Tabela 2), foi aplicado a um total de 589 híbridos de milho avaliados com e sem estresse de P e em solo com 40% de saturação de alumínio e solo corrigido, distribuídos num total de nove ensaios avaliados de 1995 a 2000 (Parentoni *et al.*, dados não publicados). Foram observadas as seguintes propriedades: a) para os nove ensaios avaliados, este índice variou de 0 a 5; b) valores acima de 2 indicaram genótipos superiores dentro de cada ensaio. Este mesmo índice foi também aplicado a um grupo de 124 linhagens de milho avaliadas *per se* em cinco ensaios diferentes, conduzidos em um Latossolo Vermelho Escuro com estresse de P (2 ppm) e sem estresse de P (15 ppm) e em solo com 40% de saturação de alumínio e solo corrigido (Parentoni *et al.*, dados não publicados). Foi observado que, para linhagens, os valores observados para este índice variaram de 0 a 10, sendo que valores acima de 2 também identificaram genótipos superiores. Como sumário das observações feitas acima, pode-se concluir que o índice proposto permite selecionar genótipos superiores a partir de dados de *screening* obtidos avaliando-se um grande número de genótipos em diferentes ensaios do tipo com e sem estresse. Deve-se mencionar que, no caso de culturas alógamas como o milho, linhagens, híbridos e variedades devem ser avaliados em ensaios distintos, permitindo então comparar-se os índices obtidos nos vários ensaios utilizando diferentes tipos de material genético.

O índice 6 permite traçar curvas que demarcam limites para os genótipos considerando a média nos dois níveis de saturação de alumínio, a média acrescida de um desvio-padrão nos dois níveis e a média mais dois desvios-padrão. Um exemplo do uso deste índice é dado por Howeler (1991) para 275 cultivares de mandioca (Figura 2). Como mostrado, os genótipos podem ser divididos em quatro classes denominadas material não adaptado, material adaptado, material bem adaptado e material com excelente adaptação, incluindo resultados tanto do nível com alta saturação quanto do nível com baixa saturação de alumínio.

Kasim *et al.* (1990) avaliaram 50 genótipos de milho em solo com alta saturação de alumínio e em solução nutritiva e encontraram baixa correlação entre resultados dos dois tipos de avaliação. Avaliações da correlação entre crescimento relativo de raiz seminal em milho crescido em solução nutritiva com 6 ppm de alumínio e produção em solo com saturação de alumínio variando de 36% a 60%, em ensaios conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, têm encontrado valores próximos ou inferiores a 0,50 (dados não publicados). Apesar deste valor ser considerado baixo, isto apenas indica que vários outros fatores além da tolerância ao alumínio devem estar afetando a adaptação destes genótipos a solos ácidos onde é conduzida a avaliação, reforçando a idéia do desenvolvimento de múltiplas avaliações para diferentes fatores (avaliações independentes para tolerância ao alumínio e para eficiência a P), de forma a aumentar a correlação entre resultados de casa de vegetação e de campo.

O estádio de desenvolvimento da planta em que é feita a avaliação também deve ser considerado. Em geral, tem-se encontrado níveis razoáveis de concordância entre resultados obtidos em estudos de curta duração utilizando plântulas e ensaios de longa duração (Scott & Fisher, 1989). Entretanto, por exemplo Sartaim *et al.* (1978) e Hanson *et al.* (1979) trabalhando com soja, encontraram baixa concordância

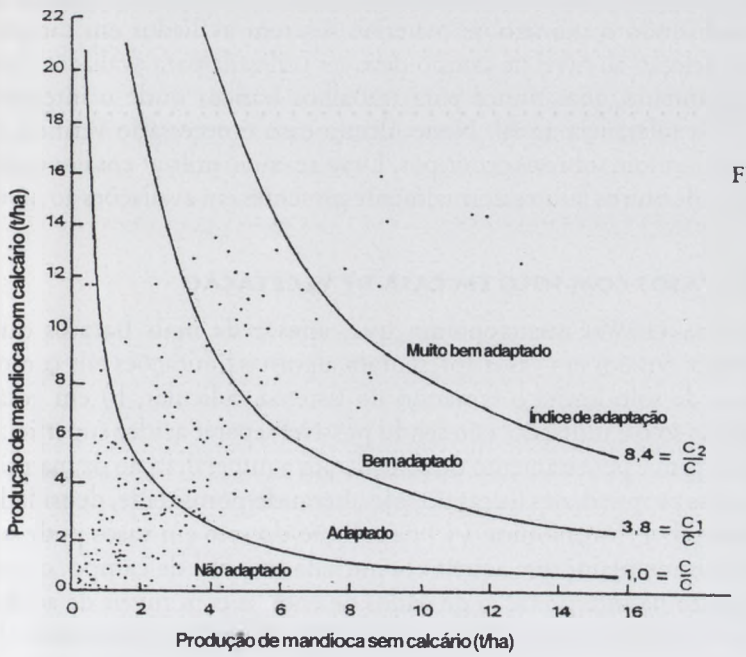


FIGURA 2. Produção de 275 cultivares de mandioca sem e com aplicação de 4 t calcário/ha em solo com alta saturação de alumínio em Carimagua, Colômbia. Linhas separando as 4 categorias de adaptação: não adaptado, adaptado, bem adaptado e muito bem adaptado foram baseadas no índice 6 descrito na Tabela 2. (Adaptado de Howeler, 1991).

entre tolerância ao alumínio ao nível de plântula e tolerância ao alumínio em plantas adultas. Borkowska (1991) avaliou duas cultivares de cereja (*Prunus cerasus*) para tolerância ao alumínio em vasos irrigados com solução nutritiva com seis níveis de alumínio (variando de 0 a 750 mM/l). Foram utilizadas plantas com três semanas e plantas com seis meses de idade. Os autores concluíram que plantas mais velhas (seis meses) mostraram maiores níveis de tolerância à toxidez de alumínio que plantas jovens. Uhlen (1985) também encontrou que os efeitos fitotóxicos do alumínio em cevada foram afetados pela idade da planta avaliada.

Independente do método de avaliação utilizado, a verificação final do resultado obtido no programa de seleção para estresse deve ser confirmado ao nível de campo. Um genótipo mais tolerante deve resistir de forma diferenciada ao estresse ao qual encontram-se submetidos os genótipos avaliados e mostrar capacidade produtiva superior naquela condição. Duncan (1988) descreveu um sistema de seleção para tolerância à acidez do solo em genótipos de sorgo. O autor realizou um primeiro ciclo de seleção em solo com pH 4,8 e 20% de saturação de alumínio e um segundo ciclo de seleção foi feito em solo com pH 4,2-4,4 e 50% de saturação de alumínio.

No campo, a seleção é feita para solos ácidos e não apenas para Al. Isso porque, para que possamos obter um nível de 45% de saturação de Al, os níveis de fósforo, cálcio e magnésio não podem estar altos. Além disso toxidez de outros elementos, como por exemplo manganês, também pode ocorrer, devido ao baixo pH. Assim, no campo, faz-se seleção para todo um complexo ligado a solos ácidos e não apenas para Al. Deste modo, materiais selecionados como altamente tolerantes ao Al em solução nutritiva podem apresentar *performance* apenas mediana no campo e vice-versa. Entretanto, a técnica de solução nutritiva é adequada para estudos básicos de mecanismos de tolerância ao Al, estudos sobre herança, estudos de seleção exclusivamente para alumínio e também para se descartar o terço inferior de materiais avaliados em programas de melhoramento, reduzindo o número de materiais a serem avaliados em campo. Deve-se ressaltar que, seleção ao nível de campo deve ser utilizada para avaliações em programas de melhoramento, mas nunca para trabalhos básicos onde o interesse específico seja estudar a tolerância ao Al. Neste último caso é necessário verificar o efeito em separado do alumínio sobre os genótipos. Deve-se então utilizar ensaios onde não exista interferência de outros fatores normalmente presentes em avaliações ao nível de solo.

6.2 AVALIAÇÃO EM VASOS COM SOLO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Edmeades *et al.* (1995) mencionaram que, apesar de mais baratos que experimentos de campo, ensaios em vasos apresentam algumas limitações tais como: a) o pequeno volume de solo limita o tamanho do sistema radicular; b) em geral apenas um horizonte do solo é utilizado, não sendo possível separar acidez superficial e subsuperficial; c) secagem e peneiramento do solo afetam a mineralização da matéria orgância e modificam as propriedades físicas do solo alterando porosidade, densidade e retenção de umidade; d) a "força iônica" (I) da solução do solo em vasos pode ser várias ordens de magnitude maior que aquela encontrada ao nível de campo, o que pode ter grande impacto na interpretação de dados de ensaios com níveis de acidez realizados em vasos. Estes fatos podem fazer com que dados obtidos em estudos de

acidez de solo conduzidos em vasos, em alguns casos, não mostrem boa correspondência com resultados obtidos em campo (Edmeades *et al.*, 1983) enquanto em outros ensaios, boa correspondência pode ser obtida (Simpson *et al.*, 1979; McLaughlin & James, 1991).

Uma das condições para um *screening* eficiente utilizando vasos é que o solo escolhido deveria produzir um único estresse, seja por exemplo de alumínio ou manganês, e que este não interaja com outras deficiências nutricionais como cálcio, fósforo, magnésio, molibdênio etc. O objetivo deve ser controlar a natureza e intensidade do estresse imposto de modo a se atingir de forma rotineira uma clara separação dos genótipos quanto a sua tolerância (Scott & Fischer, 1993). Problemas mais comuns em avaliações utilizando vasos são a variabilidade existente no solo da área coletada, as condições de armazenamento deste solo e o nível de suplementação de nutrientes adequado para permitir máxima discriminação. Foy (1976) reportou existência de deficiência de molibidênio e toxidez de manganês em experimentos com vasos onde o objetivo era avaliar apenas tolerância à toxidez de alumínio.

Ritchey *et al.* (1991) cresceram plântulas de sorgo em um solo ácido de Porto Rico corrigido com nove níveis de hidróxido de cálcio. O crescimento de raiz seminal em cada um dos níveis foi avaliado. O índice utilizado para determinar tolerância foi a relação entre crescimento da raiz e a raiz quadrada do conteúdo de cálcio trocável no solo. Este teste rápido em vasos, em casa de vegetação, mostrou boa correspondência ($r = 0,74^*$) com os resultados de tolerância obtidos em campo.

6.3 AVALIAÇÃO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Dois efeitos principais causados pelo alumínio em estudos em solução nutritiva têm sido relatados na literatura: a) o alumínio causa distúrbios na absorção, transporte e utilização de nutrientes como Ca, K e P (Clark, 1977); b) raízes imersas em solução com concentração apropriada de alumínio (variável com a espécie de planta), mostram redução acelerada da elongação de raiz. As principais vantagens do uso de solução nutritiva é que elas são rápidas, permitem avaliar grande número de genótipos, são não destrutivas, permitindo transplantar material tolerante e, principalmente, permitem controle mais preciso do nível de estresse empregado e do nível de nutrientes utilizado. As principais desvantagens são: medem apenas a resposta inicial ao estresse; disponibilidade de outros nutrientes, como P por exemplo, são muito mais altas em solução nutritiva do que em solo; o método não leva em conta a existência de outros fatores bióticos e abióticos do solo (micorriza, concentração de outros nutrientes etc.); o método não é muito adequado para espécies propagadas vegetativamente como batata-doce, cana-de-açúcar e mandioca, que necessitam de maior espaço do que aquele necessário para plantas multiplicadas por semente.

A grande vantagem da técnica de solução nutritiva é a possibilidade de estudar-se o efeito individual de cada um dos fatores que compõem o complexo denominado "acidez", encontrado em solos. Isto é, os efeitos de pH, Al, Ca, Mg e P, podem ser examinados separadamente. A técnica evita problemas como desuniformidade de área experimental que ocorre normalmente em solos. Entretanto, os fenômenos que ocorrem ao nível de rizosfera ou a capacidade tampão do solo em termos de disponibilidade de nutrientes não podem ser simuladas em solução nutritiva. Ainda

assim, solução nutritiva é a técnica mais simples e de menor custo que possibilita avaliar grande número de genótipos para tolerância ao alumínio em menor espaço de tempo. Quanto ao tempo de duração destes experimentos, existem metodologias que vão desde 48 h em solução mínima contendo apenas 0,2mM de $CaSO_4$ até aquelas com três semanas de duração (Wheeler *et al.*, 1992a). Uma outra variação desta técnica é o uso de grandes volumes de solução (> 2000 litros), que passam continuamente pelo sistema radicular e têm uma composição próxima àquela encontrada na solução do solo (Asher & Edwards, 1983).

Em geral o *ranking* obtido em solução nutritiva para classificar os genótipos como tolerante ou sensível ao alumínio tem sido razoavelmente próximos àqueles obtidos em solos ácidos em culturas como cevada (Reid *et al.*, 1971), trigo (Foy *et al.*, 1965), arroz (Nelson, 1983), soja (Sartain & Kamprath, 1978; Campbell & Carter, 1990) e girassol (Foy *et al.*, 1974b). Entretanto resultados opostos são reportados por Foy (1976), Marschner (1991) e Parentoni *et al.* (1995) e podem ser devidos aos efeitos de rizosfera ou a grande disponibilidade de nutrientes, como fósforo por exemplo, existentes na solução nutritiva quando comparado a sua disponibilidade em solo, particularmente em um sistema radicular danificado pelo alumínio.

Um dos problemas encontrados ao se comparar resultados de diversos experimentos de solução nutritiva é que em geral se fornece dados de concentração de alumínio na solução, enquanto resultados experimentais têm mostrado maior correlação entre crescimento de plantas em campo com atividade (e não com concentração) de alumínio na solução (Alva *et al.*, 1986a,b; Bruce *et al.*, 1988). A atividade de alumínio na solução pode ser afetada por vários fatores como pH e concentração de nutrientes.

A importância de se estabelecer a concentração adequada de alumínio na solução para obter máxima discriminação entre genótipos varia com a espécie estudada. Deve-se manter também controle do pH da solução e dos níveis de P, Ca e Mg na mesma (Scott & Fisher, 1989). Blamey *et al.* (1983) mencionou que a maioria dos estudos de avaliação de toxidez de alumínio em solução nutritiva emprega concentrações de Al^{3+} variando de 0,1 a 1,1mM, como reportado para cevada, trigo, triticale, centeio e arroz (Reid *et al.*, 1971; Foy, 1976; Howeler & Cadavid, 1976; Mugwira *et al.*, 1976). Estas concentrações são em alguns casos 1.000 vezes superiores àquelas encontradas na solução do solo. Estas diferenças podem ser necessárias para uma boa discriminação dos genótipos avaliados em um curto espaço de tempo ou ainda podem ser uma superestimação da quantidade de alumínio tóxico presente na solução devido à precipitação do mesmo sob a forma de fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio (Blamey *et al.*, 1983).

Em geral o critério de seleção utilizado nestes ensaios baseia-se no crescimento da raiz seminal. Os genótipos são crescidos em solução sem e com alumínio e após um período de dois dias a três semanas é calculado um índice de crescimento da raiz seminal em cada um dos dois níveis de alumínio. A relação entre o índice obtido no nível alto de alumínio dividido pelo crescimento na solução controle (sem alumínio) é utilizada para determinar a tolerância à toxidez de alumínio. Tem-se também utilizado o crescimento líquido da raiz – CLR (crescimento após exposição ao alumínio menos o crescimento inicial) ou crescimento relativo da raiz seminal – CRRS (final menos inicial dividido pelo inicial), conforme sugerido por Magnavaca (1982). Estudo

de avaliação em solução nutritiva com 6 ppm de alumínio envolvendo famílias $F_{3:4}$ obtidas do cruzamento entre uma linhagem altamente tolerante ao alumínio (Cateto Al 237/67) e outra suscetível (L53) mostrou alta herdabilidade no sentido amplo para CRRS ao nível de médias de famílias, (h^2_m = 95,6%) enquanto as herdabilidades ao nível de plantas individuais no sentido amplo (h^2_p) e no sentido restrito (h^2_r) mostraram valores mais baixos (49,2% e 32,8%), indicando que o uso de CRRS ao nível de média de famílias é um índice mais confiável do que CRRS obtido ao nível de plantas individuais (Martins *et al.*, 1999).

Malavolta *et al.* (1981) verificaram que o uso de solução nutritiva com 440 µM Al permitiu boa discriminação entre híbridos de sorgo. Por outro lado, Blamey *et al.* (1983) utilizando cultivar de sorgo altamente sensível ao alumínio, relataram que uma baixa concentração de alumínio na solução (5 µM) foi suficiente para reduzir em 10% o crescimento da cultivar estudada.

Existem várias maneiras de se utilizar a técnica de solução nutritiva para avaliação de genótipos. Pode-se utilizar solução nutritiva com todos os nutrientes, que recebe o nome de solução completa, ou solução mínima contendo apenas cálcio e boro. O parâmetro avaliado pode ser o desenvolvimento de raiz por um período contínuo na solução (completa ou mínima), com o nível de estresse de alumínio desejado ou esta mesma avaliação tomada em plântulas submetidas por um curto período ao estresse e depois colocadas em uma solução sem alumínio, onde se verifica sua capacidade de continuar crescendo raízes após eliminado o estresse. Outra maneira de se avaliar o efeito do alumínio no sistema radicular é o uso de coloração do mesmo com hematoxilina. Uma descrição destas várias possibilidades de avaliação da tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva segue abaixo.

6.3.1 SOLUÇÃO NUTRITIVA COMPLETA COM ALUMÍNIO

Neste teste, sementes são germinadas em papel de filtro embebido em água e, geralmente, 1 a 5 dias após a germinação (dependendo da espécie), os *seedlings* são transferidos para solução com pH entre 4 e 4,7, contendo níveis de alumínio apropriados para discriminar tolerância entre genótipos da espécie avaliada. É sugerido germinar-se cerca do dobro de sementes em relação ao número de plântulas desejado, de forma a permitir-se selecionar aquelas com crescimento inicial de raiz semelhante. O nível de alumínio a ser utilizado para a avaliação em algumas culturas é descrito por Polle *et al.* (1991). Estes autores mencionam níveis de 0,06 mM Al para cevada, 0,2 mM Al para trigo e 1,2mM Al para triticale e centeio. Magnavaca (1982) utilizou níveis de 0,22 mM Al para milho. O nível ou dose de Al depende da solução nutritiva que será utilizada. Em todos os experimentos é utilizado um controle sem alumínio. O crescimento inicial da raiz seminal é medido antes do início do ensaio e cerca de dois a sete dias após permanecer na solução nutritiva. O critério de seleção utilizado em geral é uma relação entre o crescimento da raiz na solução com alumínio e o crescimento da mesma na solução sem alumínio. Alves, V.M.C & Kochian, L. (Comunicação pessoal) verificaram que houve correlação positiva e significativa entre tolerância ao alumínio e acumulação de Al em ápices de raízes de milho. Até oito horas de exposição ao Al, o conteúdo deste elemento nos ápices radiculares foi semelhante entre as cultivares sensível e tolerante (Figura 3). Entretanto, após esse

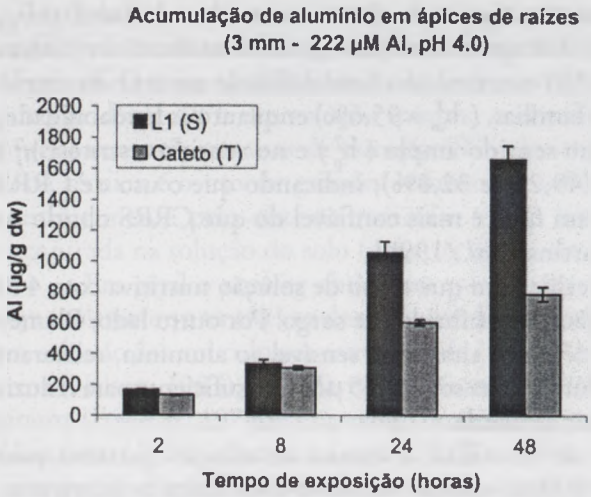


FIGURA 3. Tempo de exposição ao alumínio necessário para discriminar um genótipo de milho tolerante (Linhagem Cateto Al 237/67) e uma linhagem sensível, baseado na acumulação de alumínio no ápice radicular (Alves *et al.*, 1999).

período o conteúdo de Al no ápice das raízes da cultivar sensível foi muito superior ao da tolerante, sugerindo um mecanismo indutivo de tolerância ao alumínio em milho. Resultados semelhantes foram obtidos por Vazquez *et al.* (1999). Estes resultados indicam que, ao contrário do que ocorre em trigo, onde os efeitos de inibição do crescimento radicular após exposição ao alumínio são quase imediatos, o milho necessita de um período de adaptação (entre 8 e 24 horas) para expressar sua tolerância. Isto explica a utilização de técnicas de avaliação por um período mais longo em milho (cinco a sete dias sob exposição ao alumínio), enquanto solução mínima de cloreto de cálcio e tempo curto de exposição ao alumínio (um a dois dias) têm sido utilizados para *screening* em trigo.

6.3.2 SOLUÇÃO MÍNIMA CONTENDO CÁLCIO E BORO

O método da solução mínima baseia-se na premissa de que, durante o período imediatamente posterior à germinação, a plântula tem sua necessidade nutricional suprida pelas reservas contidas na semente e apenas a toxidez causada por alumínio ou ainda deficiência de cálcio ou boro limitariam o crescimento da plântula nesta fase (Karr *et al.*, 1983; Wright *et al.*, 1989). Estes ensaios são de curta duração (dois a quatro dias) utilizando solução contendo níveis tóxicos de alumínio e, ainda, cloreto de cálcio e boro. Esta metodologia pode ser realizada de duas maneiras: a) avaliar-se o crescimento radicular após certo tempo de exposição a solução com alumínio; b) utilizar avaliação conhecida como *pulse and phase* onde a plântula é submetida a um período curto de estresse e depois de retirada da solução com alumínio, avalia-se a capacidade da mesma de prosseguir seu crescimento de raiz. Nesta última metodologia, em geral a plântula permanece na solução com alumínio por um período de 48 horas, seguido de um período de recuperação de 72 horas em solução sem alumínio. Estes ensaios podem ser feitos utilizando-se diferentes concentrações de alumínio na solução e determinando-se aquela que causa danos permanentes e irreversíveis ao tecido meristemático da raiz, inibindo crescimento do mesmo na solução sem alumínio.

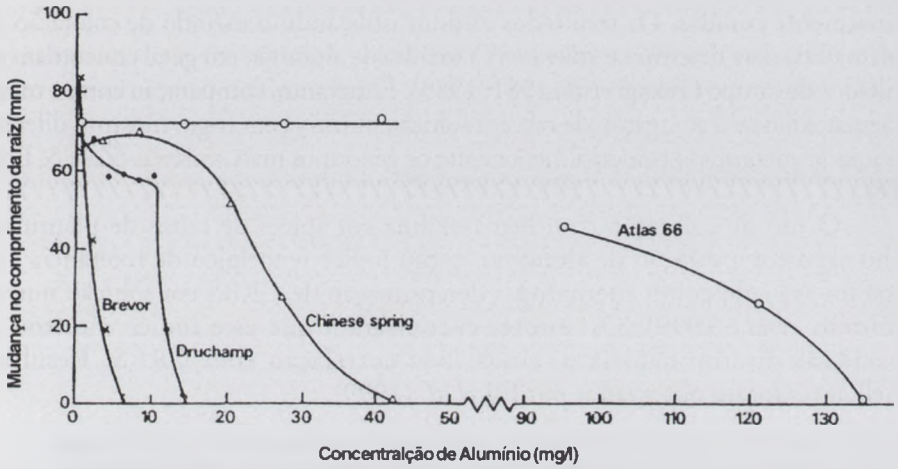


FIGURA 4. Nível de alumínio na solução nutritiva capaz de causar dano irreversível ao ápice radicular de quatro cultivares de trigo (Adaptado de Howeler, 1991).

Moore *et al.* (1976) classificaram genótipos de trigo em quatro classes de tolerância ao alumínio utilizando metodologia do tipo *pulse and phase*. Os autores reportam que o nível de alumínio na solução capaz de causar dano irreversível ao ápice radicular foi determinado para cada cultivar. Na Figura 4, pode-se ver os resultados para quatro cultivares de trigo com diferentes níveis de tolerância, a cultivar Brevor (sensível ao alumínio) não reinicia seu crescimento radicular quando exposta a 6 mg de Al por litro. A cultivar Chinese Spring, intermediário para tolerância ao alumínio tem este efeito com 42 mg de Al por litro. A cultivar altamente tolerante Atlas 66 precisa ser exposta a 135 mg de alumínio por litro para ter dano irreversível no seu ápice radicular.

6.3.3 COLORAÇÃO DE RAÍZES COM HEMATOXILINA

O método de coloração de raízes com hematoxilina é uma variação do chamado método do tipo *pulse and phase*, onde a capacidade do genótipo de recuperar seu crescimento de raiz após exposto ao alumínio é determinada avaliando-se o grau de coloração do ápice radicular, conforme descrito por Polle *et al.* (1978a, b). A base teórica deste método reside no fato de que o alumínio age como um agente ligante com a substância denominada hematein que é um componente oxidado da solução de hematoxilina (Gill *et al.*, 1974). A região da raiz corada pela hematoxilina coincide com a região de elongação da raiz, que no caso de trigo está localizada cerca de 2 mm acima do ápice da raiz (Tomos *et al.*, 1989). As partes mais velhas da raiz não acumulam alumínio e não são coradas. Em genótipos suscetíveis ao alumínio, a região próxima ao ápice radicular mostra-se intensamente corada pela hematoxilina. Em cultivares tolerantes ao alumínio, as células da raiz elongam-se normalmente e não são coradas pela hematoxilina, sendo que nestes genótipos às vezes apenas observa-se uma pequena mancha na região da raiz que estava em elongação no momento em que a raiz é colocada na solução com hematoxilina. As plântulas com coloração incompleta pela hematoxilina ou não coradas pela mesma, irão recobrar seu desenvolvimento radicular se transferidas para um meio sem alumínio, o que não irá ocorrer com as plântulas

intensamente coradas. Os resultados obtidos utilizando o método de coloração com hematoxilina para determinar tolerância à toxidez de alumínio em geral concordam com resultados de campo (Takagi *et al.*, 1981; 1983). Entretanto, comparação entre o método da hematoxilina e a elongação de raiz em solução nutritiva em trigo, mostrou diferenças no ranking encontrado principalmente entre os genótipos mais sensíveis (Zale & Briggs, 1988).

O uso de coloração com hematoxilina em ápices de raízes de plântulas de milho expostos a solução de alumínio, como índice fenotípico de tolerância a este metal foi avaliado como alternativa à determinação de CRRS em solução nutritiva (Cançado *et al.*, 1999). Os autores encontraram que este índice mostrou alta capacidade discriminatória e, ainda, boa correlação com CRRS. Resultados semelhantes foram observados por Pal *et al.* (1999).

6.4 USO DE CULTURA DE CÉLULAS; VARIAÇÃO SOMACLONAL; CULTURA DE ANTERAS; FUSÃO DE PROTOPLASTOS; PRODUÇÃO DE CALOSE E MUTAGÊNESE COMO TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO OU DE SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

Taylor (1991) ressaltou que a tolerância ao alumínio pode ser expressa ao nível celular e que células de plantas acumulam alumínio muito mais rapidamente em sistemas de cultura de células do que em raízes intactas ou em tecidos complexos.

Variação somaclonal tem sido utilizada como fonte de variabilidade e pressão de seleção causada por exposição a níveis tóxicos de alumínio e tem sido aplicada tanto no estágio de calo, como no de planta regenerada (Sint *et al.*, 1997). Os autores selecionaram *in vitro* calos de arroz submetidos a diferentes estresses de alumínio por um período de 20 dias. A transmissão do caráter de tolerância foi estudada nas gerações R_1, R_2, R_3 e R_4. Foram identificadas três linhagens que tiveram um aumento na percentagem de tolerância ao Al, após a quarta geração de autofecundação.

Variantes tolerantes ao Al, foram selecionadas *in vitro*, a partir de calos induzidos a partir de anteras e de embriões imaturos da cultivar de cevada sensível ao alumínio 'Zhaoshu 3' (Xu *et al.*, 1993).

Com o método de eletrofusão de protoplastos, foram produzidos híbridos somáticos assimétricos entre *Medicago sativa* e *Lotus pedunculatus* (*L. uliginosus*). Foi observada tolerância diferencial ao Al *in vitro*, para o híbrido. Aproximadamente 900 de um total de 4600 colônias de híbridos somáticos, demonstraram taxa de crescimento e morfologia normal no meio contendo Al, indicando a transferência de tolerância ao Al de *Lotus pedunculatus* para *Medicago sativa* (Stoutjesdijk *et al.*, 1995).

Dornelles *et al.* (1997) cultivaram embriões imaturos de trigo de cinco genótipos, diferindo para tolerância ao Al, e seus híbridos F_1 *in vitro*. As populações F_2, obtidas de sementes ou de culturas de tecido, foram cultivadas em solução contendo 10 ppm de Al. Na avaliação das populações F_2, foi observada a existência de variação somaclonal para tolerância ao Al nas plantas derivadas de cultura de tecidos.

Diversos trabalhos demonstram que a síntese de calose está diretamente correlacionada com a concentração interna de alumínio e negativamente correlacionada com a elongação de raízes (Horst *et al.*, 1997; Massot *et al.*, 1999).

Kaneko *et al.* (1999) trabalhando com cevada observaram produção de calose após 50 min de tratamento com 37 μM de Al. Ao mesmo tempo verificaram que o crescimento de raiz paralisou completamente. Entretanto, Larsen *et al.* (1996) em estudos utilizando mutantes de arabidopsis, não encontraram ligação entre produção de calose e inibição do crescimento de raiz causado pelo alumínio. Horst (1999) reportou correlação negativa e significativa entre produção de calose em 22 genótipos de milho do Brasil e da África e crescimento de raiz seminal em solução nutritiva com alumínio destes genótipos.

Camargo *et al.* (1995) usando irradiação gamma (27,5 Krad) em uma população F_4 obtida do cruzamento entre *Triticum aestivum* cv. BH1146 e *T. durum*, híbrido Anhinga x Winged S, obtiveram 23 linhagens de trigo. A tolerância ao Al, foi verificada em solução nutritiva contendo Al. Todas as linhagens testadas, com exceção das linhagens 9 e 15, foram tolerantes ao Al.

Ainda, Camargo *et al.* (1997) reportaram que, 16 linhagens mutantes de trigo tolerantes à toxidez de alumínio em solução nutritiva foram derivadas via seleção feita numa população obtida via irradiação gama (260 e 310 Gy) feita na cultivar de trigo Anahuac, sensível a toxidez de alumínio. As linhagens mutantes e as cultivares controles Anahuac, IAC-24 e IAC-60 foram avaliadas para produção de grãos e tolerância a solos ácidos em duas localidades (um solo ácido e um solo corrigido) em 1995/96. No solo ácido de Capão Bonito, 15 linhas mutantes foram mais produtivas que o controle Anahuac sensível à toxidez de alumínio e não se observou diferença entre os genótipos no solo corrigido. Foi concluído que a irradiação gama foi eficiente para selecionar linhagens mutantes com maior tolerância à toxidez de alumínio e mantendo o potencial produtivo da cultivar sensível Anahuac.

7. GENÉTICA DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

Devido ao número de rotas bioquímicas envolvidas na tolerância a estresses minerais, é esperado que diferentes genes devam estar envolvidos na tolerância a diferentes estresses minerais e também em diferentes níveis de um mesmo estresse (Little, 1988). Resposta diferencial de plantas a estresses minerais tem sido amplamente relatadas na literatura (Millikan, 1961; Butler *et al.*, 1962; Rorison, 1969; Brown *et al.*, 1972; Barber 1976; Wegrzyn *et al.*, 1980; Saric, 1981).

Garvin (1998) mencionou que a genética da tolerância ao alumínio abrangeria os seguintes tópicos: a) herança da tolerância ao alumínio em cruzamentos contrastantes; b) tipo de ação gênica associada com os genes de tolerância; c) diversidade de genes e alelos para tolerância ao alumínio; d) estudo da existência ou não de efeitos citoplasmáticos. O autor menciona ainda que o estudo de relação entre genes e mecanismos de tolerância e a conservação de genes de tolerância ao alumínio entre espécies relacionadas também deveriam ser incluídas neste estudo, principalmente com o advento das novas técnicas de biologia molecular.

A maioria dos estudos de herança da tolerância ao alumínio tem sido conduzida em trigo e nesta cultura estes estudos apontam na direção de que um pequeno número de genes controlariam esta característica, baseado em distribuição bimodal de fenótipos com segregação do tipo 3:1 para tolerância/sensibilidade geralmente encontrada (Kerridge & Kronstad, 1968; Riede & Anderson, 1996;

Somers *et al.*, 1996). Outros estudos sugerem que tolerância ao alumínio nesta espécie seja controlada por dois ou três genes (Camargo, 1981; Aniol, 1991; Berzonsky, 1992). Tolerância ao alumínio tem sido estudada também em outras gramíneas, mas em menor intensidade que em trigo, e uma grande variação de tipos de herança tem sido encontrada. Por exemplo, herança monogênica e digênica tem sido relatada em cevada e centeio, respectivamente (Minella & Sorrells, 1992; Gallego & Benito, 1997), enquanto em milho tem sido encontrada herança poligênica (Magnavaca, 1982; Lima *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1997). Resultados de estudo de herança da tolerância ao alumínio em várias culturas são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3. Herança da tolerância à toxidez de alumínio em diversas culturas.

Cultura (Espécie)	Genes para tolerância	Tipo de avaliação	Referências
Aveia (*Avena sativa*)	1 a 2 dominantes	Recresc. de raiz	Sanchez-Chacon (1998); Wagner (1999)
Cevada (*Hordeum vulgare*)	1 dominante	Hematoxilina	Minnela & Sorrells (1997)
	Mongênica a poligênica	Crescimento raiz	Xu *et al.* (1993)
	Monogênica	-	Reid citado por Garvin (1999)
Arroz (*Oriza sativa*)	Poligênica aditiva	Índice de 0 a 1	Wu *et al.* (1997)
	Poligênica aditiva	Crescimento raiz	Khatiwada *et al.* (1996)
	Poligência aditiva	Crescimento raiz e massa seca	Ferreira *et al.* (1988)
	Poligênica (tolerân. Foi dominante)	Crescimento raiz	Ferreira *et al.* (1997)
Centeio (*Secale cereale*)	1 a 2 dominantes	Recrescimento de raiz	Gallego & Benito (1997)
	Monogênica	-	Chrzastek *et al.* (1995)
Trigo (*Triticum aestivum*)	Monogênica dominante	Recrescimento de raiz	Lagos *et al.* (1991)
	Monogênica dominante	Recrescimento de raiz	Camargo (1981)
	2 aditivos	Índice 1a 10, avaliação a campo	Nodari *et al.* (1982)
	2 dominantes ou 1 recessivo	Crescimento de raiz	Rajaram *et al.* (1991)
	Monogênica dominância incompleta	Coloração com hematolina	Wheller *et al.* (1992)
	2 a 3 dominantes	-	Aniol (1997)
	1 dominante	Hematoxilina	Jonhnson *et al.* (1997)
	Monogênica	-	Luo & Dvorak (1995)
	2 genes	-	Sorrells *et al.* (1996)
	Monogênica	-	Delhaize *et al.* (1993)
	1 dominante	Crescim. de raiz	Basu *et al.* (1997)
Sorgo (*Sorghum bicolor*)	1 dominante	Crescim. de raiz	Schaffert *et al.* (2000)
	Poligênica	Núm. raízes -solo	Flores *et al.* (1990)
Milho (*Zea mays*)	Monogência	Crescim. de raiz	Rhue *et al.* (1978)
	Poligência	Crescim. de raiz	Magnavaca (1987b)
	Poligência	Cresc. de raiz	Lima *et al.* (1995)
	Monogênica	Escala visual	Moon *et al.* (1997)
Alfafa (*Medicago*)	Poligênica	Massa seca	Campbell *et al.* (1993)
Soja (*Glycine max*)	Poligênica aditiva	Crescimento raiz	Spehar (1996); Bianchi-Hall *et al.* (1998).

Adicionalmente a existência de genes maiores conferindo grande variação para tolerância ao alumínio, existem evidências sugerindo que genes modificadores podem ter papel importante em modular o efeito de genes maiores de tolerância. Por exemplo, Delhaize *et al.* (1993a) e Jonhson *et al.* (1997) relataram que uso de metodologia de retrocruzamento para transferência de gene de tolerância ao alumínio a partir de um pai doador tolerante para um genótipo sensível não foi efetiva, sugerindo ou a existência de genes menores ou a existência de genes no pai sensível que reduziram a ação do gene maior transferido a partir do pai doador tolerante.

Quanto ao modo de ação gênica, em geral tolerância ao alumínio tem sido reportada como característica dominante (Kerridge & Kronstad, 1968; Somers *et al.*, 1996). Entretanto, vários estudos discutidos abaixo demonstraram que tanto o número de genes quanto o modo de ação gênica encontrado pode variar de acordo com o nível de alumínio utilizado na solução. Por exemplo, Polle *et al.* (1978a,b) utilizando um grande número de populações de cevada obtidas a partir de cruzamentos entre parentais com diversos níveis de tolerância ao alumínio, avaliaram estas populações segregantes sob diferentes níveis de alumínio e encontraram padrão de segregação consistente com herança dominante, codominante ou recessiva, simplesmente alterando o nível de alumínio na solução. Garvin (1998) mencionou que uma interpretação razoável destes resultados seria de que efeitos de dose gênica deveriam ser um componente importante na ação de genes de tolerância ao alumínio, indicando ser importante avaliar a tolerância em diversos níveis de alumínio. Em trigo, mudanças de modo de ação gênica de tolerante para recessivo foi encontrado por Camargo (1984). Já Delhaize *et al.* (1993a) encontraram que tolerância ao alumínio conferida pelo gene *Alt1* em trigo tem-se mostrado dominante através de uma gama de níveis de alumínio, baseada em resultados semelhantes de tolerância encontrado entre *Alt1* homozigotos e heterozigotos.

Em geral não tem sido verificado efeito materno ou citoplasmático na herança da tolerância ao alumínio (Reid, 1971; Lafever & Campbell, 1978; Rhue *et al.*, 1978; Aniol, 1991; Salazar *et al.*, 1997).

Com o advento e evolução das técnicas de mapeamento de genomas entre diversas espécies, estudos de conservação de seqüências de genes ao longo do cromossomo entre espécies relacionadas (sintenia) tem sido possíveis (Gale & Devos, 1998). Uma questão que poderá vir a ser respondida com estes estudos é se os mesmos genes seriam responsáveis por tolerância ao alumínio em diferentes espécies ou se cada espécie teria genes únicos para esta característica. Existem hoje evidências de uma possível conservação de alguns genes de tolerância ao alumínio entre espécies. Por exemplo, Riede & Anderson (1996) identificaram marcadores de RFLP ligados a um gene maior de tolerância ao alumínio em trigo (*AltBH*) que foi mapeado no braço longo do cromossomo 4D, enquanto em centeio, Gallego & Benito (1997) encontraram evidência da existência de um gene de tolerância ao alumínio numa região do cromossomo 4 que guarda sintenia com o cromossomo 4D do trigo. Recentemente, Garvin D. e colaboradores (Comunicação pessoal) demonstraram que um gene maior de tolerância ao alumínio em cevada, denominado *Alp* é provavelmente ortólogo ao gene de trigo *AltBH*, baseado na posição de uma série de marcadores moleculares comuns utilizados nos dois genomas.

Na Tabela 3 encontra-se um sumário de alguns dados de estudos de herança da tolerância ao alumínio obtidos em várias culturas, utilizando diferentes técnicas de avaliação e diferentes características como critério de avaliação da tolerância.

Muitas são, contudo, as variáveis que podem influenciar os resultados desses estudos genéticos e assim dificultar a comparação dos mesmos dentro e entre espécies a fim de elucidar os possíveis mecanismos de tolerância existentes. Abaixo são discutidos alguns desses aspectos para melhor compreensão do estado atual do conhecimento sobre a genética dessa característica.

7.1 FATORES AFETANDO RESULTADO DE ESTUDOS DE HERANÇA DA TOXIDEZ DE ALUMÍNIO

O método utilizado para avaliar tolerância ao alumínio pode influenciar os resultados da herança da característica. O método mais freqüentemente utilizado nestes estudos tem sido a avaliação de crescimento ou recrescimento de raízes de plântulas em solução nutritiva com níveis tóxicos de Al^{+++} (Tabela 3). Essa metodologia tem sido utilizada em estudos com trigo (Camargo, 1981), arroz (Ferreira *et al.*, 1997), centeio (Gallego & Benito, 1997), aveia (Chacon-Sanchez, 1998; Wagner, 1999) e milho (Magnavaca, 1982; Lima *et al.*, 1995). O método de coloração de raízes com hematoxilina tem sido utilizado por exemplo em cevada (Minella & Sorrells, 1992). Enquanto o método da hematoxilina é de avaliação qualitativa dividindo os genótipos em três grupos (com, sem e com coloração parcial de raízes), o crescimento de raízes é avaliado em escala métrica e pode apresentar distribuição contínua de valores, como verificado em estudo com arroz (Ferreira *et al.*, 1997) e milho (Torres *et al.*, 1997) ou permitir a separação dos genótipos em classes descontínuas, como verificado em trigo (Camargo, 1984), aveia (Chacon-Sanchez, 1998; Wagner, 1999) e sorgo (Schaffert *et al.*, 2000). A análise genética da característica é passível, contudo, de ser influenciada pela escala e método de avaliação.

A concentração de alumínio utilizada nos estudos de herança genética varia significativamente em função do nível de tolerância intrínseco das diferentes espécies. Assim, a cevada está entre os cereais mais sensíveis ao efeito tóxico do alumínio, seguida de trigo e centeio (Tabela 1). Por outro lado, para discriminar genótipos tolerantes e sensíveis em arroz e aveia, níveis de 20 ppm ou mais de Al^{+++} são utilizados. A concentração de alumínio pode influenciar os resultados da análise genética como demonstrado por Camargo (1981; 1984) em trigo. Em seus estudos, o autor observou que a mudança de três para seis ppm de alumínio na solução revelou diferenças na proporção genética observada em populações segregantes de um mesmo cruzamento. Enquanto que a 3 ppm foi observada segregação de 15 indivíduos tolerantes para um suscetível na progênie segregante do cruzamento BH1146 x Atlas 66, a mesma progênie segregou 12:4 na avaliação com 6ppm de alumínio, indicando que houve uma quebra gradual de dominância com o aumento da concentração de alumínio. Esses resultados alertam para o fato de que a herança genética desta característica deve ser cuidadosamente interpretada em função do nível de Al presente em solução e a comparação entre espécies pode ser dificultada pelo variável grau de sensibilidade entre as mesmas.

Outro trabalho visando verificar o efeito de níveis de saturação de alumínio no solo e em solução nutritiva sobre os resultados obtidos em estudo de tolerância ao alumínio em trigo são relatados por Bona *et al.* (1994). Os autores utilizaram dois solos com alta saturação de alumínio e solução nutritiva com cinco níveis de alumínio (0,09; 0.18; 0,36; 0,72; e 0,90 mM Al). Foram avaliadas progênies F_2 obtidas de dois conjuntos de cruzamentos do tipo tolerante x suscetível (Cardinal x Zombor e Becker x Kincso). Nos ensaios em solo, a F_2 obtida do cruzamento Cardinal x Zombor mostrou herdabilidade para comprimento de raiz seminal de 0,60 e grau de dominância (d) de raízes longas sobre raízes curtas de 0,98. No cruzamento Becker x Kincso, a herdabilidade foi próxima à encontrada no cruzamento anterior (0,57), mas a característica mostrou-se de herança principalmente aditiva, com d = 0,07. Já os ensaios em solução nutritiva mostraram que a freqüência de indivíduos suscetíveis nos dois cruzamentos aumentou com o aumento do nível de alumínio na solução, indicando que a hipótese de herança monogênica em trigo deve ser considerada somente dentro de certos níveis de alumínio na solução.

A seguir são descritos estudos de herança da tolerância ao alumínio em diversas culturas.

7.2 HERANÇA DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

7.2.1 TRIGO

Como mencionado no início deste capítulo, a maioria dos trigos brasileiros com alto nível de tolerância ao alumínio descende de alguma maneira da cultivar Polyssu (De Souza,1998). Baseado em análise de *pedigree*, a cultivar BH1146 que está entre os genótipos de trigo brasileiros com maior grau de tolerância ao alumínio herdou um gene maior para tolerância ao alumínio da cultivar Polyssu (Garvin, 1999). Por outro lado, a tolerância ao alumínio na cultivar de trigo Atlas 66 apesar de também poder ter sido derivada da cultivar Polyssu,existe evidência que "Atlas 66" possui dois genes para tolerância ao alumínio (Camargo, 1981; Berzonsky, 1992).

Alguns genes para tolerância ao alumínio estão bem caracterizados ao nível de localização cromossômica na espécie e identificação de marcadores de DNA associados a eles. Esse é o caso dos genes presentes nos genótipos de trigo 'BH1146' e 'Atlas 66', identificados pela segregação de progênies do cruzamento desses com genótipos sensíveis ao alumínio, revelando ao menos um gene dominante distinto em cada genitor tolerante (Camargo, 1981). Nodari *et al.* (1982) relatam que a cv. BH1146 possui dois genes independentes para a tolerância ao alumínio de efeito aditivo sob condições de campo. Outro estudo indica a presença de dois ou três genes para tolerância, dependendo da concentração de alumínio (Aniol, 1990).

Estudos de genética da tolerância ao alumínio em trigo conduzidos por Camargo (1981, 1984) encontraram um gene dominante nas cultivares BH1146 e C3 e dois genes dominantes em 'Atlas 66' quando a solução nutritiva continha 3 ppm de Al. Com solução nutritiva com 10 ppm de alumínio a tolerância de 'C3' passa a ser recessiva. Herança da tolerância ao alumínio em 'Atlas 66' foi também estudada por Choudhry (1978) e Campbell & Lafever (1981), com resultados diferentes dependendo do outro genitor utilizado no cruzamento e das condições do ensaio.

Apesar da discordância dos resultados, provavelmente devido às diferentes condições dos experimentos, aceita-se que existe ao menos um gene dominante na cultivar BH1146.

O gene dominante para tolerância ao alumínio existente na cultivar BH1146 foi localizado no cromossomo 4D através da análise monossômica (Lagos *et al.*, 1991).

Utilizando linhas de substituição, Luo & Dvorak (1996) também localizaram um gene de tolerância ao alumínio no cromossomo 4D presente na cultivar Chinese Spring em *Triticum aestivum* e no cromossomo 4B em *Triticum turgidum*. Não existem dados para identificar se o gene presente em 'Chinese Spring' corresponde ao loco de 'BH1146', apesar dos autores especularem que esta seja uma possibilidade.

O gene presente em 'Atlas 66', que difere daquele de 'BH1146', foi localizado no cromossomo 5D através do uso de uma série de linhas de substituição em trigo (Prestes *et al.*, 1975).

Linhas semi-isogênicas para tolerância ao alumínio foram obtidas a partir da cultivar tolerante Atlas 66 (pai doador), cruzado com as cultivares sensíveis Chisholm e Century (Carver et al, 1993). Duas linhas semi-isogênicas tolerantes ao alumínio, denominadas 'Chisholm-T' e 'Century-T' foram avaliadas em solução nutritiva com níveis de alumínio de 0, 10, 20 e 30 µM (Garvin, 1999). Os dados de crescimento relativo de raiz seminal deste experimento podem ser visto na Figura 5. Os resultados indicam que no nível de 10 µM de alumínio, as linhas semi-isogênicas tolerantes tiveram o mesmo comportamento do pai doador ('Atlas 66'). Já no nível mais alto de alumínio (30 µM), elas mostraram nível de tolerância intermediário entre o pai doador tolerante e os pais recorrentes suscetíveis ao alumínio. O autor concluiu que este fato suporta a hipótese de que pelo menos dois genes maiores para alumínio devem existir na cultivar de trigo Atlas 66.

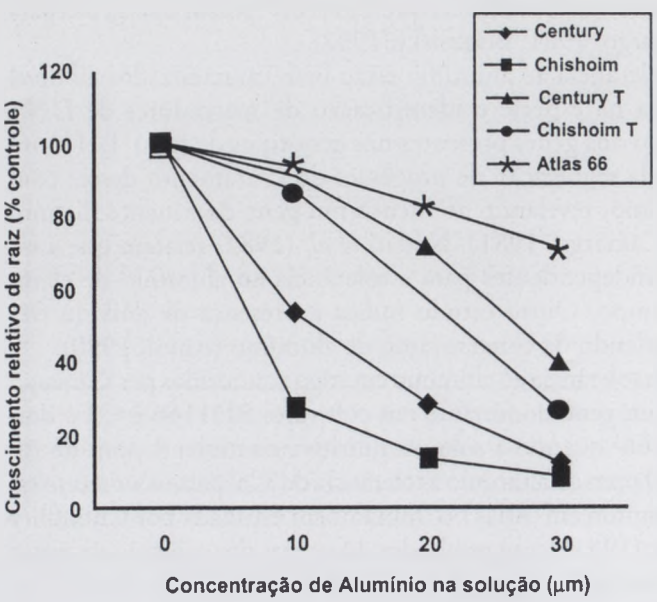


FIGURA 5. Crescimento relativo de raiz seminal em quatro níveis de alumínio na solução nutritiva, para uma cultivar de trigo utilizada como genitor tolerante (Atlas 66), os genitores sensíveis (Chisholm e Century) e duas linhas semi-isogênicas (Century T e Chisholm T) obtidas do cruzamento do genitor tolerante com cada um dos dois genitores sensíveis. Dados mostraram transferência incompleta da tolerância ao alumínio via retrocruzamento a partir de Atlas 66 para as duas linhas semi-isogênicas, com o aumento do teor de alumínio na solução. (Adaptado de Garvin, 1999).

O efeito do *background* genético de trigo *hard red winter* (HRW) sobre a ação de um gene de tolerância oriundo da cultivar de trigo Atlas 66 foi estudado por Johnson *et al.* (1997). Isolinhas de trigo HRW, tolerante ao Al, foram selecionadas com auxílio do teste da hematoxilina, usando 'Atlas 66' como fonte de tolerância. A segregação para o teste da hematoxilina nas populações derivadas do cruzamento entre as isolinhas tolerantes ao Al ('Chisholm' e 'Century') com seu genitor recorrente, indicam a existência de um único gene, dominante, que foi transferido a partir de 'Atlas 66'. Os dados de CRRS foram concordantes com os dados preditos pelo teste da hematoxilina. Cada isolinha tolerante ao Al, apresentou um declínio linear no comprimento relativo da raiz com o aumento da concentração de Al na solução (90 µM a 720 µM de Al), enquanto isolinhas sensíveis ao Al e os genitores recorrentes apresentaram um declínio curvilíneo agudo. As isolinhas tolerantes ao Al, superaram seu genitor recorrente em 19% (Chisholm) e 38% (Century) no CRRS. O teste da hematoxilina, possibilitou identificar um gene dominante que confere aumento no crescimento radicular, em resposta ao Al.

Por meio de um programa de retrocruzamento, foi transferida resistência ao Al, a partir da cultivar tolerante Maringá para a cultivar sensível Katepwa (Basu *et al.*, 1997). No terceiro estágio de retrocruzamento, uma única isolinha resistente (Alikat = Katepwa*3/Maringá), foi obtida com base nos resultados de crescimento radicular de plântulas cultivadas em solução nutritiva contendo Al. Análise genética das linhagens duplo-haplóide (DH) desenvolvidas a partir desta isolinha, sugere que a tolerância é controlada por um único gene dominante. Cruzamentos entre DH Alikat e DH Katepwa produziram uma população F_1 tolerante ao Al. Retrocruzamento desta população F_1 com DH Katepwa produziu uma população com segregação para tolerância ao Al de 1:1, que quando autofecundada, produziu uma população segregante para tolerância ao Al de 3:1. Em condições de estresse de Al, plantas tolerantes ao Al da população F_2, liberaram um polipeptídeo de baixo peso molecular na rizosfera. Um destes polipeptídeos de 23 KDa, demonstrou capacidade para ligar-se ao Al e segregou com o fenótipo tolerante.

Gustafson (1984) trabalhando com nulissômicos, tetrassômicos e linhas ditelossômicas de 'Chinese Spring' com substituição de centeio localizaram genes para tolerância ao alumínio nos seguintes braços cromossômicos: 6AS, 7AS, 2DL, 4DL, 4BL, 7DL em trigo e 6RS, 3R e 4R em centeio.

Rajaram *et al.* (1991) estudaram a base genética da tolerância ao alumínio em três populações F_2 de trigo, provenientes de cruzamentos do tipo tolerante x suscetível envolvendo genitores brasileiros e genitores do programa do CIMMYT. Os autores concluíram que a tolerância foi explicada pela presença de dois genes dominantes em um dos pais e um gene recessivo nos outros dois genitores.

Progênies F_3 do cruzamento entre as cultivares de trigo Waalt (tolerante ao alumínio) e Warigal (suscetível ao alumínio) foram avaliadas em solução nutritiva com alumínio em períodos de exposição ao alumínio de três dias e de quatro semanas, e a técnica de coloração de ápices radiculares com hematoxilina foi utilizada como critério de avaliação (Wheeler *et al.*, 1992b). A exposição por quatro semanas permitiu discriminar melhor entre genótipos sensíveis e tolerantes. As famílias F_3 foram separadas em um grupo tolerante e outro sensível ao alumínio. A relação produção

de massa seca de parte aérea por massa seca de raiz também discriminou os grupos tolerantes e sensíveis, enquanto estas duas variáveis analisadas separadamente ou o comprimento de raiz seminal após três dias ou após quatro semanas, não conseguiram discriminar os dois grupos de famílias F_3. Dentro do grupo de famílias F_3 tolerantes, comprimento de raiz seminal foi significativamente correlacionado com peso de raiz e peso de parte aérea, entretanto estas correlações foram não significativas dentro do grupo de F_3 sensíveis ao alumínio. Baseado no padrão de segregação observado, os autores concluíram que a tolerância ao alumínio em trigo é controlada por um gene com dominância incompleta

Aniol (1997) em cruzamentos realizados para incorporar genes de tolerância ao Al de uma cultivar brasileira de trigo de primavera (BH1146) para trigo de inverno, observou que a tolerância ao Al é um caráter dominante. A maioria da variabilidade observada, deve ser explicada pela presença de dois ou três pares de genes, com cada gene afetando a mesma característica e possuindo dominância completa.

O melhoramento de plantas convencional tem melhorado a tolerância do trigo ao estresse causado pelo Al. Entretanto, a variabilidade genética é limitada. Correspondentes silvestres do trigo são um valioso *pool* de genes para a introdução de variação genética. A espécie silvestre *Aegilops uniaristata* (2n=2x=14, NN) foi utilizada como fonte de tolerância a Al. A partir do cruzamento entre *A. uniaristata* com trigo, ficou bem caracterizado que o cromossomo 3N confere tolerância ao alumínio em trigo (Miller *et al.*, 1997). Três linhagens, em que o cromossomo 3N substituiu os cromossomos homólogos de trigo, 3A, 3B ou 3D, foram produzidas. O cultivo das plantas em solução nutritiva com elevada concentração de Al, confirmou que o cromossomo 3N é responsável por conferir tolerância às linhagens. Os autores reportam que, posteriormente, o cromossomo 3N recombinou com o cromossomo homólogo de trigo e transferiu para o cromossomo de trigo, apenas um pequeno segmento que carrega o(s) gene(s) para tolerância, mas não os genes sem interesse agronômico.

Sapra *et al.* (1979) avaliaram crescimento de raiz em solução nutritiva com 0 e 8 ppm de Al para genótipos de trigo, centeio e triticale tanto diplóides quanto tetraplóides. Os autores concluíram que o genoma A confere alto nível de sensibilidade ao alumínio, enquanto o oposto ocorre com os genomas B e R. O genoma E de *Agropyron elongatum* também confere alto nível de suscetibilidade.

7.2.2 CEVADA, CENTEIO E AVEIA

Em cevada, um gene de tolerância ao alumínio presente na cultivar Dayton, foi localizado no cromossomo 4 (Minella & Sorrells, 1997). Em trabalho recente conduzido na Universidade de Cornell (EUA), Altermann e colaboradores (Comunicação pessoal) identificaram que este gene é possivelmente um homeólogo do gene presente em trigo em 'BH1146' através de mapeamento comparativo.

Avaliação em larga escala para tolerância ao alumínio feito em 3.871 cultivares de cevada, encontrou 315 cultivares com boa tolerância ao alumínio (Xu *et al.*, 1993). Os autores reportam controle gênico variando de herança monogênica a poligênica, dependendo da cultivar utilizada como fonte de tolerância.

Em centeio, ao menos dois genes dominantes para tolerância foram identificados na cultivar Ailés. A associação desses genes com locos isoenzimáticos os posiciona no braço longo do cromossomo 6R (Gallego & Benito, 1997).

Chrzastek *et al.* (1995) analisando 9 linhagens de centeio-trigo (cruzamento do trigo 'Grana' com centeio 'Dankwskie Zlote') em solução nutritiva contendo 4 ppm de Al, observaram que as linhagens com os cromossomos (ou braços dos cromossomos) 3R, 3RS e 2R de centeio, possuíam alta tolerância ao Al. Os resultados demonstram que o braço curto do cromossomo 3R carrega um gene de tolerância ao Al.

Cultivares contendo a translocação 1BL.1RS de trigo *(Triticum aestivum)*-centeio (*Secale cereale*) são consideradas como possuindo maior nível de tolerância ao alumínio, entretanto não se sabe se esta tolerância é devida a genes no segmento 1RS ou genes no genoma do trigo. Linhas semi-isogênicas de trigo do tipo *soft red winter* contendo a translocação acima foram avaliadas em solução nutritiva com 1 mg Al/l (Mc Kendry *et al.*, 1996). Os autores concluíram pela não existência de gene para tolerância ao alumínio nesta translocação e sugerem que dados anteriores reportando este fato provavelmente se devem a existência de outros genes maiores de tolerância ao alumínio no genoma de trigo.

Em aveia, um a dois genes dominantes para a tolerância foram identificados (Chacon-Sanchez, 1998; Wagner, 1999). O mapeamento e a localização cromossômica desses genes estão em andamento na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

7.2.3 ARROZ

Em arroz, tolerância ao alumínio tem sido considerada característica de herança poligênica com preponderância de efeitos aditivos.

Uma análise de dialelo incompleto foi conduzida para 56 progênies F_1 de arroz, derivadas de 8 genitores machos, cruzados com 7 genitores fêmeas que apresentam tolerância diferencial ao Al, baseada no crescimento da raiz em solução nutritiva contendo 1 mM de Al (Wu *et al.*, 1997). A capacidade geral de combinação (CGC) foi significativa tanto para os genitores machos, como para os genitores fêmeas. A CGC foi muito maior que a capacidade específica de combinação (CEC), indicando que os efeitos aditivos são mais importantes para a característica tolerância ao Al. Uma herdabilidade elevada foi observada (48%), indicando a possibilidade de ganho genético na seleção de genótipos tolerantes ao Al. Os autores relatam ainda que o comportamento de tolerância da progênie F_1, parece ser influenciado pelo genótipo sensível, sugerindo um efeito de dominância inconsistente.

Análise de um dialelo em arroz, revelou que elevado comprimento de raiz em solução contendo Al, é governada tanto por genes de efeito aditivo quanto genes com efeito de dominância, com preponderância para os genes de efeito aditivo. A característica exibiu dominância parcial e mostrou herança poligênica (Khatiwada *et al.*, 1996).

A cultivar tolerante ao Al 'Guapore' foi cruzada com a cultivar sensível ao Al 'IAC899' (Ferreira *et al.*, 1997). Após dez dias em solução nutritiva contendo 20 ppm de Al, os genitores, a população F_1, F_2 e retrocruzamentos, tiveram seu crescimento radicular avaliado. Os resultados indicaram que a tolerância ao Al é um caráter quantitativo. Médias dos F_1's, F_2's e retrocruzamentos, foram semelhantes a do genitor tolerante, indicando dominância do caráter tolerância a Al em arroz.

7.2.4 MILHO

Estudos de herança da tolerância ao alumínio em milho em solução nutritiva encontraram desde herança monogênica (Rhue *et al.*, 1978; Garcia Jr. & Silva, 1979), passando por característica controlada por dois genes complementares dominantes (Miranda *et al.*, 1984), até herança poligênica (Magnavaca, 1982; Magnavaca *et al.*, 1987a, b, c; Sawazaki & Furlani, 1987; Lima *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 1997).

Magnavaca *et al.* (1987b) avaliaram o comprimento relativo de raiz seminal em 6 gerações (P_1, P_2, F_1, F_2, RC_1, RC_2) em seis diferentes cruzamentos entre seis linhagens temperadas usando o modelo de Mather & Jinks (1971). Os autores encontraram os seguintes resultados: a) efeitos genéticos aditivos explicaram a maior parte da variância genética total, mas dominância foi significativa para cinco dos seis cruzamentos estudados; b) os efeitos epistáticos foram significativos em quatro dos seis cruzamentos, mas muito menos importantes que os efeitos aditivos ou de dominância; c) o padrão de segregação observado na geração F_2 foi contínuo e unimodal, típico de uma característica de herança quantitativa e indicou uma predominância de genes dominantes para suscetibilidade ao alumínio. Este dado demonstrou que tolerância ao alumínio em milho é uma característica quantitativa e que progresso utilizando seleção recorrente e seleção de tipos intermediários obtidos a partir de cruzamentos do tipo suscetível x tolerante pode ser atingido. Entretanto, os autores mencionam que, a grande diferença entre o nível de tolerância observado em linhagens temperadas e tropicais pode levar à especulação da existência de genes maiores para tolerância ao alumínio em linhagens de milho tropicais.

Moon *et al.* (1997) induziram variação somaclonal na progênie derivada da planta S1587, obtida a partir de calos do tipo I da linhagem Cat100-6, tolerante ao Al. Após cinco autofecundações, foram obtidas 14 famílias a partir do somaclone S1587, que demonstraram sintomas de toxidez por Al. A progênie mais sensível, S1587-17, foi cruzada com a linhagem Cat100-6. Análises de segregação da população F_2 e de um retrocruzamento com o genitor sensível, demonstraram padrão de segregação tolerante:sensível, típica de 3:1 e 1:1, respectivamente, indicando que a tolerância em Cat100-6 é controlada por um único gene, semidominante, denominado de *alm* 1.

Torres *et al.* (1997) avaliaram o CRRS em solução nutritiva com 6 ppm de alumínio de 1.544 plantas F_2 obtidas a partir do cruzamento entre duas linhagens contrastantes para tolerância ao alumínio e encontraram distribuição contínua, unimodal, típica de características de herança quantitativa.

Progênies de um cruzamento dialélico envolvendo oito linhagens de milho, (cinco tolerantes e três sensíveis ao Al), foram cultivadas em solução nutritiva contendo 4,5 ppm de Al (Lima *et al.*, 1995). As plantas foram analisadas para o comprimento da raiz, produção, altura da planta e altura de inserção da espiga no campo. Na análise de variância, tanto a CGC quanto a CEC, foram significativas. O quadrado médio da CGC apresentou maior magnitude que o quadrado médio da CEC para todas as características avaliadas, com exceção apenas para produção, sugerindo um maior efeito de genes aditivos no cruzamento. Os autores reportam também, um alto valor de heterose para o comprimento da raiz, sugerindo que o mesmo pode ter sido causado por interações não alélicas, devido à ação de genes deletérios.

Estimativas de componentes genéticos em populações de milho conduzidas em solos ácidos com alta saturação de alumínio têm sido feitas pelo programa de pesquisa do CIMMYT utilizando métodos como Delineamentos I e II da Carolina do Norte, dialelos e trialelos (Narro *et al.*, 1999). Um sumário destes resultados para cada um dos métodos utilizados segue abaixo: a) Delineamento I na população de milho SA3. Foram utilizadas 256 famílias de irmão completos formadas por 64 machos e 4 fêmeas dentro de cada macho, avaliadas em um solo fértil e três solos ácidos (Duque-Vargas *et al.*, 1994). Nos solos ácidos a variância genética aditiva (σ^2_A) foi de magnitude próxima da variância de dominância (σ^2_D) para rendimento de grãos (0,15 e 0,13, respectivamente) e que a interação σ^2_A x ambiente foi altamente significativa; b) Delineamento II na população SA4. Foram obtidas 160 progênies S_1 e cada *set* foi constituído pelos cruzamentos entre grupos de oito progênies (quatro utilizadas como macho e quatro como fêmea), num total de 20 *sets* com 16 cruzamentos por *set*. Os cruzamentos foram avaliados em 4 solos ácidos (Borrero *et al.*, 1995). Verificou-se que para rendimento de grãos em solo ácido, σ^2_D foi mais importante que σ^2_A e novamente observou-se alta interação σ^2_A x ambiente. A herdabilidade no sentido restrito para peso de grãos em solos ácidos foi de 35%; c) dialelo completo entre oito populações (CMS36, ETO, Tuxpeño, SA3, SA4, SA5, SA6 e SA7) mostrou inexistência de efeito materno para produção de grãos em solos ácidos (Salazar *et al.*, 1997); d) análise de médias de gerações envolvendo como genitores linhagens contrastantes para tolerância à acidez e alta saturação de alumínio, F_1, F_2, F_3, RC_1's, RC_2's, e autofecundação dos retrocruzamentos foram avaliadas em solos ácido e corrigido (Ceballos *et al.*, 1998). Para peso de grãos, tanto em solo ácido como não ácido os efeitos de dominância foram superiores aos efeitos epistáticos; e) análise de trialelos a partir de 50 linhagens da população SA8 agrupadas em 10 *sets* (cinco linhagens por *set*) sendo que em cada *set* foram gerados todos os cruzamentos simples e triplos possíveis entre o grupo de cinco linhagens. Os 100 híbridos simples e 300 híbridos triplos foram avaliados em sete solos ácidos com alta saturação de alumínio. Os efeitos de CGC e CEC para produção de grãos em solos ácidos foram altamente significativos, sendo observada uma superestimação dos efeitos de CGC. Os componentes de variância do tipo σ^2_{AD} e σ^2_{AA} explicaram 79% e 19% da variância genética, respectivamente, sendo ambos altamente significativos; a σ^2_A explicou menos de 2% da variância genética total.

7.2.5 SORGO

Tolerância ao alumínio em sorgo avaliada em solução nutritiva parece ser dominante e monogênica. Entretanto adaptação de sorgo a solos ácidos tem sido considerada característica poligênica, com herança principalmente aditiva (Ziegler *et al.*, 1995).

Três pares de linhas semi-isogênicas foram avaliadas em solução nutritiva com 148 µm de alumínio (Schaffert *et al.*, 1996). A média de crescimento relativo de raiz seminal (RSRL) para o pai tolerante foi 5,8 vezes superior que a encontrada para o pai suscetível. Estes três pares de linhas semi-isogênicas (todas com macho-esterilidade citoplasmática) e quatro linhagens restauradoras (três suscetíveis ao alumínio e uma tolerante) foram cruzados e os híbridos do tipo tolerante x tolerante

(TxT), tolerante x suscetível (TxS) e suscetível x suscetível (SxS) foram avaliados em solução nutritiva com alumínio. Híbridos do tipo TxS mostraram RSRL semelhante aos cruzamentos do tipo TxT, indicando herança dominante para a característica. Schaffert *et al.* (2000) analisando padrão de segregação de 1.246 plantas F_3 de sorgo em solução nutritiva obtidas a partir de cruzamento tendo como pai tolerante o genótipo SC283 (IS 7173C), encontraram um gene maior dominante (herança oligogênica) controlando tolerância à toxidez de alumínio neste cruzamento.

Flores *et al.* (1991) avaliaram em solo ácido um dialelo entre 14 linhagens de sorgo envolvendo 40 híbridos F_1 por dois anos e níveis de saturação de alumínio no solo variando de 42% a 71%. Os autores verificaram que os efeitos de CGC e CEC foram significativos para produção e número de raízes em solos ácidos, com os efeitos aditivos sendo mais importantes nos níveis mais altos de saturação de alumínio.

Estudos de capacidade combinatória em sorgo, conduzidos ao nível de campo na Colômbia (Flores *et al.*, 1988; 1991), na Nigéria (Adamou *et al.*, 1992) e no Quênia (Zake *et al.*, 1992) mostraram que tolerância à acidez em solo com alta saturação de alumínio avaliada através de características de planta e produção ao nível de campo é poligênica, controlada por genes de efeito aditivo e não aditivo.

7.2.6 SOJA

Estudos foram conduzidos para se verificar a herdabilidade (h^2) para tolerância ao Al em uma população derivada da geração F_4 de soja, por meio do crescimento radicular em solução nutritiva (Bianchi-Hall *et al.*, 1998). Foram utilizadas 120 linhagens obtidas do cruzamento entre 'Young' (sensível) com 'PI416937' (tolerante). Análise de variância da progênie, foi significativa ($P<0,05$) para o efeito de interação progênie x Al, indicando variação genética herdável para tolerância ao Al. Aproximadamente 6% da progênie derivada da população F_4 neste estudo, foi similar aos genitores para resposta ao Al. Os autores sugerem que três a cinco genes possam estar envolvidos no controle de tolerância ao Al neste cruzamento de soja.

Spehar (1995) relatou sobre um cruzamento dialélico 9x9 entre linhagens de soja. A CGC foi maior que a CEC, indicando predominância de efeitos aditivos.

Spehar & Galwey (1996) obtiveram dados de um cruzamento dialélico 9x9 entre cultivares contrastantes, para crescimento em solos e em solução nutritiva, na presença de alta concentração de Al. A análise da capacidade combinatória indicou predominância de genes de efeito aditivo e um modelo do tipo dominante-aditivo, explicou a maior parte das diferenças para crescimento na presença do estresse de Al.

7.2.7 ALFAFA E ARABIDOPSIS

Sete mutantes de arabidopsis resistentes ao alumínio, denominados *alr* foram isolados em meio com alta saturação de alumínio (Larsen *et al.*, 1997). Os mutantes *alr* mostraram ser do tipo semidominante e representavam pelo menos dois locos diferentes em arabidopsis. Nove mutantes para sensibilidade ao alumínio baseado em crescimento de raiz em solução nutritiva com alumínio foram também identificados. A análise de complementação gênica revelou que dos nove mutantes, oito representavam locos diferentes, indicando que suscetibilidade ao alumínio em arabidopsis é uma característica complexa.

Um dialelo (incluindo os recíprocos) com seis genitores de alfafa foi conduzido em solução nutritiva na presença de Al (Campbell *et al.*, 1993). O efeito da CGC foi significativo tanto para altura da planta, como para peso de matéria seca e constituiu a maior parte da variação genética. O efeito recíproco foi significativo apenas para o peso de matéria seca. Os autores verificaram que nos cruzamentos de alfafa avaliados, tolerância ao alumínio parece ser dominante sobre suscetibilidade.

8. SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

O moderno melhoramento de plantas tem produzido cultivares altamente produtivas quando associado a um sistema intensivo de utilização de insumos (Hauptli *et al.*, 1990). A filosofia dos programas de melhoramento de plantas desenvolvidos principalmente nos Estados Unidos, de 1940 a meados de 1980, tem-se baseado na capacidade da pesquisa na área de solos em desenvolver tecnologia para manejo de nutrientes (King, 1990) e para corrigir deficiência dos solos (Kellog, 1975). Dentro desta linha, o fitomelhorista em geral conduz seu programa de melhoramento utilizando a mais moderna tecnologia desenvolvida na área de correção e manejo de solos. Neste sistema, a presença de qualquer variabilidade genética para tolerância a estresse de solo não será identificada, podendo de fato estar-se selecionando para uma reduzida eficiência em um ambiente com alto uso de insumos.

De acordo com Devine (1976) para se obter resultados satisfatórios em um programa de melhoramento, para tolerância a solos ácidos com ênfase em tolerância à toxidez de alumínio, são necessárias as seguintes informações: a) existência de técnicas de seleção para identificar tolerância; b) existência de variabilidade genética na espécie estudada; c) a característica deve ser herdável e estimativas de herdabilidade devem estar disponíveis; d) não devem existir correlações genotípicas altamente negativas entre tolerância e características agronomicamente importantes; e) deve ser possível fazer estimativas ao nível de campo do progresso obtido com a seleção para estresse. Estes componentes são inter-relacionados de várias maneiras. Por exemplo, um bom *screening* deve levar a um melhor entendimento da genética da tolerância; progresso obtido para produção ao nível de campo sugere a inexistência de correlações negativas com produção; a escolha do método de *screening* pode influenciar o método de melhoramento utilizado e vice-versa.

Um ponto a ser considerado é que a interação genótipo x ambiente é baseada na variabilidade genética dos processos fisiológicos envolvidos na tolerância ao estresse e na modulação destes processos que ocorre de forma distinta em diferentes ambientes. Neste contexto, um genótipo que muda seu fenótipo em resposta a um ambiente diferente é denominado plástico, enquanto outro que não muda seu comportamento através dos ambientes é considerado estático (Zoebel, 1993). Por exemplo, a variedade de milho BR136 é altamente adaptada a solos ácidos, mas apresenta muito baixa capacidade de resposta a melhoria do ambiente, podendo ser considerada um genótipo não plástico (Parentoni *et al.*, 1999). Da mesma maneira como um mesmo genótipo pode responder de forma diversa em diferentes ambientes, um ambiente que leve diferentes genótipos a responderem de forma diferente pode ser chamado um ambiente modulador, enquanto um ambiente que não cause respostas diferentes em um mesmo conjunto de genótipos pode ser chamado de ambiente não modulador ou estável.

Uma parte importante do tipo de abordagem em um programa de melhoramento é um melhor entendimento dos componentes genéticos, fisiológicos e bioquímicos pelos quais as plantas toleram o estresse mineral. Um melhor entendimento destes processos deve acelerar o desenvolvimento de plantas mais tolerantes e mais efetivas na utilização de insumos como calcário e fertilizantes (Foy, 1988).

Foy (1997) relacionou os principais desafios encontrados no melhoramento para tolerância a estresses: a) tolerância a diversos estresses é provavelmente um caráter poligênico e diferentes genes podem estar envolvidos em diferentes níveis do estresse em questão; b) níveis de toxicidade podem se expressar diferentemente em diferentes plantas; c) toxidez de alumínio pode aparecer junto com deficiência de Ca, Mg, P e Fe ou como sintoma de seca, o que pode levar, em alguns casos, a uma dificuldade para separar tolerância ao alumínio ao nível de solo de eficiência na utilização de vários nutrientes; d) em cultivares de tomate, tolerância ao alumínio tem sido associada com a habilidade de adquirir P a baixas concentrações na solução, mesmo na ausência de alumínio; e) interação entre tolerância ao alumínio subsuperficial e densidade do solo nesta camada foi verificada para pares de cultivares tolerantes e suscetíveis de cevada, trigo e feijão. Tanto as cultivares sensíveis, quanto as tolerantes, não foram capazes de desenvolver raízes no subsolo com pH 5,27 e uma alta densidade aparente de 1,44.

A maior parte dos estudos de tolerância ao alumínio utiliza como critério de seleção características de raiz. O'Toole & Bland (1987) avaliando a literatura existente sobre genes controlando características de raízes verificaram que a herdabilidade para estas características era geralmente baixa, mas com significativa variabilidade.

Falconer (1961) discutindo sobre seleção indireta e características correlacionadas sugeriu que, quando uma característica é de difícil mensuração (seja por razões operacionais seja por razões econômicas) e ainda esta característica esteja correlacionada com outras características de fácil mensuração, seleção nesta segunda característica seria mais eficiente para modificar a primeira. Em ambientes sob estresse, produção, altura de planta e outras características de parte aérea são positivamente correlacionadas com características de raiz que levam à tolerância ao dito estresse. Zobel (1993) sugeriu que uma maneira de se fazer seleção indireta para adaptação a determinado estresse que afeta uma característica do sistema radicular seria: a) identificar característica de raiz (morfológica ou fisiológica) que confira tolerância ao estresse em questão; b) incorporar esta característica no germoplasma utilizado dentro do programa de melhoramento; c) fazer seleção para produtividade e outras características de interesse em uma gama de ambientes com graus variáveis do estresse em questão. Resultados que suportam a hipótese acima foram demonstrados por Foy *et al.* (1993) que encontraram suficiente correlação entre desenvolvimento de raízes e parte aérea para soja crescida em solo com alta saturação de alumínio para se usar crescimento de parte aérea como critério de seleção.

A abordagem utilizada em programas de melhoramento para adaptação a solos com toxidez de alumínio tem sido identificar germoplasma capaz de produzir nestas condições, com adaptação aos principais estresses edáficos, bióticos e climáticos que ocorrem na área alvo do programa e onde, durante a seleção, são aplicadas doses mínimas de nutrientes de maneira a não se alterar muito a condição original de acidez do solo, mas buscando-se reduzir o efeito de outras deficiências minerais sobre a seleção.

Algumas culturas são naturalmente mais tolerantes à toxidez de alumínio e à acidez do solo do que outras (Tabela 1). Dentre estas estão mandioca (*Manihot esculenta*), caupi (*Vigna unguiculata*), amendoim (*Arachis hypogea*), guandu (*Cajanus caja*), batata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa*) e centeio (*Secale cereale*), como citado por Litte (1988). Mandioca e *Stylosanthes guianensis* estão entre as culturas mais tolerantes a solos ácidos (Howeler *et al.*, 1987). Spain *et al.* (1975) em *screening* em solo ácido com diferentes saturações de alumínio observaram que caupi foi muito mais tolerante ao alumínio que as outras espécies testadas; que feijão preto, milho e soja foram intermediários e que os outros tipos de feijão avaliados (excluindo os feijões pretos) foram altamente sensíveis.

Níveis críticos de saturação de alumínio no solo o qual correspondem a 95% da produção máxima para determinada cultura obtida em solo sem toxidez de alumínio têm sido utilizados para classificar o grau relativo de tolerância ao alumínio de diversas culturas (Tabela 4). Howeler (1991) relatou que em seqüência decrescente de tolerância ao alumínio tem-se capim andropogon, capim braquiária, mandioca, estilosantes, capim jaraguá, café, arroz, capim elefante, milho, feijão preto, soja, sorgo, pueraria, algodão e feijão-de-cor. O nível crítico de alumínio é influenciado pelo conjunto de cultivares de uma mesma espécie utilizadas na avaliação. Por exemplo, mandioca, apesar de alta tolerância ao alumínio, parece ter baixa variabilidade intra-específica para esta característica (Howeler, 1991). Salinas (1978) relatou alta variabilidade intra-específica para tolerância ao alumínio avaliada em solos com diferentes saturações de alumínio para arroz, feijão, milho, sorgo e trigo.

TABELA 4. Nível de saturação de alumínio capaz de manter a produção de determinada cultura em 95% do valor obtido em solo corrigido sem alumínio.

Espécie / Cultura	Nível crítico de alumínio	Referência
Andropogon gayanus	90%	Adaptado de Spain (1979)
Brachiaria decubens	86%	Adaptado de Spain (1979)
Mandioca	80%	Howeler (1985)
Stylosanthes capitata	70%	Adaptado de Spain (1979)
Capim Jaraguá	75%	Adaptado de Spain (1979)
Café	60%	Sanchez (1976)
Arroz	40%	Salina & Sanchez (1977)
Capim elefante	34%	Sanchez (1976)
Milho	30%	Salina & Sanchez (1977)
Milho	28%	Sanchez (1976)
Feijão preto	23%	Sanchez (1977)
Soja	20%	Kamprath (1970)
Sorgo	20%	Sanchez (1976); Gourley (1987)
Pueraria phaseoloides	20%	Adaptado de Spain (1979)
Algodão	10%	Kamprath (1970)
Feijão-de-cor	8-10%	Gourley (1987)

Espécies nativas coletadas em região sob solos ácidos tem sido o germoplasma de maior utilidade para o desenvolvimento de cultivares tolerantes a solos ácidos. (Zeigler *et al.*, 1995).

O tipo de herança encontrado para pequenos cereais (trigo, aveia, cevada), que em geral tem sido herança monogênica dominante, indica que o uso de métodos como o de *pedigree* que envolve hibridação de pais contrastantes para a característica estudada, seguido de seleção em diferentes gerações de acordo com a herdabilidade da característica, deve-se mostrar eficiente nesta situação. Nos casos de herança poligênica geralmente com componente aditivo superior aos efeitos não aditivos, como verificado para arroz e milho, o uso de métodos como seleção recorrente seriam eficientes em programas de seleção para esta característica.

Zeigler *et al.* (1995) relataram que para sorgo, o método de seleção mais efetivo no desenvolvimento de cultivares tolerantes à acidez tem sido o de *pedigree*, enquanto para milho, seleção utilizando irmãos completos permitiu ganhos de até 14% por ciclo (Granados *et al.*, 1993). No caso de gramíneas, Ziegler *et al.* (1995) mencionaram que o melhoramento encontra-se ainda na fase de avaliação e seleção do germoplasma coletado, enquanto a metodologia de seleção mais apropriada para esta condição ainda está sendo determinada. Programas de seleção de forrageiras tropicais em solos ácidos, principalmente do gênero *Brachiaria*, vêm sendo conduzidos pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) na Colômbia, pela Embrapa Gado de Corte em Campo Grande (MS) e outras instituições de pesquisa do país.

Metodologia para seleção simultânea de várias características feitas em diferentes fases de um programa de seleção recorrente ou uso do método do *pedigree* em populações F_2 ou RC_1 são descritos por Eberhart *et al.* (1991). Nesta seleção em diferentes estádios, um grande número de plantas S_0 ou F_2 é utilizado, sendo feita seleção massal para uma ou duas características de alta herdabilidade. Várias centenas de progênies S_1 ou F_3 são submetidas a *screening* para duas ou três características envolvendo tolerância a estresse (toxidez de alumínio, eficiência na utilização de P etc.), utilizando-se dois ou mais locais. Uma planta de cada família selecionada é autofecundada e avançada para S_2 (F_4). As progênies S_2 podem ser avaliadas *per se* ou cruzadas com testadores e avaliadas em vários ambientes.

No caso de culturas alógamas, o uso de híbridos em estudos de campo envolvendo estresses como toxidez de alumínio e acidez de solo, traz algumas vantagens em relação à avaliação de linhagens *per se*: a) plântulas de híbridos exibem maior vigor; b) híbridos em geral são mais tolerantes a estresses e produzem mais grãos que o pai mais tolerante; c) híbridos tendem a produzir maior sistema radicular que suas linhagens genitoras, explorando maior volume de solo; d) estudos em ambiente sob estresse envolvendo linhagens em culturas alógamas apresentam médias baixas e alta variabilidade entre e dentro de parcelas experimentais, levando a altos coeficientes de variação e baixa capacidade de se detectar diferenças entre tratamentos.

Progressos esperados para seleção recorrente realizada em solos ácidos e férteis para uma variedade de milho foram estudados por Resende (1989), obtendo-se os seguintes resultados: a) magnitude da variância genética aditiva para peso de espigas foi menor em solo ácido, indicando menor variabilidade neste ambiente; b) magnitude

da estimativa de variância da interação progênies x ambientes foram elevadas para peso de espigas revelando baixa correlação entre médias de progênies nos dois ambientes; c) progressos genéticos esperados para produção revelaram que seleção indireta (seleção em um ambiente e resposta em outro) apresentou baixa eficiência, verificando-se que para adaptação a solos ácidos, seleção em ambiente ácido ou na média dos ambientes ácido e fértil conduziria a melhores resultados. Outro tópico estudado no trabalho acima foi verificar o tamanho adequado de parcela para estudos em solos ácidos e férteis. O autor encontrou que a maximização do progresso com seleção ocorreu com o uso de parcelas um terço maiores em solo ácido que em solo fértil (20 e 15 plantas, respectivamente), indicando a necessidade de se aumentar o tamanho de parcela em avaliações conduzidas em solo ácido.

Deve-se observar que enquanto a maioria dos estudos de herança da tolerância ao alumínio é conduzida em ambiente controlado de laboratório (ensaios de solução nutritiva conduzidos em casa de vegetação, câmara de crescimento etc.), os programas de seleção visam obter genótipos tolerantes ao alumínio mas com bom desempenho em solos ácidos e se possível também com capacidade de responder à melhoria do ambiente. Neste caso, existe um confundimento entre seleção para tolerância ao alumínio e seleção para adaptação a todo um contínuo de características que limitam a produção das culturas em solos ácidos. Observa-se também que a maioria dos trabalhos na área de melhoramento para esta característica consiste somente na caracterização da variabilidade genética existente. Um menor número de estudos tem sido realizado em algumas espécies com utilização de um programa de seleção mais elaborado, visando ao melhoramento para tolerância ao alumínio e adaptação a solos ácidos. Trabalhos de pesquisa conduzidos em várias culturas têm identificado genótipos com diferentes níveis de tolerância e suscetibilidade, permitindo identificar padrões contrastantes para tolerância ao alumínio/adaptação a solos ácidos. Nos diversos estudos citados abaixo, procurou-se mencionar os nomes dos genótipos contrastantes já identificados em diversas culturas. Espera-se com isto contribuir na escolha de padrões a serem utilizados em novos trabalhos de pesquisa nesta área. A seguir são relatados resultados de melhoramento para tolerância ao alumínio/adaptação a solos ácidos em diversas culturas.

8.1 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM ARROZ

Existe grande variabilidade intra-específica para tolerância ao alumínio em arroz (Howeler, 1991).

Variabilidade genética para tolerância ao alumínio em cultivares de arroz de sequeiro brasileiras e cultivares de arroz originárias do *International Rice Research Institute* (IRRI) e CIAT tem sido determinada utilizando solução nutritiva com diferentes concentrações de alumínio e avaliando crescimento de raiz seminal (Camargo, 1983; Camargo, 1984; Fageria *et al.*, 1988). Howeler *et al.* (1987) reportaram baixa correlação entre resultados de avaliação de genótipos de arroz em solo ácido e avaliação de tolerância ao alumínio em solução nutritiva. Ziegler *et al.* (1995) mencionaram que a utilização de dados de avaliação de toxidez de alumínio em solução nutritiva deve ser sempre associada aos dados de experimentos conduzidos ao nível de campo, em programas de melhoramento de arroz para adaptação a solos ácidos.

Salinas & Sanches (1977) avaliaram diversas cultivares de arroz para tolerância ao alumínio em solução nutritiva e para capacidade de produzir em solo com alta saturação de alumínio e baixos níveis de P. A cultivar Pratão precoce foi a mais tolerante tanto a estresse de alumínio quanto ao estresse de P. As cultivares IAC-47 e IAC 1246 foram medianamente tolerantes e as cultivares Batais e Flotante foram altamente sensíveis.

Spain *et al.* (1975) encontraram que as cultivares Colômbia-1 e Monolaya assim como a cultivar americana de porte alto Blue Bonnet 50 foram altamente tolerantes a solo ácido e mostraram baixa resposta à correção do ambiente. Howeler & Cadavid (1976) avaliaram 96 linhas semi-anãs de arroz em solo ácido. Os autores verificaram que a maioria dos genótipos avaliados foi sensível a altos níveis de alumínio no solo e altamente responsível a calagem. Avaliando cerca de 1.000 genótipos de arroz em solo ácido com 0,5 e 6 toneladas de calcário por hectare os mesmos autores relataram que a maioria das cultivares altamente tolerantes ao alumínio era originária de regiões de solos ácidos da África.

Grande número de genótipos de arroz do programa do *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) foi avaliado em solos ácidos da Nigéria (Alluri, 1986). As cultivares foram crescidas em parcelas de duas fileiras de 5 m em solos ácido (80% de saturação de alumínio) e solo corrigido (5% a 23% de saturação de alumínio). Testemunhas comuns para tolerância ao alumínio (ITA 117, ITA 235 e LAC 23) e suscetíveis ao alumínio (FARO 27, IR 52 e ITA 212) foram incluídas como controles. O índice de tolerância utilizado foi a relação de produção entre os dois níveis de alumínio no solo. Os genótipos mais tolerantes ao alumínio foram utilizados como genitores no programa de melhoramento de arroz do IITA e avaliados em uma rede internacional de ensaios. Sarkarung (1986) avaliaram 1.400 acessos de arroz na Colômbia em parcelas de 5m sob os níveis de 84% a 86% de saturação de alumínio e solo corrigido. Os genótipos foram avaliados visualmente para tolerância ao alumínio e também para morfologia de raízes aos 40 e 70 dias, sendo que 17% das entradas foram consideradas tolerantes ao alumínio. Germoplasma do tipo semi-anão mostrou desempenho muito inferior mesmo no solo corrigido e isto foi atribuído a seu sistema radicular muito superficial. Não foi encontrada correlação entre altura de planta e morfologia de raiz. Depois de 5 anos de cruzamentos e seleção utilizando germoplasma africano, brasileiro e colombiano, foram desenvolvidas cultivares elite de arroz para solos ácidos (Sarkarung & Zeigler, 1990).

O programa de melhoramento de arroz para adaptação a solos ácidos conduzido no CIAT é descrito por Ziegler *et al.* (195). Os autores mencionaram que o germoplasma original utilizado foi proveniente do IITA, do IRRI, do *Institut de Recherches Agronomiques Tropicales* (IRAT) e do programa do Instituto Agronôico de Campinas (IAC). É mencionado que os programas do IITA e do IRAT basearam-se em variedades locais cultivadas em solos ácidos e que este germoplasma em geral apesar de adaptado, era bastante inferior em diversas outras características como resistência a doenças , tipo de planta, qualidade de grão e potencial de produção. O programa de selção para adaptação de arroz a solos ácidos do CIAT baseou-se em avaliação em faixas de solo ácido (pH 4,1 e 83% saturação de Al, P=4,6 ppm) com faixas de solo corrigido pela aplicação de 3t de calcário. Um grupo de 20 linhagens

selecionadas deste germoplasma original foi avaliado em solo com 86% de saturação de alumínio e pH 4,9 em 5 níveis de fertilização na Colômbia. A linhagem P5589-3P-4-M mostrou comportameto superior tanto em ambiente ácido quanto corrigido e foi liberada com o nome de 'Oryzica Turipana 7'. O método de melhoramento mais adotado no programa tem sido o de *pedigree*, onde são utilizados como genitores cruzamentos múltiplos envolvendo três ou quatro genitores que contenham individualmente ou em comum características desejáveis ao programa de melhoramento. Ziegler *et al.* (1995) mencionaram ter completado cinco ciclos de seleção recorrente obtidos a partir de recombinação de progênies de arroz F_3 e F_4 obtidas de cruzamentos conforme descrito acima e selecionadas em solos ácidos. Não foram mencionados dados de avaliação destes ciclos. Os autores observam que o fato de obter-se bons níveis de tolerância à acidez em arroz após 3 a 4 ciclos de seleção recorrente em solo com alta acidez indicaria a importância de genes de efeito aditivo na herança desta característica.

A maior área cultivada com arro de sequeiro em solos ácidos no mundo está concentrada na região Centro-Oeste do Brasil (Ziegler *et al.*, 1995) e programas de seleção de cultivares de arroz para adaptação a solos ácidos têm sido conduzidos no país pelo IAC, Embrapa Arroz e Feijão e outras instituições.

Wu *et al.* (1997) relataram dados de uma análise de dialelo incompleto envolvendo 56 progênies F_1 de arroz, derivadas de oito genitores machos, cruzados com sete genitores femininos que apresentavam tolerância diferencial ao Al, tendo como critério de seleção o crescimento da raiz em solução nutritiva contendo 1 mM de Al. Os autores reportaram que a CGC foi significativa tanto para os genitores machos, como para os genitores femininos. A CGC foi muito maior que a CEC, indicando que os efeitos aditivos, são mais importantes no controle da característica tolerância ao Al nos cruzamentos estudados. A herdabilidade para esta característica foi de 48%, indicando a possibilidade de ganho genético na seleção de genótipos tolerantes ao Al. Os autores concluíram, que alguns genótipos podem ser utilizados para o desenvolvimento de híbridos produtivos de arroz, para solos ácios. Resultados semelhantes são mencionados por Khatiwada *et al.* (1996) que também encontraram alta herdabilidade e valores mais altos de CGC para tolerância ao alumínio em arroz. Estes últimos autores reportaram que, baseado nos resultados obtidos, a seleção para tolerância ao alumínio em arroz pode ser feita nas gerações iniciais e que, o método de *pedigree* deve ser eficiente no meloramento desta característica. Os efeitos recíprocos foram significativos neste último trabalho, fazendo com que os autores sugerissem que uma escolha criteriosa da direção dos cruzamentos (*proper parent choice*) fosse feita em programas de hibridação em arroz.

Ferreira *et al.* (1998) utilizaram três variedades de arroz tolerantes ao Al (Guarani, Guapore e IAC25) e três sensíveis (CNA5600, CNA5615 e IAC 899) em um cruzamento de meio dialelo. Genitores e F_1's foram avaliados em solução nutritiva contendo 20 ppm de Al. Guarani, Guapore e IAC25, apresentaram os maiores efeitos positivos de CGC para todas as características avaliadas (matéria seca, matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, comprimento de raiz e altura da planta). Os autores encontraram que os efeitos de CGC foram mais importantes para a variável comprimento de raiz.

8.2 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM TRIGO

O Brasil foi pioneiro no melhoramento de trigo para tolerância à toxidez de alumínio. Trabalhos de seleção para tolerância ao alumínio em trigo iniciaram-se no país em 1914, muito antes de que existisse sequer o conhecimento formal de que toxidez de alumínio era responsável pela sintomatologia observada em plantas de trigo crescidas em solo ácido, denominada de crestamento (amarelecimento, baixo crescimento e requeima). A cronologia destes fatos conforme descrita por Borlaug & Doswell (1997) é relatada a seguir. Em 1914, o agrônomo Jorge Polyssu identificou uma planta tolerante em uma propriedade em área de campo limpo no Rio Grande do Sul e a partir da mesma foi desenvolvida uma variedade local denominada 'Polyssu'. Esta variedade foi enviada para a estação de pesquisa hoje chamada de Veranópolis e para a Estação de Pesquisa de Fronteira, em Bagé-RS em 1925, onde foram feitos cruzamentos entre variedades tolerantes ao crestamento de Alfredo Chaves e a variedade 'Polyssu', originando as cultivares Fronteira, Surpresa, Frontana, Minuano, Jesuíta e Guarany (Matzenbacher, 1988). Estas variedades foram utilizadas como genitores de vários programas de melhoramento em todo o mundo. Em 1940, Dr. Ady Raul da Silva, no Paraná, comparou variedades de trigo do Brasil, Argentina e Uruguai cultivadas em solos ácidos com e sem aplicação de calcário, verificando que, enquanto as variedades argentinas e uruguaias morreram, várias das variedades brasileiras produziram mais de 1 t/ha nestas condições. Por volta de 1942, pesquisadores brasileiros foram capazes de atribuir os sintomas de crestamento à acidez do solo e no final da década ficou demonstrado que a causa principal destes sintomas era a toxidez de alumínio no solo (Araújo, 1949). No final dos anos 40 e início dos anos 50 foram iniciados os primeiros trabalhos de correção do solo com calagem. Em 1954 foi determinado que tolerância ao alumínio era uma característica herdável (Beckman, 1954). As variedades brasileiras Preludio e Carazinho, adaptadas a solos ácidos foram liberadas em 1956 e 1957. Nos anos 60, variedades como IAS 20 mostraram potencial de produção superior a 1,4 t/ha em solos com alta acidez (Matzenbaher, 1988).

A cultivar BH1146 foi desenvolvida dentro do programa de melhoramento de trigo do Instituto Agronômico em Belo Horizonte - MG na década de 40. Ainda hoje esta cultivar é padrão mundial de tolerância ao alumínio em trigo.

No final dos anos 50 o *IBEC Research Institut* (IRI), ligado a fundação Rockfeller, iniciou trabalhos na produção de culturas em solos ácidos brasileiros em cooperação com o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), avaliando níveis de correção de solo e aplicação de fertilizantes em cultivares de alfafa e soja. Em 1973 foi criada a EMBRAPA, onde várias unidades vêm trabalhando em pesquisa para adaptação de plantas a solos ácidos (CPAC, CNPMS, CNPSo, CNPAF, CNPT, CPACT, CNPGC). Na década de 80, várias outras instituições também iniciaram programas de pesquisa nesta área, tais como: IAC, Fecotrigo, CIMMYT, CIAT, ESALQ-USP, UFV, UFLA, UFRGS etc, indicando o grande envolvimento de diversas instituições de pesquisa no país dentro deste tema.

Trigo é uma espécie com grande amplitude de variação para tolerância ao alumínio (Howeler, 1991). Em geral, cultivares originadas de germoplasma selecionado

em ambientes com solos com alta saturação de alumínio como as cultivares brasileiras Frontana e BH1146 ou as cultivares da região de Ohio nos Estados Unidos, 'Thorne' e 'Seneca', mostram alto nível de tolerância ao alumínio (Foy *et al.*, 1974a; Scott & Fisher, 1989). A cultivar Atlas 66 também tem sido utilizada como padrão de tolerância ao alumínio em trigo (Foy *et al.*, 1973). As cultivares Chinese Spring e Beuchamp são consideradas de tolerância intermediária, enquanto 'Brevor' e 'Mormon' são altamente sensíveis. Briggs *et al.* (1989) avaliando 28 cultivares de trigo de primavera para tolerância ao alumínio encontraram que sete delas (K. kongoni, PT 741, K. Nymbu, PT 726, Norguay, PT 7748 e Maringá) foram mais tolerantes que 'Atlas 66'.

Camargo & Felicio (1988) avaliaram resposta de crescimento de raiz entre sete genótipos de trigo avaliados em solução nutritiva com 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ppm de alumínio. Os autores reportaram que as cultivares foram classificadas como altamente suscetível (Anahuac-75), suscetível (Alondra 46), moderadamente suscetível (IAC 23), moderadamente resistente (IAC 17), resistente (IAC 24 e IAC 5) e altamente resistente (BH 1146).

Zale & Briggs (1988) estudaram tolerância ao alumínio em solução nutritiva em cultivares canadenses de trigo de primavera e outras de várias partes do mundo. Dentre as variedades mais tolerantes estavam HY320, Romany, Kenya Kongoni, Maringá, PF7748 e Cinquantenário, todas derivadas de germoplasma brasileiro ou mexicano.

Rajaram *et al.* (1991) relataram que os programas conjuntos de melhoramento de trigo envolvendo o CIMMYT e diversas instituições de pesquisa brasileiras começaram em 1969, com a então FUNDACEF (Federação das Cooperativas de Produtores de Trigo e Soja) em Cruz Alta-RS. A partir da década de 70 este intercâmbio foi incrementado com os programas de pesquisa em melhoramento de trigo em instituições como a Embrapa Trigo em Passo Fundo, a OCEPAR em Cascavel, o IAPAR em Londrina, o IAC em Campinas e a Embrapa Cerrados em Brasília. Milhares de inhagens e populações segregantes combinando trigos semi-anões de alta produção do CIMMYT com variedades tolerantes ao alumínio e adaptadas a solos ácidos brasileiros levaram a liberação de cultivares tais como CEP13-Guaiba, MG1, IAPAR18 e 22, OCEPAR 9, 10, 11, 12 e 13, e BR14, 16 e 21. Dentro deste trabalho colaborativo com o CIMMYT no período de 1984 a 1988 os autores acima reportam que foram liberadas no Brasil 35 variedades de trigo tolerantes ao alumínio.

Rajaram *et al.* (1991) relataram ainda que, devido à alta pressão de doenças fúngicas viroses e bacterioses, o uso de retrocruzamentos tendo como pai recorrente um ou mais genitores brasileiros com resistência às principais doenças e tolerância ao alumínio e como pai doador germoplasma do CIMMYT com alto potencial produtivo foi uma das metodologias utilizadas com sucesso no desenvolvimento de novas cultivares de trigo, associando alta produtividade com tolerância ao alumínio e resistência a enfermidades. Outra estratégia foi o desenvolvimento de populações submetidas a seleção recorrente para características específicas e, posteriormente, recombinadas para agregar estas diversas características em um mesmo genótipo.

Mesdag *et al.* (1970) encontraram uma correlação positiva e significativa entre conteúdo de proteína e tolerância ao alumínio em cruzamentos de trigo

envolvendo 'Atlas 66' e outra variedade de trigo vermelho de inverno tipo duro. Briggs *et al.* (1989) mostraram associação positiva entre alto potencial produtivo e tolerância ao alumínio em genótipos canadenses.

Scott & Fisher (1989) reportaram que cevada é mais sensível à toxidez de alumínio que trigo mas com grande variabilidade intra-específica. A cultivar Dayton tem sido considerada tolerante ao alumínio e a cultivar Kearney é bastante sensível (Lafever *et al.*, 1977). Reid *et al.* (1980) lançaram o composto Cross XXXIV como tolerante ao alumínio. É conhecido que centeio e triticale têm ótima adaptação à condição de solos ácidos (Rajaram *et al.*,1991).

8.3 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM MILHO

Programas de seleção para tolerância ao alumínio e adaptação a solos ácidos em milho vêm sendo conduzidos no Brasil (Embrapa, IAC e algumas empresas privadas) e no CIMMYT. Alta variabilidade genética tem sido observada para esta característica. A maioria dos estudos de tolerância à toxidez de alumínio em milho avalia o efeito do desenvolvimento de raiz em solução nutritiva.

Magnavaca *et al.* (1987a,c) compararam a tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva entre genótipos (variedades e linhagens) tropicais e temperados de milho. Os autores verificaram que o crescimento relativo da raiz seminal (CRRS) em solução nutritiva com 6 ppm de Al para a variedade tropical CMS 30 – Ciclo 0 foi respectivamente 93%, 86% e 74% superior ao observado nas seguintes variedades temperadas: Corn Belt x Caribe, Hays Golden e no sintético Nebraska B. Synthetic. Os autores compararam as médias e variâncias para CRRS em solução nutritiva com alumínio, na variedade tropical CMS 30 – Ciclo 0 e na mesma variedade após 4 ciclos de seleção recorrente em solo ácido, para peso de espigas (CMS 30 – Ciclo 4). Verificou-se que após 4 ciclos de seleção em solo ácido, a média e a variância do CRRS diminuíram em relação ao Ciclo 0 (redução de 7,2% na média e 31,3% na variância). Utilizando dados individuais de CRRS de 126 plantas de cada um dos dois ciclos, os autores construíram um histograma para os mesmos, utilizando 9 classes de tolerância. Foi verificado que a redução observada na média e na variância do parâmetro CRRS após 4 ciclos de seleção recorrente para peso de espigas em solos ácidos na variedade CMS 30, foi devido à perda de indivíduos nas classes mais tolerantes ao alumínio em solução nutritiva do C_0 para o C_4. Este seria um primeiro indicador de que tolerância extrema à toxidez de alumínio não necessariamente se traduz em uma alta adaptação a solos ácidos, como foi observado, posteriormente, por Magnavaca *et al.* (1988) para híbridos de milho. Também foi ainda verificado que a introgressão de germoplasma brasileiro em material do *Corn Belt*, aumentou o nível de tolerância a toxidez de alumínio neste último (Magnavaca *et al.*, 1987a,c). Os mesmos autores verificaram ainda que a média de CRRS de 3 linhagens brasileiras foi de 2,07 enquanto para as 3 linhagens americanas este valor foi de 1,46 (a linhagem B73 apresentou um CRRS de 1,32 enquanto para Mo17 este valor foi de 1,64).

Lima *et al.* (1992) relatam uma mudança média de 5,2 cm (26,1%) em comprimento de raiz seminal após dois ciclos de seleção para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. Foi feita seleção divergente para tolerância ao alumínio por

dois ciclos. Avaliação em solo da seleção nos dois sentidos para tolerância ao alumínio mostraram mudanças em produção de 1,17 t/ha e o cruzamento dos ciclos divergentes de seleção mostrou uma heterose de 580 kg/ha ou 15,1%.

Outro ensaio visando verificar os efeitos de seleção para produção de grãos em solo com alta saturação de alumínio sobre a tolerância ao alumínio em solução nutritiva, foi conduzido por Souza (1997). Este autor avaliou o CRRS em solução nutritiva com 222 mm de alumínio para seis ciclos de seleção recorrente em solo ácido na variedade CMS 04C. Foram avaliados os seis ciclos *per se* e os mesmos ciclos cruzados com dois testadores. Ao contrário do observado anteriormente por Magnavaca *et al.* (1987c) na variedade CMS 30, Souza (1997) verificou que os seis ciclos de seleção recorrente em solo ácido na variedade CMS 04C aumentaram a tolerância ao alumínio em solução nutritiva desta variedade em 44,8% do Ciclo 0 para o Ciclo 6 (ganho de 7,4% por ciclo) quando avaliados *per se* e, ainda, que ocorreu um aumento na capacidade combinatória para CRRS do Ciclo 0 para o Ciclo 6 quando cruzados com dois testadores, de 39% e 42%.

Um dialelo completo (F_1's e parentais) entre cinco variedades de milho selecionadas para solo ácido (CMS 04C, CMS 14C, CMS 13, CMS 30, CMS 36) foi avaliado em solução nutritiva (Lopes *et al.*, 1987). As variedades CMS 36 e CMS 30 mostraram os maiores efeitos de capacidade geral de combinação para CRRS, indicando serem boas fontes de genes para tolerância à toxidez de alumínio. A variedade CMS 36 tem sido utilizada ao nível mundial como fonte de tolerância à toxidez de alumínio em milho (Parentoni *et al.*, 1999).

Boa correlação (r=0,79 ***) entre CRRS de linhagens de milho avaliadas *per se* em solução nutritiva com alumínio e sua CGC para CRRS em solução nutritiva foi reportada por Parentoni *et al.* (1995), indicando que a avaliação *per se* de linhagens de milho em solução nutritiva pode vir a ser um bom indicador de seu comportamento em cruzamentos.

Zeigler *et al.* (1995) mencionam que, apesar de alguns estudos mostrarem que genes maiores podem controlar crescimento de raiz seminal de milho em solução nutritiva com alumínio, não tem sido possível traçar relação mais precisa entre a presença destes genes e diferenças em produção entre genótipos obtidos em solos ácidos.

Furlani *et al.* (1986) avaliaram para tolerância ao alumínio em solução nutritiva com 4,5 ppm de alumínio, 800 genótipos de milho incluindo variedades, híbridos e progênies S_1 de duas populações (IAC-Maya e IAC-Taiúba). Distribuição de freqüência para crescimento de radícula nas progênies nas duas populações mostrou alta percentagem de genótipos sensíveis ao Al na população IAC-Maya. A população IAC-Taiúba mostrou tendência para suscetibilidade ao Al mas apresentou maior freqüência de progênies tolerantes que a outra população. Foi verificada alta variabilidade para tolerância ao alumínio dentre os 800 genótipos avaliados.

Morello *et al.* (2000) avaliaram 34 populações de milho para tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva com 4,5 ppm de Al. Os autores reportam que a população mais tolerante foi Taitinga com crescimento líquido (CL) de raiz seminal de 13,44 cm. As populações mais sensíveis foram MS 010 e (Cuba117xB73) x BR106. Outras populações muito tolerantes foram Sikalq, Taiúba, BR105, Suwan2, CMS 39, CMS 57, AL 009, Cupurico e CMS 53.

O programa de melhoramento de milho para adaptação a solos ácidos e tolerância ao alumínio da Embrapa Milho e Sorgo iniciou-se em 1975; primeiramente foi feito um *screening* utilizando-se 363 linhagens disponíveis na época, como parte da coleção do CNPMS, em um Latossolo Vermelho Escuro com 55% de saturação de alumínio (Bahia Filho *et al.*, 1978). Foi utilizada uma escala visual de notas de 1 (muito ruim) a 5 (ótimo desenvolvimento). Sessenta dias após a germinação, 68,7% das linhagens estavam mortas, sendo que somente 3,6% das mesmas receberam nota 4 e nenhuma recebeu nota 5. Com base nestas avaliações foram selecionadas 30 linhagens com produção em solo ácido igual ou superior a 2.000 kg espigas/ha. Estas linhagens foram testadas em um Latossolo Vermelho Escuro álico (LEa) sob três níveis de calagem: 0, 2 e 7 t/ha, correspondendo a saturações de alumínio de 64%, 46% e 5% (Naspolini Filho *et al.*, 1981). Foram identificados 3 grupos de linhagens com diferentes tipos de resposta à correção do ambiente. Dados de 3 linhagens com resposta típica de cada um dos 3 grupos foram: a) linhagens como a L 69 (produção relativa a seu valor máximo de produção nos níveis de 0, 2 e 7 t calcário/ha de 97%, 100% e 92%), ou seja, a linhagem não responde a melhoria do ambiente; b) linhagens como a L 297, com valores de 53%, 70% e 100% em cada um dos níveis de calagem, ou seja, a linhagem somente atinge seu máximo potencial produtivo com altos níveis de correção do ambiente; c) linhagens como a L 153, produção relativa de 81%, 100% e 100%, representando linhagens capazes de atingir seu máximo potencial produtivo (100%) com pequena correção do ambiente (2 t calcário/ha).

Como parte do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo para adaptação a solos ácidos com alta saturação de alumínio foram formados compostos (CMS 30) e sintéticos (CMS 36) e estas populações juntamente com outras variedades de milho como a CMS 04C e CMS 14C foram submetidas a seleção recorrente em solo ácido com alta saturação de alumínio. Uma descrição destes materiais, conforme relatado por Parentoni *et al.* (1999) segue abaixo. A variedade de milho CMS 04C foi obtida a partir de 6 ciclos de seleção recorrente em solos ácidos feita na variedade Amarillo Dentado-CIMMYT. A variedade CMS 14C é um sintético obtido em 1982 a partir da recombinação de 90 progênies S_2 selecionadas entre 1.100 progênies do Pool 25-CIMMYT, avaliadas em um LE com 45% de saturação de alumínio. Desde sua formação o CMS 14C já passou por 6 ciclos de seleção recorrente em solos ácidos. A variedade CMS 36 é um sintético formado a partir de 4 recombinações das 18 melhores linhagens do grupo inicial de 363 linhagens avaliadas em solo ácido em 1975. Este sintético foi submetido a três ciclos de seleção recorrente em solo ácido. Progênies S_1 desta variedade foram uma das fontes utilizadas na formação da variedade tolerante a solos ácidos SA5 do CIMMYT. A variedade CMS 30-Composto Amplo, foi sintetizada no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) a partir da recombinação de populações oriundas do CIMMYT, América Central e América do Sul. De 1975 a 1994 foram obtidos na Embrapa Milho e Sorgo, 11 ciclos de seleção recorrente para peso de espigas em solo ácido nesta variedade. Progênies S_1 da CMS 30 foram uma das fontes utilizadas na formação da variedade tolerante a solos ácidos SA4 do CIMMYT.

Seis ciclos de seleção recorrente para peso de espigas em solo ácido realizados na variedade CMS 04C foram avaliados em 5 ambientes (Souza, 1997). O autor classificou as áreas como 2 ambientes de solo ácido e 3 ambientes corrigidos. Entretanto, a saturação de alumínio em um dos solos considerados ácidos foi baixa (17% sat. Al, com pH subsuperficial de 5,2) sendo que o segundo ambiente ácido mostrou níveis médios de acidez (LE com 36% sat. Al e pH abaixo de 20 cm de 4,7). Não foram verificados ganhos na variável peso de espigas para os 6 ciclos de seleção nem nos ambientes férteis nem na média dos dois ambientes considerados ácidos. Entretanto, os dados do único ensaio conduzido no local com nível médio de acidez (36% Al, pH=4,7), mostraram uma tendência de ganho do Ciclo 0 para o Ciclo 6 (3.667 kg/ha e 4.169 kg/ha ou 2,2% por ciclo), sugerindo que um maior número de ensaios em solos com níveis médios a altos níveis de acidez seriam necessários para se confirmar estas observações.

Uma questão importante no direcionamento do programa de melhoramento de milho para adaptação a solos ácidos da EMBRAPA foi verificar a possibilidade de associar-se alta produção em solos ácidos com a capacidade de resposta à melhoria ambiental de determinado genótipo (Parentoni *et al.*, 1999). Estudo de avaliação em solos ácidos e férteis de variedades e híbridos comerciais de milho realizado na década de 80 (Gama *et al.*, 1986), indicaram que genótipos como a variedade CMS 36 e um híbrido simples cateto (CMS 200 X), apesar de muito produtivos em solo ácido, mostravam baixa capacidade de resposta à melhoria do ambiente. Esta foi uma das razões da pouca utilização da variedade CMS 36 como fonte de linhagens dentro do programa de híbridos para solos ácidos. A capacidade combinatória para peso de grãos das variedades selecionadas para solos ácidos CMS 36, CMS 30, CMS 14C, CMS 04C e CMS 13 foi avaliada em esquema dialélico completo incluindo F_1's e genitores, em ensaios conduzidos em quatro locais de solos ácidos (Eleutério *et al.*, 1988). A variedade CMS 36 mostrou maior média *per se* e maior capacidade combinatória para peso de espigas em solos ácidos dentre as cinco variedades avaliadas. A variedade CMS 14 C, apresentou produtividade semelhante à CMS 36, e uma capacidade combinatória em solo ácido positiva, mas bem menor que a CMS 36. Entretanto, a variedade CMS 14C, associa níveis médios de produtividade em solo ácido (Eleutério *et al.*, 1988) com alta resposta à melhoria ambiental (Gama *et al.*, 1986). Esta variedade tem sido muito utilizada como fonte de linhagens dentro do programa de adaptação de milho a solos ácidos da EMBRAPA (Parentoni *et al.*, 1999).

O programa de desenvolvimento de híbridos de milho para solos ácidos, na EMBRAPA iniciou-se na década de 70 a partir de avaliação em solos ácidos e férteis de um grupo de mais de 2000 linhagens S_2, derivadas de 6.200 plantas S_1 (Bahia Filho *et al.*, 1997). Um grupo de 429 S_2 foram selecionadase cruzadas com dois híbridos simples testadores. As melhores linhagens deste *top-cross* foram utilizadas para produção de híbridos duplos. Destes duplos, um grupo de 20 híbridos foi reavaliado em solos ácidos e férteis e em solução nutritiva (Magnavaca *et al.*, 1988). Da mesma maneira como observado anteriormente para um grupo de linhagens avaliados em ambientes com diferentes níveis de acidez (Naspolini Filho *et al.*, 1981), no trabalho de Magnavaca *et al.* (1988) foram observados 3 tipos básicos de resposta

dentre os híbridos avaliados: a) Grupo 1, representado pelos HD 7 e HD 9 que mostraram altos valores de CRRS em solução nutritiva (130 e 107%), baixas médias de peso de espigas em 5 ambientes: 2 solos férteis e 3 solos ácidos (6616 e 7081 kg espigas/ha), com um coeficiente de regressão (b) menor que 1, indicando serem estes genótipos mais adaptados aos ambientes mais pobres (ácidos); b) Grupo 2, representado pelo híbrido comercial Pioneer 6875 com baixo valor de CRRS em solução nutritiva (16%, mostrando sua alta suscetibilidade à toxidez de alumínio), associado a uma alta média de produção nos 5 ambientes (8.050 kg espigas/ha) e com um coeficiente de regressão de 1,25 indicando que esta alta média foi devida ao seu melhor desempenho nos ambientes de alta fertilidade; c) Grupo 3, representado pelos híbridos HD 14 e HD 15, com médios níveis de tolerância ao alumínio em solução nutritiva (CRRS de 92% e 76%) associado a altas médias de produção (8.712 e 8.870 kg espigas/ha) e coeficientes de regressão próximos de 1, indicando sua adaptação tanto aos ambientes ácidos quanto aos ambientes férteis. O híbrido duplo HD 14 foi lançado pela EMBRAPA em 1986 com o nome de BR 201. Dentro desta linha de híbridos adaptados a solos ácidos e férteis e, com média a alta tolerância ao alumínio, foram posteriormente lançados os híbridos BR3123, BRS2110 e BRS3060.

Parentoni *et al.* (1999) descrevem um processo de avaliação de um grande grupo de híbridos simples em solos ácidos e solos com alto e baixo suprimento de fósforo, seguido de identificação de linhagens mais freqüentes entre os híbridos contrastantes quanto à sua eficiência a fósforo, obtenção de dialelo entre estas linhagens e avaliação destes dialelos em solos ácidos e férteis sob 2 níveis de fósforo. Foram avaliados 3 dialelos o primeiro entre 8 linhagens, o segundo entre 9 linhagens e o terceiro entre 13 linhagens. Alguns pontos verificados nestes estudos foram: a) os efeitos de CGC e CEC foram significativos nos 3 dialelos, entretanto, geralmente os efeitos aditivos para peso de espigas sob estresse de fósforo e em solo ácido, foram superiores aos efeitos não aditivos; b) a interação CGC x ambiente (com e sem restrição de fósforo) foi significativa nos 3 dialelos, enquanto a interação CEC x ambiente (com esem restrição de fósforo) foi não significativa nos 3 dialelos. Mudanças na capacidade combinatória de uma linhagem entre o ambiente sem estresse de fósforo para o ambiente com estresse de fósforo têm sido utilizadas para identificar linhagens contrastantes quanto à sua capacidade de produzir híbridos com maior ou menor grau de adaptação ao estresse de fósforo. Um ponto observado nos três dialelos mencionados acima foi que linhagens como as L 11, L 36, L 723 e L 161-1, com tolerância média a baixa à toxidez de alumínio em solução nutritiva, mas com alta capacidade combinatória em solo sob estresse de fósforo, também produziram híbridos superiores em solo com média saturação de alumínio (Parentoni *et al.*, 1996; Parentoni *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que em Latossolos sob níveis médios de acidez (36% de saturação de alumínio), eficiência na utilização de P pode vir a ser mais importante que tolerância à toxidez de alumínio. Um experimento que guarda relação com este tema foi conduzido por Baligar *et al.* (1997). Os autores avaliaram em 22 genótipos de milho, a interação entre 3 níveis de saturação de alumínio em um LE de Sete Lagoas com a taxa de eficiência no uso de fósforo ou NER-P (expressa em mg peso seco de parte aérea / mg de P na parte aérea). Os valores médios de NER-P para os 22 genótipos nos níveis de 2%, 41% e 64% de saturação de alumínio no solo

foram, respectivamente, de 368, 384 e 256 mg MSPA/mg P na parte aérea com um valor de menor diferença significativa a 5% de 52 mg MSPA/mg P. Estes dados mostram que no LE de Sete Lagoas, níveis de até 41% de saturação de alumínio não alteraram a eficiência na utilização de P em relação àquela obtida no LE corrigido (2% saturação Al). Este fato concorda com a hipótese acima de que genótipos de milho com baixa tolerância ao alumínio em solução nutritiva e eficientes na utilização de P obtida quando avaliados sob 2 níveis de P em LE corrigido (0% Al), têm mostrado bom desempenho em áreas com níveis de 36% de saturação de alumínio neste mesmo LE, indicando que seu bom desempenho em solo ácido pode estar ligado a sua maior eficiência na utilização de fósforo.

Salinas & Sanches (1977) avaliaram 6 cultivares de milho em um Latossolo Vermelho Escuro com alta saturação de alumínio e baixos níveis de P. A cultivar Agroceres 259 foi considerada muito tolerante, as cultivares Cargill 111 e Agroceres 152 foram consideradas tolerantes e a cultivar Braskalb XL-45 A foi muito sensível. Entretanto, o *ranking* das cultivares foi dependente do nível de P no solo, com todas as cultivares sendo menos sensíveis ao alumínio nos níveis mais altos de fósforo e ainda menos sensíveis a baixos níveis de P na ausência de alumínio.

O programa de adaptação de milho a solos ácidos com alta saturação de alumínio do CIMMYT tem sua base física em área do CIAT em Cali na Colômbia. Os resultados obtidos como parte deste programa foram recentemente discutidos por Narro *et al.* (1999). Foram desenvolvidas seis populações de milho para tolerância a solos ácidos, sendo 3 amarelas (SA3, SA4 e SA5) e três brancas (SA6, SA7 e SA8). Tem sido identificada suficiente variância genética aditiva nestas seis populações em solos ácidos que permitiria progresso genético via seleção recorrente. Os métodos de avaliação de progênies de meios-irmãos, irmãos completos e S_1's em diferentes combinações têm sido utilizados nestas populações. Na população SA3 foram avaliados 14 ciclos de seleção em solos ácidos utilizando meios-irmãos e 2 ciclos de irmãos completos (Granados *et al.*, 1993). Os ganhos por ciclo nos 14 ciclos de meios-irmãos e nos dois ciclos de irmãos completos nos ambientes ácidos foram de 1,99% e 13,96% e em solos férteis estes ganhos foram de 1,10% e 3,31%, respectivamente. Pandey *et al.* (1994a, b) relatam ganhos médios por ciclo para dois ciclos de seleção em solos ácidos nas populações SA4, SA6 e SA7 de aproximadamente 3%, 4,5% e 10%, mencionando ainda que ganhos similares foram obtidos nas avaliações em solo fértil. Pandey *et al.* (1996) avaliaram ciclos de seleção nas 6 populações de solos ácidos do CIMMYT, variando de 2 ciclos a 4 ciclos de seleção por população. Estes ciclos foram avaliados em 5 solos ácidos com alta saturação de alumínio, dois ambientes não ácidos mas de baixa fertilidade natural e um solo fértil. Os autores reportam um ganho médio por ciclo, considerando em conjunto todas as 6 populações, de 4,75%, 2,99% e 1,85% respectivamente para os ambientes ácidos, os ambientes de baixa fertilidade e o ambiente com solo fértil, indicando possibilidade de progresso simultâneo para os três ambientes via seleção recorrente. A heterose entre estas 6 populações foi avaliada (Pandey *et al.*, 1994a,b) e com base nestes dados as populações SA3 e SA5 foram agrupadas em uma só população, o mesmo ocorrendo com as populações SA7 e

SA8. Desta maneira foram formados dois pares heteróticos do tipo dente x flint (Narro *et al.*, 1997) um amarelo (SA4 x SA3) e outro branco (SA6 x SA7). O programa de híbridos para solos ácidos do CIMMYT tem-se baseado na avaliação de linhagens *per se* em solo com alta saturação de alumínio e em solo fértil e ainda avaliação de linhagens em *top-cross*. As 10 melhores linhagens de cada população têm sido utilizadas na formação de sintéticos. Narro *et al.* (1999) reportam valores de heterose em híbridos simples avaliados em solos ácidos de 300% quando o rendimento dos híbridos atinge de 3 a 4 t/ha, sendo observado heterose de até 1.000%, devido principalmente ao baixo rendimento de uma das linhagens quando avaliada em solo ácido.

O delineamento I de Norte Carolina foi utilizado para estudo de herança da tolerância à acidez do solo em 256 progênies avaliadas em um ambiente fértil e três solos ácidos em 1990/91 (Duque Vargas *et al.*, 1994). Nos solos ácidos, a variância genética aditiva foi superior a variância genética de dominância (0,15 e 0,13, respectivamente). Estimativas de herdabilidade utilizando medias de família de meios-irmãos foram de 36,3 ± 20,0 %. Entre os componentes de variância genética para produção, a interação do tipo variância aditiva x ambientes foi o componente mais importante. Apesar de ter sido verificada correlação alta e positiva entre número de espigas por planta e produção em solos ácidos (r=0,84), os autores concluíram que seleção direta para produção em solos ácidos seria mais eficiente que seleção indireta baseada em prolificidade. A magnitude dos valores da variância aditiva e da interação variância aditiva x ambiente encontrados levaram os autores a sugerir que seleção recorrente baseada em avaliação em múltiplos ambientes seria eficiente para seleção para produção de grãos em solos ácidos em milho.

Pandey *et al.* (1994) relatam resultados de um cruzamento dialélico entre populações de milho, sendo seis tolerantes e duas sensíveis ao Al. As oito populações e seus 28 cruzamentos foram avaliadas em sete locais com solos ácidos. Os autores observaram que cruzamentos do tipo tolerante x tolerante, produziam mais (média de 3 t/ha) que os cruzamentos entre tolerantes e sensíveis (média de 2,4 t/ha) e que os cruzamentos apenas entre sensíveis (média de 2,01 t/ha). Os autores reportam ainda que a CGC foi altamente significativa para todas as características estudadas, enquanto a CEC somente foi significativa para número de espigas/planta.

8.4 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO / ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM SORGO

Sorgo é originário em sua maioria de regiões semi-áridas onde predominam solos alcalinos. Esta espécie é em geral bastante sensível à toxidez de alumínio apresentando, entretanto, grande variabilidade intra-específica para esta característica (Howeler, 1991). Uma amostragem de acessos de áreas de solos ácidos da África foi feita por Gourley (1983) dentre os 33.000 acessos existentes no *International Center for Research in the Semi-Arid Tropics* (ICRISAT) na Índia. O autor encontrou maior percentagem de germoplasma tolerante entre coleções de sorgo provenientes do Quênia, Nigéria e Uganda, entretanto, mesmo nestas regiões, menos de 8% dos acessos avaliados foram tolerantes ao alumínio (Gourley, 1988). O autor reporta que a raça Guinea e híbridos Guinea-bicolor mostraram maior número de acessos tolerantes à acidez e que entradas da raça Caudatum originárias do Quênia e Uganda,

foram aquelas com maior número de características agronômicas favoráveis e mais alta produção de grãos sob acidez.

Variabilidade genética para tolerância ao alumínio em sorgo vem sendo encontrada em solução nutritiva (Furlani & Clark, 1981; Furlani & Clark, 1987) e em solo ácido (Duncan, 1981; Flores *et al.*, 1988). Furlani *et al.* (1991) avaliaram quatro genótipos de sorgo em solução nutritiva com 0; 0,083; 0,167 e 0,250 mM de Al, mantendo os genótipos na solução até a maturação fisiológica e em quatro solos com saturação de alumínio variando de 0% a 59%. O parâmetro utilizado para avaliar tolerância em solução nutritiva foi o comprimento da raiz e, em solo, o parâmetro utilizado foi produção de massa seca de 10 plantas colhidas na fase de 50% de florescimento e avaliação da distribuição de raízes no solo neste estádio. No ensaio de solo os genótipos SC283 e SC175-14 foram aqueles que tiveram a produção de massa seca de parte aérea menos afetada pela acidez e, TX415 e SC208, foram os mais afetados, mostrando sistema radicular mais superficial. As cultivares tolerantes tiveram 21,5% e 37,7% do seu sistema radicular abaixo de 20 cm, enquanto para as cultivares sensíveis este valor foi de 13,1% e 15,1%, indicando nestas últimas cultivares, um sistema radicular mais superficial e incapaz de crescer nas camadas mais ácidas do solo. Os resultados de crescimento de raiz na solução nutritiva mostraram a mesma classificação dos genótipos encontrada em solo ácido.

Borgonovi *et al.* (1987) avaliaram grande número de genótipos de sorgo em solução nutritiva com 4,8 mg Al/l e em solo ácido com 40% a 50% de saturação de alumínio. Os autores verificaram que a maioria dos genótipos tolerantes era de porte alto, tardio, sensível ao acamamento e pouco produtivo. A cultivar SC-283 ficou entre os mais tolerantes. Pitta *et al.* (1979) avaliaram 1.200 linhagens de sorgo em solos com saturação de alumínio de 40% a 60%. As linhagens mais tolerantes eram originárias de Uganda e da Tanzânia, concordando com avaliações em solução nutritiva de 108 genótipos de sorgo feitas por Duncan (1983) onde os acessos mais tolerantes eram da Tanzânia, Índia, Sudão e Etiópia. Também Gourley (1987) avaliando 775 acessos de sorgo em solo com 63% de saturação de alumínio encontrou que os mais tolerantes foram originados do Quênia e Uganda. Pitta & Santos (1992) reportam ainda que, linhagens de sorgo originárias de Uganda e selecionadas pela sua tolerância ao alumínio (CMSXS189, 3DX57/1/1/9/D, CMSXS208, 5DX61/6/2, CMSXS 209 e IS2744) mostraram-se também mais eficientes na utilização de P e K .

Borgonovi *et al.* (1986) listam um grupo de 19 linhagens de sorgo, a maioria introduzidas da África, as quais mostraram tolerância à toxidez de alumínio quando avaliadas em diferentes condições (solução nutritiva, vasos em casa de vegetação e em campo). Várias destas linhagens mostraram-se tolerantes em um tipo de avaliação (por exemplo solo ácido), mas mostraram suscetibilidade em outro tipo de avaliação (solução nutritiva com alumínio por exemplo), indicando a dificuldade de transposição direta de resultados de um tipo de *screening* para outro.

A utilidade do uso de solução nutritiva como ferramenta de *screening* para tolerância ao alumínio em sorgo foi demonstrada por Furlani *et al.* (1991). Os autores encontraram correlação positiva entre os resultados de avaliação em solução nutritiva por 8 dias e avaliação de massa seca produzida no florescimento, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,77%.

Bastos (1982) utilizou solução nutritiva (Furlani & Clark, 1981) com 222 mm de alumínio e 0,75 ppm de P em plântulas com 12 dias para estudar progresso genético em seleção para tolerância ao alumínio em diversos pares de F_2 obtidos do cruzamento de genitores contrastantes para tolerância ao alumínio. O autor encontrou que a média dos F_3 obtidos a partir de seleção dos 5% F_2 mais tolerantes em cada cruzamento não foi diferente da média dos F_2 originais, indicando a não eficiência do tipo de seleção utilizada. Baseado em comparação entre resultados de avaliação de genótipos de sorgo em campo e em solução nutritiva com alumínio, Gourley *et al.* (1990) sugerem que crescer plântulas de sorgo em solução nutritiva por um período mais longo (30 dias) aumentaria a correlação entre os dados obtidos com aqueles obtidos ao nível de campo. Estes autores mencionam que nestes estudos, a massa de raiz adventícia foi o parâmetro com maior correlação com comportamento ao nível de campo.

Malavolta *et al.* (1981) avaliaram 30 híbridos de sorgo em solução nutritiva com 12 mg Al/l. Os autores verificaram que a cultivar Taylor Evans Y 101 foi uma das mais tolerantes. Salinas & Sanchez (1977) avaliaram 5 híbridos de sorgo em solução nutritiva com alumínio. Os autores também encontraram que a cultivar Taylor Evans Y101 foi a mais tolerante, enquanto TX 7078 foi considerada a mais sensível à toxidez de alumínio. Ritchey *et al.* (1991) avaliaram diversas fontes de germoplasma de sorgo para tolerância ao alumínio em solo e solução nutritiva. Os autores relatam que as cultivares SC-283 e PR5BR foram muito tolerantes, enquanto FS 25 e Greenleaf foram altamente sensíveis.

Howeler (1987) menciona que o uso de avaliação em campo é a chave para o sucesso em um programa de seleção de genótipos de sorgo para tolerância à toxidez de alumínio e alta acidez. Zeigler *et al.* (1995) mencionam que a maioria dos testes rápidos para tolerância ao alumínio (hematoxilina ou testes de solução mínima do tipo *pulse and phase*) não é adequado para sorgo, apesar de serem encontrados diversos resultados na literatura utilizando estes testes. Nestes trabalhos de *screening*, em geral, não é feita confirmação dos resultados dos mesmos ao nível de solo com alta saturação de alumínio. O fato de que linhagens de sorgo sensíveis ao alumínio produzem inicialmente plântulas sadias em solo com 65% de saturação de alumínio, mas que as mesmas morrem após certo período sugerem que em sorgo, avaliações ao nível de plântula não seriam parâmetros de avaliação muito indicados (Zeigler *et al.*, 1995). Estes autores mencionam ainda que a raiz primária de plântulas de sorgo não é muito afetada em solo ácido, mas quando esta raiz morre 2 a 4 semanas após a germinação, apenas genótipos tolerantes produzem volume suficiente de raízes adventícias para sustentar o crescimento da planta.

Estudo avaliando massa seca de raiz e parte aérea em plântulas de sorgo com 3 semanas em casa de vegetação utilizando Latossolos de alta saturação de alumínio (> 70 %) da região dos Lhanos da Colômbia, encontrou baixa correlação entre os resultados obtidos em vasos e *performance* de campo, indicando ser difícil utilizar estes indicadores em programas de seleção para tolerância ao alumínio em sorgo (Gourley, 1983; Gourley *et al.*, 1990).

Elongação de raiz foi avaliada em plântulas de 5 genótipos de sorgo e 20 genótipos de milheto crescendo por 3 dias em um solo sem acidez e em 4 solos

com saturação de alumínio variando de 50%, 57%, 65% e 89% (Ahlrichs *et al.*, 1991). O parâmetro utilizado foi a relação crescimento de raiz seminal no solo ácido em relação ao solo corrigido (% RRL). Somente foi possível discriminar entre os genótipos de sorgo no solo com 50% de saturação de alumínio, já que nos outros níveis ocorreram danos severos as raízes de todas as cultivares. Os genótipos SC283 e P93217 foram os mais tolerantes neste nível de saturação de alumínio e o genótipo TAM428 foi o mais sensível. Todos os genótipos de milheto avaliados mantiveram crescimento de raiz seminal em todos os níveis de acidez no solo. Os valores da redução no crescimento de raiz seminal dos genótipos de milheto nos quatro níveis de alumínio no solo foram de 4%, 22%, 48% e 52%. A média de RRL no solo com 89% de saturação de alumínio foi de 17% para os genótipos de sorgo e 78% para os genótipos de milheto, indicando maior nível de tolerância ao alumínio nesta última espécie em relação àquele encontrado em sorgo.

Gourley (1987) avaliou 19 cultivares de sorgo em solo ácido com 0,5; 1,5 e 4 t de calcário/ha na Colômbia. A cultivar IS8577 foi a mais tolerante produzindo 5 t/ha com 63% de saturação de alumínio.

O acúmulo de alumínio em folhas coletadas após a maturação fisiológica em 26 genótipos de sorgo foi avaliado por Gourley e colaboradores, citado por Ziegler *et al.* (1995). Foram determinados os dois genótipos com maior e menor acúmulo de alumínio em folhas. Dois genótipos previamente conhecidos como tolerantes ao alumínio (Sorghica Real 40 e Sorghica Real 60) situaram-se um deles entre os dois maiores acumuladores de alumínio em folhas (Sorghica Real 40) e o outro (Sorghica Real 60) entre os dois menores acumuladores de alumínio, indicando que este fator não é adequado para discriminar genótipos tolerantes e sensíveis à toxidez de alumínio em sorgo.

Flores *et al.* (1991) cresceram 40 híbridos F_1 e seus 14 genitores em dois solos ácidos em Quilichao na Colômbia, com saturações de alumínio de 40% e 70%. Dentre os parâmetros avaliados estavam uma escala visual de tolerância (notas de 1 a 4) determinada na colheita, número de raízes, e produção de grãos. Foi encontrada correlação positiva (r=0,51) entre a escala visual de tolerância e o peso de grãos. Os efeitos de CGC foram superiores aos de CEC para as características estudadas. A produção de grãos e o número de raízes em cruzamentos do tipo tolerante x sensível foram superiores aos valores obtidos para estas características para cruzamentos do tipo sensível x sensível.

Ziegler *et al.* (1995) reportam avaliação de um dialelo envolvendo cinco machos tolerantes ao alumínio e cinco fêmeas de sorgo suscetíveis ao alumínio, em um solo com 77% de saturação de alumínio em Quilichao na Colômbia. Os autores reportam que efeitos aditivos foram superiores aos não aditivos e as diferenças entre híbridos foram devidas principalmente aos efeitos das linhagens fêmeas. A CEC para peso de grãos só foi significativa para um cruzamento, fazendo com que nesse estudo, os valores de CGC fossem o melhor preditor de *performance* dos híbridos F_1 avaliados. Dentre as linhagens fêmeas e machos utilizadas, aquelas com média mais alta tanto *per se* quanto de CGC para peso de grãos foram, respectivamente, a linhagem fêmea Wheatland e a linhagem macho MN 4508.

Híbridos de sorgo com um ou ambos os pais tolerantes à acidez do solo foram mais produtivos que os pais ou que híbridos do tipo suscetível x suscetível em dois anos de avaliação em quatro solos ácidos do Quênia (Zake *et al.*, 1992). Entretanto os autores mencionam que uma variedade local produziu mais que a maioria dos pais e dos híbridos em todas as localidades avaliadas, indicando a necessidade de realizar melhoramento na área alvo para onde os mesmos serão direcionados.

Seleção para tolerância ao alumínio e adaptação a solos ácidos em sorgo, em geral, começa com avaliação a campo de fontes de genes de macho-esterilidade citoplasmática de maneira que as linhagens resultantes possam vir a ser utilizadas tanto como variedades ou genitores em programas de híbridos (Ziegler *et al.*, 1995). Uma vez que a característica de restaurador ou não restaurador seja determinada para uma linhagem exótica, a mesma pode ser cruzada com linhagens elite com a mesma resposta quanto a restauração. O autor sugere a utilização do método de *pedigree* para utilização em programas de desenvolvimento de genótipos para solos ácidos, sugerindo intensidade de seleção em F_3 de cerca de 2%. As F_3 selecionadas são então avançadas para F_5 e avaliadas para outras características agronômicas.

Duncan (1981) desenvolveu uma população de sorgo tolerante à acidez do solo denominada GP1r recombinando genótipos tolerantes, tais como SC283, SC175-14 e S322.

8.5 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM SOJA, FEIJÃO E AMENDOIM

Geralmente, soja é considerada como cultura sensível à toxidez de alumínio (Sanchez & Salinas, 1981; Howeler, 1991) e os níveis de saturação de alumínio limitantes a esta cultura são em geral mais baixos que aqueles citados para milho (Kamprath, 1984). Entretanto, resultados opostos são citados por Soares *et al.* (1975). Um dos fatores que podem explicar discrepâncias observadas entre resultados de avaliação de tolerância ao alumínio em genótipos de soja conduzidos em solo ácido ou em solução nutritiva pode ser a ocorrência ou não de deficiência de molibdênio (Hanson, 1991; Foy *et al.*, 1992). Farina citado por Edmeads *et al.* (1995), encontrou que, em um Latossolo na África do Sul com 48% de saturação de alumínio, a produção de uma mesma cultivar de soja sem e com aplicação de molibdênio foi de 687 e 1.874 kg/ha. Este autor mostrou ainda que, com níveis adequados de molibdênio, soja é menos responsiva a calagem do que milho, indicando maior tolerância à acidez em soja que em milho, nesta condição. Miranda *et al.* (1988) sugerem que os sintomas de requeima associados com um aumento nos níveis de nitrato em tecido de plantas de soja deficientes em molibdênio – causados pela redução em atividade de nitrato redutase – poderiam vir a ser utilizados como um índice de seleção em programas de melhoramento de soja para adaptação a solos ácidos.

Piha & Nicholaides (1983) avaliou 27 cultivares de soja em um solo com 67% de saturação de alumínio no Peru. Nenhuma das cultivares apresentou produção relativa superior a 60%. As cultivares ICA-Tunja, SJ-2 e Hardee foram as mais tolerantes enquanto Jupiter, Tunia e Improved Pelican foram sensíveis mas com alta produção em solo corrigido.

Spehar (1994) avaliou 184 genótipos de soja em solos com elevada e baixa saturação de Al. Foram medidos os parâmetros conteúdo de nutrientes em folhas colhidas no florescimento, peso de planta e produção de semente. Os genótipos foram agrupados em classes de similaridade, por análise de *cluster*. A variação do *cluster* foi maior no solo com elevado Al do que no solo com baixo Al, indicando que a tolerância ao Al foi mantida em germoplasma agronomicamente adaptado, visto que os genótipos foram homogêneos para a maioria das características avaliadas. O autor concluiu que isto pode ser uma conseqüência da seleção em solos apenas parcialmente corrigidos, que contêm Al nas suas camadas mais profundas.

Feijão é uma das espécies mais sensíveis à acidez do solo, mas com grande variabilidade para esta característica (Howeler, 1991). Em geral, melhores níveis de tolerância ao alumínio são encontrados em feijões do tipo preto enquanto comumente os chamados feijão de cor são altamente sensíveis à toxidez de alumínio (Spain *et al.*, 1975). Cultivares originados de germoplasma de feijão de áreas de solos ácidos do Brasil, via de regra são mais tolerantes ao alumínio (Thung *et al.*, 1987). Exemplos de cultivares mais tolerantes ao alumínio em feijão são: Carioca, Brasil 239 e Iguaçu. Salinas & Sanchez (1977) relataram que as cultivares Carioca 1030 e Rico Pardo 869 foram tolerantes a alta saturação de alumínio e baixos níveis de P no solo , enquanto Mantegão Fosco e Caraota 260 foram muito sensíveis. Malavolta *et al.* (1981) em ensaio com solução nutritiva mencionaram que as cultivares Iguaçu, Jalo, Mulatinho Paulista, P704 e Roxo 760 foram tolerantes ao alumínio.

Cultivares de amendoim em geral possuem níveis médios de tolerância à toxidez de alumínio (Howeler, 1991). Em solo com 82% de saturação de alumínio do Peru, as cultivares UF 78307 e UF 78305 mostraram produção relativa de 6% e foram consideradas tolerantes. As cultivares Blanco Tarapoto e NC-6 foram muito sensíveis (Nicholaides & Piha, 1987).

8.6 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM MANDIOCA E BATATA-DOCE

Mandioca é uma das culturas mais tolerantes à toxidez de alumínio, sendo bastante cultivada principalmente em solos ácidos e de baixa fertilidade. Mandioca mostra alta associação com micorrizas, sendo por esta razão tolerante a baixos níveis de P no solo (Howeler *et al.*, 1987). O alto nível de tolerância da espécie torna difícil atingir níveis de saturação de alumínio no solo que permitam discriminação intra-específica de tolerância. Nesta cultura, em geral calagem afeta negativamente a produção por induzir deficiência de zinco (Spain *et al.*, 1975). Cultivares com alto nível de tolerância ao alumínio são M Bra 5, M Bra 20, M Bra 41, SM 301-3, CM 2177-2 e CM 527-7 (CIAT, 1988). Esta última linha foi liberada pelo ICA-Catumare para cultivo em solos ácidos dos Lhanos Colombianos (Howeler, 1991).

Batata-doce é intermediária em tolerância ao alumínio. Piha & Nicholaides (1983) relataram as cultivares Modelo-2, Tambor e Navarro como tolerantes ao alumínio. Avaliação de grande número de cultivares em solução nutritiva, casa de vegetação e em campo foi feita por Sangalang & Bouwkamp (1988). Os autores reportaram que o clone Rojo Blanca foi o mais tolerante e, Painter e Redmar os clones mais sensíveis.

Ritchey (1991) avaliou crescimento da raiz mais longa em sete genótipos de batata-doce após seis dias em solução nutritiva com três níveis de alumínio (0,03; 0,06 e 0,12 mM Al) e produção de tubérculos em solos de Porto Rico com saturação de alumínio variando de 9% a 59% em seis níveis de calagem. O autor encontrou uma relação linear entre o comprimento da raiz mais longa (solução nutritiva) e o comprimento total de raízes em solução nutritiva (R^2=0,65 **). Os genótipos FRAS 48 e Gem foram mais tolerantes ao alumínio em solução nutritiva e o genótipo SPV 80 foi o mais sensível. A produção de raízes no nível mais alto de acidez foi reduzida em média 72% em relação ao solo corrigido. Os genótipos FRAS 48 e SPV56 foram os mais tolerantes a alta acidez do solo. O autor encontrou correlação de 0,75 entre produção de tubérculo em solo com pH 3,4 e comprimento da raiz mais longa em solução nutritiva.

8.7 SELEÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO/ADAPTAÇÃO A SOLOS ÁCIDOS EM LEGUMINOSAS FORRAEIRAS E ESPÉCIES FLORESTAIS

Caupi é provavelmente a leguminosa mais tolerante à acidez (Howeler, 1991). Nicholaides & Piha (1987) verificaram que dentre 27 linhas de caupi avaliadas em solo com 63% de saturação de alumínio, 23 destas linhas produziram menos quando o solo foi corrigido. As cultivares Vita 8 e TVS 1999-01F foram altamente produtivas em solo ácido. Em outro *screening* em solo com 71% de saturação de alumínio as cultivares TVX 1836-013J, Vita 4 e Vita 6 foram altamente tolerantes.

Stylosanthes capitata é altamente adaptado a solos ácidos e cresce muito pouco em solos com pH mais elevado (Burt, 1984).

Leguminosas forrageiras tropicais como *Pueraria phaseoloides, Zornia* sp. ou *Stylosanthes capitata* não respondem a correção de acidez do solo, como ocorre em espécies mais sensíveis à acidez como *Centrosema* spp. (Ziegler *et al.*, 1995). Programa de seleção para transferir tolerância à acidez do solo de *Centrosema cutifolium* e *Centrosema macrocarpum* para *Centrosema pubescens* utilizando avaliação em solo e solução nutritiva com alumínio é mencionado por Hutton (1985). O autor concluiu que tolerância a acidez do solo em *Centrosema* spp. deve-se mais a um aumento na capacidade de absorver cálcio em ambientes ácidos do que propriamente à tolerância à toxidez de alumínio.

Leucena (*Leucaena leucocephala*) tem sido uma das espécies de leguminosas arbustivas mais plantadas em regiões tropicais, apesar de não adaptada a condição de acidez do solo (Kerridge, 1991).

Mucuna pruriens é moderadamente tolerante a presença de alumínio (até 185 mm) mas esta espécie desenvolve um sistema radicular muito superficial em solos ácidos (Kurniatun *et al.*, 1995).

A tolerância ao alumínio em solução nutritiva com baixa força iônica e concentração de alumínio variando de 0 a 25 mm/l foi determinada em 35 leguminosas temperadas (Wheeler & Dodd, 1995). O índice utilizado foi a atividade de alumínio na solução necessária para causar uma redução de 50% na massa seca de raiz. As espécies mais tolerantes foram *Trifolium subterraneum* e *Lotus penduculatus*, enquanto as mais sensíveis em geral foram as do gênero *Medicago* e *Melilotus*. Os

autores mencionam ainda não ter sido encontrada nenhuma relação entre nível de ploidia e tolerância ao alumínio nas espécies estudadas. Evans *et al.* (1990) em estudos utilizando solos ácidos, também encontraram que *Trifolium subterraneum* foi mais tolerante à acidez que *Medicago truncatula*.

Ashwarth *et al.* (1995) avaliaram tolerância à acidez em 36 espécies nativas de Acácia da Austrália utilizando dois tipos de solos ácidos. Tolerância foi medida utilizando-se a relação entre produção de massa seca de parte aérea no solo sem correção dividida por aquela obtida em solo corrigido, para cada um dos dois solos utilizados. O valor do índice utilizado para classificação foi: altamente tolerante (> 110%), tolerante (90-110%), moderadamente tolerante (70-90%), sensível (< 70%). Os autores constataram que o *ranking* de classificação das cultivares quanto a sua tolerância à acidez foi diferente nos dois solos.

Mackay *et al.* (1991) avaliaram nove espécies de leguminosas forrageiras e 10 gramíneas forrageiras de clima temperado para tolerância ao alumínio em solo com diferentes níveis de alumínio. A gramínea *Paspalum dilatatum* mostrou a mais alta tolerância ao alumínio entre as 19 forrageiras estudadas. Entre as leguminosas, a mais tolerante ao alumínio foi a denominada Pink Serradella (*Ornithopus sativa*).

Um dialelo entre três linhagens de trevo-branco (*Trifolium repens*) tolerantes e três suscetíveis ao alumínio foi avaliado por 12 semanas em vasos contendo solo corrigido e com 400 g Al/g solo (Caradus & Mackay, 1995). Os autores verificaram um aumento na concentração de Al, Ca, Fe, S e Sr e decréscimo na concentração de Cu, K e P em cruzamentos do tipo tolerante x tolerante quando comparados com cruzamentos do tipo tolerante x sensível ou sensível x sensível. Os autores observaram que a maior freqüência de cruzamentos tolerantes ao alumínio e com alta produção de massa seca foram provenientes de cruzamentos do tipo tolerante x tolerante ou tolerante x suscetível. Foi verificada distribuição contínua e unimodal para a tolerância ao alumínio, sugerindo controle poligênico desta característica em trevo-branco. Caradus *et al.* (1991) reportaram que tolerância ao alumínio em trevo-branco deve ser controlada por pelo menos cinco genes dominantes.

Campbell *et al.* (1993) verificaram alto efeito de CGC para peso de matéria seca em um dialelo envolvendo seis cultivares de alfafa avaliados em solução nutritiva com alumínio. Os autores mencionam ainda que, baseado nestes dados, um esquema de seleção massal ou outro tipo de seleção recorrente, deve ser efetivo para elevar o nível de tolerância ao Al nestas populações.

No Sudeste da Ásia, solos ácidos ocupam uma larga área, com Ultisols compreendendo cerca de 50% dos solos cultivados da região e Oxisols cerca de 4% (Pushparajah & Bachik, 1987). Em termos de acidez, cerca de 118 dos 180 millhões de ha na região tem pH abaixo de 5. Os níveis de saturação de Al na camada de 0-20 cm nestas áreas é de 45%, chegando a 96% abaixo de 30 cm. As culturas que prevalecem nesta região incluem dendê (*Elaeis guineensis*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*), que crescem bem em pH variando de 4,2 a 5. O sistema de cultivo de seringueira na Malásia é um exemplo de sistema estável de utilização de solos ácidos e com alta saturação de alumíno para exploração comercial.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro do tópico de agricultura sustentável, um ponto que deverá se tornar cada vez mais importante é a seleção de genótipos capazes de maximizar a utilização dos insumos e minimizar o risco imposto pela combinação de diversas características restritivas do ambiente. Isto sinaliza na direção de um aumento dos programas de seleção para adaptação a estresses como toxidez de alumínio e eficiência na utilização de nutrientes em diversas culturas. Neste aspecto, o desenvolvimento/otimização de múltiplos processos de avaliação para fatores de toxidez (Al, Mn etc.) e para fatores de eficiência nutricional (P, N, Ca, Mg, K, micronutrientes etc.) devem acelerar o progresso nesta área.

O grande avanço na área de biologia molecular deve também causar impacto no entendimento dos mecanismos ligados à tolerância à toxidez de alumínio e, ainda, na compreensão dos processos que levam a uma maior eficiência no uso de nutrientes. Esperam-se também progressos significativos na área de identificação e manipulação de genes controlando estas características.

Um ponto que pode reduzir a velocidade dos avanços nesta área é a disseminação ao nível mundial das leis de proteção de cultivares, podendo levar a uma restrição no fluxo de germoplasma bem caracterizado para os diversos estresses tanto entre países quanto entre instituições. Entretanto, devido ao valor estratégico destas linhas de pesquisa em termos de segurança alimentar para vários países do mundo, principalmente aqueles situados na região tropical, espera-se nos próximos anos grandes avanços na área de seleção de plantas para tolerância ao alumínio e adaptação a solos ácidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOU, M.; GOURLEY, L.M.; WATSON, C.E.; MCLEAN, S.D.; GOGGI, A. Evaluation of combining ability of acid soil tolerant sorghum germplasm in Niger. **Agronomy Abstracts**, p.88, 1992.

AHLRICHS, J.L.; DUNCAN, R.F.; EJETA, N.; HILL, P.R.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J.; HANNA, W.W. Pearl millet and sorghum tolerance to aluminium in acid soil. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.947-951.

ALLURI, K. Screening rice varieties in acid upland soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Progress in upland rice research**: proceedings of the 1985 Jakarta conference. Manila, 1986. p.263-270.

ALVA A,K.; BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. An evaluation of aluminum indexis to predict aluminum toxicity to plants grown in nutrient solutions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.17, p.1271-1280, 1986a.

ALVA, A.K.; EDWARDS,D.G.; ASHER,C.J.; BLAMEY, F.P.C. Relationships between root lenght of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. **Soil Science Society of America Journal**, v.50, p.959-962, 1986b.

ANIOL, A. Aluminium uptake by roots of two winter wheat varieties of different tolerance to aluminium. **Biochemic und Physiologie der Pflazen**, v.178, p.11-20, 1983.

ANIOL, A. Genetics of acid tolerant plant. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.101-117.

ANIOL, A. The aluminum tolerance in wheat. In: RUZGAS, V.; LEMEZIS, E.; APANAVICIENE, M.; BASLULLS, A.; BILLS, J. (Ed.) **Plant breeding**: theories, achievements and problems; proceedings. Kedainiai, Lithuania, 1997. p.14-22.

ANIOL, A.M. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant Soil**, v.123, p.223-227, 1990.

ARAÚJO, J.E.G. Aluminium toxicity, a possible cause of crestamento in wheat. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2., Campinas, 1949. **Anais**. Campinas: SBCS, 1949. p.329-337.

ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. Modern solution culture techniques. In: LAUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p.94-119. (Encyclopedia of Plant Physiology)

ASHWARTH, N.; DART, P.J.; EDWARDS, D.G.; KHANNA, P.K. Tolerance of Australian tropical and subtropical Acacias to acid soil. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAYMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. London: Kluwer Academic, 1995. p.249-253.

BAHIA FILHO, A.F.C.; FRANÇA, G.E.; PITTA, G.V.E.; MAGNAVACA, R.; MENDES, J.F.; BAHIA, F.G.F.T.; PEREIRA, P. Avaliação de linhagens e populações de milho em condições de elevada acidez. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 11., Piracicaba, 1976. **Anais**. Piracicaba: USP/ESALQ, 1978. p.51-58

BAHIA FILHO, A.F.C.; MAGNAVACA, R.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C. Identification, utilization and economic impact of maize germplasm tolerant to low level of phosphorium and toxic level of exchangeable aluminium in Brazilian Soil. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H.(Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1997. p.59-70.

BALIGAR, V.C.; PITTA, G.V.E.; GAMA, E.E.G.; SCHAFFERT, R.E.; BAHIA FILHO, A.F.C.; CLARK, R.B. Soil acidity effects on nutrient use efficiency in exotic maize genotypes. **Plant and Soil**, v.192, p.9-13, 1997.

BARBER, S.A. Efficient fertilizer use. In: PATTERSON, F.L. (Ed.) **Agronomic research for food**. Madison: ASA, 1976. p.13-29. (Special Publication, 26).

BASTOS, C.R. Inheritance study of aluminium tolerance in sorghum in nutrient culture. Mississippi: Mississipi State University, 1982. 80p. Thesis (Ph.D)

BASU, U.; STEPHENS, J. L.M.; ARCHAMBAULT, D.J.; GOOD, A.G.; BRIGGS, K.G.; AUNG, T.; TAYLOR, G.J. Genetic and physiological analysis de doubled-haploid, aluminum-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 KDa, root exudate polypeptide in mediating resistance. **Plant and Soil**, v.196, p.283-288, 1997.

BERZONSKY, W.A. The genomic inheritance of aluminum tolerance in "Atlas 66" wheat. **Genome**, v.35, p.689-693, 1992.

BIANCHI-HALL, C.M.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W.; ARELLANO, C.; BOERMA, H.R.; ASHLEY, D.A.; BURTON, J.W. Heritability and resource allocation of aluminum tolerance derived from soybean PI416937. **Crop Science**, v.38, p.513-522, 1998.

BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. Effects of aluminum, OH: Al and P: on molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. **Soil Science**, v.136, p.197-207, 1983.

BONA, L.; CARVER, B.F.; WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. Aluminum tolerance of segregating wheat populations in acidic soil and nutrient solutions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.25, p.327-339, 1994.

BORGONOVI, R.A.; SCHAFFERT, R.E.; PITTA, G.V.E. Breeding aluminum-tolerant sorghums. In: WORKSHOP ON EVALUATING SORGHUM OF TOLERANCE TO AL-TOXIC TROP. SOILS IN LATIN AMERICAN, Cali, 1984. **Sorghum for acid soils**: proceedings. Cali: CIAT, 1987. p.271-292.

BORGONOVI, R.A.; SCHAFFERT, R.E.; SNATOS, H.L.; PITTA,G.V.E. Introdução e avaliação de germoplasma de sorgo para tolerância a toxicidade de alumínio. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo; 1981-1984**, v.4, p.140, 1986.

BORKOWSKA, B. Experimental system for investigation of aluminium toxicity in fruit trees. In: WRIGHT , R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.999-1004.

BORLAUG, N.E.; DOSWELL, C.R. The acid lands: one of agriculture last fronties. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H.(Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1997. p.5-15.

BORRERO, J.C.S.; PANDEY, H.; CEBALLOS, R.; MAGNAVACA, R.; BAHÍA FILHO, A.F.C. Genetic variances, for tolerance to soil acidity in a tropical maize population. **Maydica**, v.40, p.283-288, 1995.

BRECKLE, A.W. Growth under stress: heavy metals. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. **Plant roots**: the hidden half. New York: Marcel Dekker, 1991. p.351-274.

BRIGGS, K.C.; TAYLOR, G.J.; STURGES, I.; HODDINOTT, J. Differential aluminum tolerance of high-yielding, early-maturing Canadian wheat cultivars and germplasm. **Canadian Journal of Plant Science**, v.69, p.61-69, 1989.

BROWN, J.C.; AMBLER, J.E.; CHANEY, R.L.; FOY, C.D. Differential responses of plant genotypes to micronutrients. In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L. (Ed.) **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, 1972. p.389-418.

BRUCE, R.C.; WARRELL L.A.; EDWARDS, D.G.; BELL, L.C. Effects of aluminium and calcium in the soil solution of acid soils on root elongation of *Glycine max* cv. Forrest. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.319-338, 1988.

BRUCE, R.C.; WARRELL, L.A.; BELL, L.C.; EDWARDS, D.G. Chemical atributes of some Queensland acid soils. I. Solid and solution phase compositions. **Australian Journal of Soil Research**, v.27, p.333-351, 1989.

BUOL, S.W. Assesstment and conquest of poor soils. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES, Lincoln, 1993. **Proceedings**. Lincoln: INTSORMIL, 1994. p.17-27. (Publications, 94-2)

BURT, R.L. Natural variation in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, P.A. (Ed.) **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Sydney: Academic Press, 1984. p.103-123.

BUTLER, G.W.; BARCLAY, P.C.; GLENDAY, A.C. Genetic and environmental differences in the mineral composition of ryegrass herbage. **Plant Soil**, v.16, p.214-228, 1962.

CAMARGO, C.E.O.; FELICIO, J.C.; NETO, A.T.; FERREIRA-FILHO, A.W.P.; PETTINELLI JR., A.; CASTRO, J.L. Wheat breeding: XXVIII. New genotypes obtained by selection in a segregating interspecific population submitted to gamma irradiation. **Bragantia**, v.54, p.51-85, 1995.

CAMARGO, C.E.O.; TULMANN NETO, A.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; FELICIO, J.C. ; CASTRO, J.L.; PETTINELLI JR., A. New wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes obtained by gamma irradiation. **Scientia Agricola**, v.54, p.195-202, 1997.

CAMARGO, C.E.O. Melhoramento do trigo: I. Hereditariedade da tolerância à toxicidade do alumínio. **Bragantia**, v.40, p.33-45, 1981.

CAMARGO, C.E.O. Melhoramento do trigo: VI. Hereditariedade da tolerância a três concentrações de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, v.43, p.279-291, 1984.

CAMARGO, C.E.O.; FELÍCIO, J.C. Wheat breeding at the Campinas Agronomic Institute. In: KOHLI, M.M.; RAJARAM, S. (Ed.) **Wheat breeding for acid soils**. Mexico: CIMMTT, 1988. p.39-49.

CAMARGO, C.E.O. Melhoramento do trigo: III. Evidência de controle genético na tolerância ao manganês e alumínio tóxico em trigo. **Bragantia**, v.42, p.91-103, 1983.

CAMPBELL, L.G.; CARTER JR., T.E. Aluminium tolerance in soybean: I. Genotypic correlation and repeatability of solution culture and greenhouse screening methods. **Crop Science**, v.30, p.1049-1054, 1990.

CAMPBELL, L.G.; LAFEVER, H.N. Inheritability of aluminum tolerance in wheat. **Cereal Research Communications**, v.9, p.281-287, 1981.

CAMPBELL, T.A.; XIA, Z.L.; JACKSON, P.R.; BALIGAR, V.C. Diallel analysis of tolerance to aluminum in alfafa. **Euphytica**, v.72, p.157-162, 1993.

CAMPBELL, T.A. Magnetic resonance imaging of absorbed aluminum in alfafa roots. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.827-834, 1999.

CANÇADO, G.M.A.; LOGUERCIO, L.L.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; PAIVA, E.; BORÉM,A.; LOPES, M.A. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.747-754, 1999.

CARADUS, J.R.; MACKAY,A .D. Distribution of Al-tolerance in crosses between genotypes of white clover selected for either al-tolerance or al-susceptiubility. In: DALE, R.A. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: principles and management. London: Kluwer, 1995. p.447-450.

CARADUS, J.R., MACKAY, A.D.; WEWALA, S. Selection for tolerance and susceptibility to aluminium within Trifolium repesns L. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.1029-1036.

CARVER, B.F.; WHITMORE, W.E.; SMITH, E.L.; BONA, L. Registration of four aluminum-tolerant winter wheat germplasms and two susceptible near-isolines. **Crop Science**, v.33, p.1113-1114, 1993.

CEBALLOS, H.; PANDEY, S.; NARRO, L.; PÉREZ-VELÁSQUEZ, J.C. Additive, dominant, and Epistatic Efeccts for Maize Grain Yield in Acid and Non-acid soils. **Theoretical Applied of Genetics**, v.96, p.662-668, 1998.

CHACON-SANCHEZ, C.D. Herança da tolerância e sensibilidade à toxicidade do alumínio em aveia (*Avena sativa* L.) Porto Alegre: UFRGS, 1998. 73p. Tese, Doutorado.

CHOUDHRY, M.A. Genetic differences for aluminum tolerance in five wheat crosses. **Agronomy Abstracts**, p.151, 1978.

CHRZASTEK, M.; MASLOWSKI, J.; MIAZGA, D. Location of genes controlling tolerance to aluminum ions in rye. **Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin**, n.195/196, p.313-316, 1995.

CIAT. **Cassava Program Annual Report for 1986**. Cali, 1988. (Working Document Number, 43)

CLARK, R.B. Effect of aluminum on growth and mineral elements of Al-tolerant and Al – intolerant corn. **Plant Soil**, v.47, p.653-662, 1977.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum–induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, v.117, p.19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): 1. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, v.103, p.685-693, 1993a.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum – stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, v.103, p.695-702, 1993b.

DE SOUZA, C.N.A . Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminum toxicity in acid soil. **Plant Breeding**, v.117, p.217-221, 1998.

DEVINE, T.E. Aluminium and manganese toxicities in legumes. In: WRIGHT, M.J.; FERRARI, A.S. **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. Ithaca: Cornell University Press, 1976. p.65-72.

DORNELLES, A.L.C.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C.; SERENO, M.J.C.M.; HANDEL, C.L.; MITTELMANN, A. Somaclonal variation for aluminum toxicity tolerance and gibberellic acid sensitivity in wheat. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.193-200, 1997.

DRISCOLL, C.T.; SCHECER, W.D. Aluminium in the environment. In: SIGEL, H. (Ed.) **Metal Ions in biological systems:** aluminium and its role in biology. New York: Marcel Dekker, 1988. v.24, p.60-122.

DUNCAN, R.R. Sequential development of acid soil tolerant sorghum genotypes under field stress conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.1295-1305, 1988.

DUNCAN, R.R. Variability among sorghum genotypes for uptake of elements under acid soil field conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v.4, p.21-32, 1981.

DUNCAN,R.R.; CLARK,R.B.; FURLANI, P.R. Laboratory and field evaluations of sorghum for response to aluminum and acid soil. **Agronomy Journal**, v.75, p.1023-1026, 1983.

DUQUE-VARGAS, J.; PANDEY, S.; GRANADOS, G.; CEBALLOS, H.; KNAPP, E. Inheritance of tolerance to Soil Acidity in Tropical Maize. **Crop Science**, v.34, p.50-54, 1994.

EDMEADES, D.C.; BLAMEY, F.P.C.; FARINA, M.P.W. Techniques for assessing plant responses on acid soils. In: DALE, R.A. (Ed.) **Plant-soil interactions at low Ph**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.221-233.

EDMEADES, D.C.; SMART, C.E.; SHEELER, D.M. Aluminium toxicity in New Zealand soils: preliminary results on the develpment of diagnostic criteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.26, p.493-501, 1983.

EDMEADES, D.C.; WHEELER, D.M.; CLINTON, O.E.The chemical composition and ionic strenght of soil solutions from New Zeland topsoils. **Australian Journal of Soil Research**, v.23, p.151-165, 1985.

ELEUTÉRIO, A.; GAMA, E.E.G.; MORAIS, A.R. Capacidade de combinação e heterose em híbridos intervarietais de milho adaptados às condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.247-253, 1988.

EVANS, J.; DEAR, B.; O'CONNOR, G.E. Influence of an acid soil on the herbage yield and nodulation of five annual pasture legumes. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.30, p.55-60, 1990.

EVERS, F.H.; HUTTL, R.F. A new fertilization strategy in declining forests. **Water, Air and Soil Pollution**, v.54, p.495-508, 1990/1991.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. Aluminum toxicity in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.11, p.303-319, 1988.

FERNANDES, A.B.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiros da região sul do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.24, p.1489-1498, 1989.

FERREIRA, R.P.; SEDIYAMA, C.S.; CRUZ, C.D.; OLIVEIRA, M.N. Evaluation of the combining ability of rice varieties possessing tolerance or sensitivity to aluminum toxicity. **Revista Ceres**, v.45, p.31-40, 1998.

FERREIRA, R.P.; SEDIYAMA, C.S.; CRUZ, C.D.; FREIRE, M.S. Herança da tolerância à toxidez de alumínio em arroz baseada em análises de médias e variâncias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.509-515, 1997.

FLORES, C.I.; CLARK, R.B.; GOURLEY, L.M. Growth and yield traits of sorghum grown on acid soil at varied aluminum saturations. **Plant and Soil**, v.106, p.49-57, 1988.

FLORES, C.K.; GOURLEY, L.M.; PEDERSEN, J.F.; CLARK, R.B. Inheritance of acid-soil tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor*) grown on an Ultisol. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.1081-1093.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.959-987, 1988.

FOY, C.D. Tailoring plants to fit problem soils-progress and problems for future research. In: MONIZ, A.C. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1997. p.55-57.

FOY, C.D.; ARMIGER, W.H.; BRIGGLE, L.W.; REID, D.A. Difererential aluminium tolerance of wheat and barley in acid soils. **Agronomy Journal**, v.57, p.413-417, 1965.

FOY, C.D.; CARTER; T.E.; DUKE, J.A. ; DEVINE, T.E. Correlation on shoot and root growth and its role in selecting for aluminum tolerance in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, p.305-325, 1993.

FOY, C.D.; DUKE, J.A.; DEVINE, T.E. Tolerance of soybean germplasm to an acid Tatum subsoil. **Journal Plant Nutrition**, v.15, p.527-547, 1992.

FOY, C.D.; FLEMING, A.L.; SCHARTZ, J.W. Opposite aluminum and managanese tolerances in two wheat varieties. **Agronomy Journal**, v.65, p.123-126,1973.

FOY, C.D.; LAFEVER, N.H.; SCHWARTZ, J.W.; FLEMING A.L. Aluminum tolerance of wheat cultivars related to region of origin. **Agronomy Journal**, v.66, p.751-758, 1974a.

FOY, C.D.; ORELLANA, R.G.; SCHWARTZ, J.W.; FLEMING, A.L. Responses of sunflower genotypes to aluminium in acid soil and nutrient solutions. **Agronomy Journal**, v.66, p.293-296, 1974b.

FOY, C.D. General principles involved in screening plants for alumunium and manganese tolerance. In: PLANT ADAPTATION TO MINERAL STRESS IN PROBLEM SOILS, Beltsville, 1972. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1976. p.255-267.

FOY,C.D.; SILVA, A.R. da. Tolerances of wheat germplasm to acid subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, v.14, p.1277-1296, 1991.

FUENTE, J.M.; RAMIREZ-RODRÍGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v.276, p.1566-1568,1997.

FURLANI, P.R.; CLARK, R.B. Screening sorghum for aluminum tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, v.73, p.587-594, 1981.

FURLANI, P.R.; CLARK, R.B. Plant traits for evaluation of responses of sorghum genotypes to aluminium. In: GABELMAN, H.W.; LOUGHMAN, B.C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer, 1987. p.247-254.

FURLANI, P.R.; LIMA, M.; MIRANDA,L.T.; MIRANDA,L.E.C.; SAWASAKI, E.; MAGNAVACA, R. Avaliação de linhagens, materiais comerciais e duas populações de milho para tolerância a alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.655-660, 1986.

FURLANI, P.R.; QUAGGIO, J.A.; GALLO, P.G. Differential responses of sorghum to aluminium in nutrient solution and acid soil. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.953-958.

GALE, M.D.; DEVOS KM. Comparative genetcs in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.1971-1974, 1998.

GALLEGO, F.J.; BENITO, C. Genetic control of aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.393-399, 1997.

GAMA, E.E.G.; MAGNAVACA, R.; MORAIS, A.R.; OLIVEIRA, A.C. Comportamiento de cinco poblaciones de maiz y de sus respectivos hibridos interpoblaciones em suelos fertiles y acidos. In: REUNION DE MAICEROS DE LA ZONA ANDINA, 12., Quito, 1986. **Memoria**. Mexico: CIMMYT, 1986. p.77-96.

GARCIA JR., O.; SILVA, W.J. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. **Ciência e Cultura**, v.31, p.585, 1979.

GARLAND K.A.; CARTER, T.E. Aluminum tolerance in soybean: I. Genotypic correlation and repeatability of solution culture and greenhouse screening methods. **Crop Science**, v.30, p.1049-1054, 1990.

GARVIN, D.F. Genetic and molecular dissection of aluminum tolerance in grain crops. In: WORKSHOP ON IMPROVING PHOSPHORUS ACQUISITION EFFICIENCY IN MARGINAL SOILS, Sete Lagoas, 1999. /No Prelo/

GARVIN, D.F. The genetic basis of aluminum tolerance in Crops. In: DEVELOP a Strategy for collaborative research dissemination of technology: USDA/ARS. Ithaca: Cornell University. 1998. p.73.

GILL, G.W.; FROST, J.K.; MILLER, K.A. A new formula for half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. **Acta Cytologica**, v.18, p.300-311, 1974.

GOURLEY, L.M. Breeding sorghum for acid soils of the humid tropics. In: LATHAM, M. (Ed.) **Land development and management of acid soils in Africa**. Bangkok: IBSRAM, 1988. p.261-273.

GOURLEY, L.M. Breeding sorghum for tolerance to aluminum-toxic tropical soils. In: MILLER, F.R.; GUIRAGOSSIAN, V.; BETANCOURT, A. (Ed.) **Plant breeding methods and approaches in sorghum**. El Batan: CIMMYT, 1983. p.299-313

GOURLEY, L.M. Finding and utilizing exotic Al-tolerant sorghum germplasm. In: WORKSHOP ON EVALUATING SORGHUM FOR TOLERANCE TO AL-TOXIC TROPICAL SOILS IN LATIN AMERICA, Cali, 1984. **Sorghum for acid soils**: proceedings. Cali: INTSORMIL; ICRISAT; CIAT, 1987. p.293-313.

GOURLEY, L.M.; ROGERS, S.A.; RUIZ-GOMEZ, C.; CLARK, R.B. Genetic aspects of aluminium tolerance in sorghum. **Plant and Soil**, v.123, p.211-216, 1990.

GRANADOS, G.; PANDEY, S.; CEBALLOS, H. Response to selection for tolerance to acid soils in a tropical maize population. **Crop Science**, v.33, p.936-940, 1993.

HANSON, W.D. Root chacacteristics associated with divergent selection for seedling aluminum tolerance in soybean. **Crop Science**, v.31, p.125-129, 1991.

HAUPTLI, H.; KATZ, D.; THOMAS, B.R.; GOODMAN, R.M. In: EDWARDS, C.A.; LAL, R.; MADDEN, P.; MILLER, R.H.; HOUSE, G. (Ed.) **Sustainable agriculture systems**. Ankeny: Soil and Water Conservation Society, 1990.

HAYNES, R.J. Effects of lime on phosphate availability in acid soils. A critical review. **Plant and Soil**, v.68, p.289-308, 1982.

HORST, W. **Fitting maize into cropping systems on acid soils of the tropics**. Project ERBIC 18 CT 960063. Second Scientific Progress Report 01-10-97 to 30-09-98, 1999.

HORST, W.J.; PUSCHEL, A.K.; SCHMOHL, N. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminum sensitivity in maize. In: MONIZ; A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1997. p. 23-30.

HOWELER, R.H. Effective screening techniques for tolerance to aluminum toxicity. In: WOKSHOP ON EVALUATING SORGHUM FOR TOLERANCE TO AL IN LATIN AMERICA, Cali, 1984. **Sorghum for acid soils**: proceedings. Cali: INTSORMIL; ICRISAT; CIAT, 1987. p.173-196.

HOWELER, R.H. Identifying plants adaptable to low pH conditions. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MUMMANN, R.P. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.885-904.

HOWELER, R.H.; CADAVID, L.F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. **Agronomy Journal**, v.68, p.551-555, 1976.

HOWELLER, R.H.; SIEVERDING, E.; SAIF, S. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. **Plant and Soil**, v.100, p.249-283, 1987.

HUE, N.V.; CRADDOCK, G.R.; ADAMS F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils, **Soil Science Society of America Journal**, v.50, p.28-34, 1986.

HUTTON, E.M. Centrosema breeding for acid tropical soils, with emphasis on efficient Ca absorption. **Tropical Agriculture**, v.62, p.273-280, 1985.

JASPER, D.A.; DAVY J.A. Root characteristics of native plant species in relation to the benefit of mycrorhizal colonization for phosphorus uptake. **Plant and Soil**, v.155/156, p.281-284, 1993.

JOHNSON JP.; CARVER BF.; BALIGAR VC. Expression of aluminum tolerance tranferred from Atlas 66 to hard winter wheat. **Crop Science**, v.37, p.103-108, 1997.

JORGE, R.A.; ARRUDA, P. Aluminum – induced organic acids exudation by roots of an aluminum–tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, v.45, p.675-681, 1997.

KAFKAFI, U. Root growth under stress: salinity. In: WAISEL, E.; KAFKAFI, U. **Plant roots**: the hidden half. New York: Marcel Dekker, 1991. p.375-392.

KAMPRATH, E.J Crop response to lime on soils in the Tropics. In: ADAMS, F. (Ed.) **Soil acidity and liming**. 2.ed. Madison: American Society of Agronomy, 1984. p.349-368. (Agronomy, 12)

KAMPRATH, E.J.S. Exchangeable aluminum as a criterion for liming leached mineral soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, v.34, p.252-254, 1970.

KANEKO, M.; YOSHIMURA, E.; NISHIZAWA, N.K.; MORI, S. Time course study of aluminum – induced callose formation in barley roots as observed by digital microscopy and low – vacuum scanning microscopy. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.45, p.701-712, 1999.

KARR, M.C.; COUTINHO, J.; AHLRICHS, J.L. Determination of aluminum toxicity in Indiana soils by petri dish bioassay. **Proceedings-Indiana Academy of Sciences**, v.93, p.85-88, 1983.

KASIM, F.; HAAG,W.L.; WASSON, C.E. Genotypic response of corn to aluminum stress: II. Field performance of corn varieties in acid soils and its relationship with performance at seedling stage. Indones. **Journal of Crop Science**, v.5, p.53-65, 1990.

KELLOGG, C.E. **Agriculture development**: soil, food, people, work. Madison: American Society of Agronomy, 1975.

KELTJENS W.G. Magnesium uptake by Al-stressed maize plants with special emphasis on cation interactions at root exchange sites. **Plant and Soil**, v.171, p.141-146, 1965.

KELTJENS, W.G. Plant adaptation and tolerance to acid soils, its possible al avoionce: a review. In: In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1997. p.109-117.

KERRIDGE, P.C.; KRONSTAD, W.E. Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., Host). **Agronomy Journal**, v.60, p.710-711, 1968.

KERRIDGE, P.C. Adaptation of shrub legumes to acid soils. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low ph**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.977-987.

KHATIWADA, S. P.; SENADHIRA, D.; CARPENA, A.L.; ZEIGLER, R.S.; FERNANDEZ, P.G. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.738-744, 1996.

KING, L.D. Soil nutrient management in the United States. In: EDWARDS, C.A.; LAL, R.; P.MADEN, P.; R.H. MILLER, R.H.; HOUSE, G. (Ed.) **Sustainable agriculture systems**. Ankeny: Soil and Water Conservation Society, 1990.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annual Review and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

KURNIATUN, H.; NOORDWIJK, M.; SETIJONO, S. Tolerance and avoidance of Al toxicity by Mucuna pruriens var. utilis at different levels of P supply. In: DALE, R.A. (Ed.) **Plant-soil interactions at low Ph**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.243-247.

LAFEVER, H.N.; CAMPBELL, L.G. ; FOY, C.D. Differential response of wheat cultivars to Al. **Agronomy Journal**, v.69, p.563-568, 1977.

LAFEVER, H.N.; CAMPBELL, L.G. Inheritance of aluminum tolerance in wheat. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.20, p.355-364, 1978.

LAGOS, M.B.; FERNANDES, M.I.M.; CAMARGO, C.E.O.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.1011-1020, 1991.

LARSEN, P. B.; STENZLER, L. M.; TAI, C. Y.; DEGENHARDT, J.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V.; Tai-CY. Molecular and physiological analysis of Arabidopsis mutants exhibiting altered sensitivities to aluminium. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH** : sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1997.

LARSEN, P.B.; TAI, C.Y.; KOCHIAN, L.V.; HOWELL, S.H. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. **Plant Physiology**, v.110, p.743-751, 1996.

LARSEN, P.B.L.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.; STENZLER, L.M.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminium – resistant accumulation on organic acid release from roots. **Plant Physiology**, v.117, p.9-18, 1998.

LIMA, M.; MIRANDA FILHO, J.B.; FURLANI, P.R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Brazilian Journal of Genetics**, v.8, p.579-584, 1995.

LIMA, M.; FURLANI, P.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Divergent selection for aluminum tolerance in a maize (Zea mays L.) population. **Maydica**, v.37, p.123-132, 1992.

LITTLE, R. Plant soil interactions at low pH. In Problem Solving: the genetic approach. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.1239-1257, 1988.

LOPES, M.A.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C.; GAMA, E.E.G. Avaliação de populações de milho e seus cruzamentos para tolerância a toxidez de alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.257-263, 1987.

LUO, M.; DVORAK, J. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. **Euphytica**, v.91, p.31-35, 1996.

MACHADO, R.P.; NOVAIS, R.F.; SEDIYAMA, C.S. ; BORGES, A.C. Efeito da localização de doses de fósforo em relação ao sistema radicular, sobre o comportamento da soja, com utilização de técnica de raízes subdivididas. **Revista Ceres**, v.30, p.295-307, 1983.

MACKAY, A.D.; CARADUS, J.R.; WEWALA, S. Aluminium tolerance of forage species. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.925-930.

MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Lincoln: Nebrasca University, 1982. Tese, Doutorado.

MAGNAVACA, R.; GAMA, E.E.G.; BAHIA FILHO, A.F.C.; FERANDES, F.T. Obtenção de híbridos duplos de milho para tolerância a toxidez de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.971-977, 1988.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.O.; CLARK, R.B. Evaluation of maize inbred lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H.W.; LONGHMAN, B.C. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987a. p.255-265

MAGNAVACA, R.; GARDNER C.O.; CLARK R.B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In Genetic aspects of plant mineral nutrition. In: GABELMAN, H.W.; LONGHMAN, B.C. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987b. p.201-212.

MAGNAVACA, R.; GARDNER C.O.; CLARK R.B. Comparitions of maize populations for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H.W.; LONGHMAN, B.C. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987c. p.189-199.

MALAVOLTA, E.; NOGUEIRA, F.D.; OLIVIERA, I.P.; NAKAYAMA, L.; EIMORI, I. Aluminum tolerance in sorghum and bean: methods and results. **Journal of Plant Nutrition**, v.3, p.687-694, 1981.

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant Soil**, v.134, p.1-20, 1991.

MARTIN, R.B. Bioinorganic chemistry of aluminun. In: SIGEL, H. **Aluminium and its role in biology**. New York: Dekker, 1988. p.2-57. (Metal Ions in Biological Systems, 24)

MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. Eficiência de índices fenotípicos de comprimento de raiz seminal na avaliação de plantas individuais de milho quanto a tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1897-1904, 1999.

MASSOT, N.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Callose production as indicator of aluminum toxicity in bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.1-10, 1999.

MATZENBACHER, R.G. Advances made in developing wheats with better aluminum toxicity tolerance in Brazil. In: KLATT, A.R. **Wheat production constraints in tropical environments**. Mexico: CIMMYT, 1988. p.285-304.

Mc KENDRY, A.L.; TAGUE, D.N.; SOMERS, D.J. Aluminum tolerance of 1BL.1RS and 1AL.1RS near-isolines in soft red winter wheat. **Crop Science**, v.36, p.987-990, 1996.

McLAUGHLIN, M.J.; JAMES, T.R. Effects of surface-applied phosphorus and superphosphate on the solution chemistry and phytotoxity of subsurface aluminium: sand/solution and soil experiments. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.42, p.859-874, 1991.

MESDAG, J.; SLOOTMAKER, L.A.; POST JR., J. Linkage between tolerance to high soil acidity and genetically high protein content in the kernel of wheat, *Triticum aestivum* L. and its possible use in breeding. **Euphytica**, v.19, p.163-174, 1970.

MILLER, T.E.; IQBAL, N.; READER, S. M.; MAHMOOD, A.; CANT, K.A.; KING, I.P.; FARRAR, J. A. cytogenetic approach to the improvement of aluminum tolerance in wheat. Putting plant physiology on the map genetic analysis of development and adaptive traists. **New Phytologist**, v.137, p.93-98, 1997.

MILLIKAN, C.R. Plant varieties and species inrelation to the occurrence of deficiencies and excesses of certain nutrient elements. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.27, p.220-233, 1961.

MINELLA, E.; SORRELLS, M.E. Aluminum tolerance in barley: genetic relationship among genotypes of diverse origin. **Crop Science**, v.32, p.593-598, 1992.

MINELLA, E.; SORRELLS, M.E. Inheritance and chromosome location of *Alp*, a gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. **Plant Breeding**, v.116, p.465-469, 1997.

MIRANDA, L.T.; FURLANI, P.R.; MIRANDA, L.E.C.; SAWAZAKI, E. Genetic and environmental resistance and super-genes.Latent aluminum tolerance. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.58, p.46-48, 1984.

MIRANDA, M.A. de C.; MASCARENHAS, H.A.A.; BATAGLIA, O.C.; BULISANI, E.A. Leaf scorching as a criterion to select soybean for resistance to soil acidity. **Bragantia**, v.47, p.43-54, 1988.

MIYASAKA, S.C.; BUTA, J.C.; HOWELL, R.K.; FOY, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, v.96, p.737-743, 1991.

MOON, D.H.; OTTOBONI, L.M.N.; SOUZA, A.P.; SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; ARRUDA, P. Somaclonal-variation-induced aluminum-sensitive mutant from an aluminum-inbred maize tolerant line. **Plant Cell Reports**, v.16, p.686-691, 1997.

MOORE, D.P.; KRONSTAD, W.E.; METZGER, R.J.Screening wheat for aluminum tolerance. In WRIGHT, M.J. (Ed.) **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. Ithaca: Cornell University, 1976. p.287-295.

MORELLO, C.L.; MIRANDA FILHO, J.B.; FURLANI, P.R. Tolerância em populações de milho à toxidez de alumínio em solução nutritiva. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., Uberlândia, 2000. **Resumos**. Sete Lagoas: ABMS; EMBRAPA, CNPMS, 2000. p.260.

MUGWIRA, L.M.; ELGAWHARY, S.M.; PATEL, K.I. Differential tolerances of triticale, wheat, rye and barley to aluminum in nutrient solution. **Agronomy Journal**, v.68, p.782-786, 1976.

MUNNS, D.N.; SCOTT, B.J. Biological Aspects of Mineral Toxicities. In: SEARLE, P.G.E.; DAVEY (Ed.) **Priorities in soil/plant relations research**. Sidney: University of Sydney, 1987. p.91-109.

NARRO, L.; PANDEY, S.; DE LEÓN, C.; PÉREZ, J.C.; SALAZAR, F.; ARIAS, M.P. Heterosis in acid soil-tolerant maize germplasm. In: CIMMYT. **The genetics and exploitation of heterosis in crops**: an international symposium; book of abstracts. México, 1997. p.290.

NARRO, L.C.; de LEON,C.; SALAZAR, F.; ARIAS, M.P. Programa de maiz del CIMMYT para tolerância a suelos ácidos. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DEL MAIZ, 18., Sete Lagoas, 1999. **Memorias**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS; Mexico: CIMMYT, 1999. p.65-72.

NASPOLINI FILHO, V.; BAHIA FILHO, A.F.C.; VIANNA R.T.; GAMA, E.E.G.; VASCONCELOS C.A.; MAGNAVACA, R. Comportamento de linhagens e de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) em solos sob vegetação de Cerrado. **Ciencia e Cultura**, v.33, p.722-727, 1981.

NELSON, L.E. Tolerance of 20 rice cultivars to excess Al and Mn. **Agronomy Journal**, v.75, p.134-138, 1983.

NICHOLAIDES III, J.J.; PIHA, M.I. A new methodology to select cultivars tolerant to aluminum and with high yield potential. In: WORKSHOP ON EVALUATING SORGHUM FOR TOLERANCE TO AL-TOXIC TROP. SOILS IN LATIN AMERICA, Cali, 1984. **Sorghum in acid soils**: proceedings. Cali: INTSORMIL; ICRISAT; CIAT, 1987. p.103-116.

NODARI, R.O.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C. Bases genéticas da herança do caráter tolerância ao crestamento em genótipos de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.269-280, 1982.

NOVAIS, R.F.; FERREIRA, R.P.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.V. Absorção de fósforo e crescimento do milho com sistema radicular parcialmente exposto à fonte de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.749-754, 1985.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, 1999. 399p.

O'TOOLE, J.C.; BLAND, W.L. Genotypic variation in crop plant root systems. **Advances in Agronomy**, v.41, p.91-145, 1987.

PAL, K.K.; RINKU, D.; DEY, R. A simple, rapid, and nondestructive method for screening aluminum tolerance in groundnut. **International Arachis Newletter**, v.19, p.44-46, 1999.

PANDEY S.; NARRO, L.; PÉREZ, J.C.; CEBALLOS, H. CIMMYT's collaborative research to improve tolerance to soil acidity in tropical maize. In: INTERNATIONAL CORN CONFERENCE, St. Louis, 1996.

PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; GRANADOS, G. Development of soil acidity tolerant maize cultivars for the tropics. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., Acapulco, 1994. **Transactions**. Chapingo: Socieda Mexicana de la Ciencia del Suelo, 1994a. v.5a, p.579-592.

PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; MAGNAVACA, M.; BAHÍA FILHO, A.F.C.; DUQUE-VARGAS, J.; VINASCO, L.E. Genetics of tolerance to Soil Acidity in Tropical Maize. **Crop Science**, v.34, p.1511-1514, 1994b.

PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES, P.E.O.; ELEUTÉRIO, A.; BAHIA FILHO, A.F.C.; ALVES,V.M.C.; FRANÇA, G.E.I.; COELHO, A.M.; CORREA, L.A.; PAIVA, E.; VASCONCELOS, M.J. Avanços no programa de adaptação de milho a solos ácidos do CNPMS/ EMBRAPA, 1994 a 1996. In: REUNION DE COORDINADORES SURAMERICANOS DE PROGRAMAS DE MAIZ, 4., Cali, 1996. **Memorias**. Mexico: CIMMYT, 1996. p.74-103.

PARENTONI, S.N.; GAMA,E.E.G.; SANTOS, M.X.; LOPES, M.A.; ALVES,V.M.C.; BAHIA FILHO, A.F.C.; VASCONCELOS, C.A.; MAGNAVACA, R.; PACHECO, C.A.P. Adaptação de milho a solos ácidos: tolerância a toxidez de alumínio e eficiência no uso de nutrientes no Programa de Pesquisa da EMBRAPA-Milho e Sorgo. In: REUNION LATINOAMERIACA DEL MAIZ, 18., Sete Lagoas, 1999. **Memorias**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS; México-CIMMYT, 1999. p.179-202.

PARENTONI, S.N.; ALVES, V.M.C.; SANTOS, M.X.; GAMA, E.E.G.; LOPES, M.A.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; BAHIA FILHO, A.F.C.; MEIRELES, W.F.; SOUZA, I.R.P.; CORREA,L.A. Identificação de genótipos padrões para eficiência na utilização de P em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., Recife, 1998. **Globalizacao e seguranca alimentar**: resumos. Recife: ABMS, 1998. p.22

PARENTONI, S.N.; BAHIA FILHO, A.F.C.; GAMA, E.E.G.; LOPES, M.A.; GUIMARÃES, P.E.O; SANTOS, M.X. Capacidade Combinatória de linhagens elite de milho em solo ácido e fértil. In: REUNION LATINOAMERICANA, 3.; REUNION DE LA ZONA ANDINA E DE INVESTIGADORES EN MAIZ, 16., Cochabamba, 1995. **Memorias**. Cochabamba: Simon J. Platino, 1995. p.35-46.

PARKER, D.R.; PEDLER, J.F. Probing the "malate hypothesis"of differential aluminum tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. **Planta**, v.205, p.389-396, 1998.

PELLET, D.M.; GRUNES, L.G.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as na aluminum – tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.196, p.788-795, 1995.

PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum resistence mechanism in wheat. Roles of apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, v.112, p.591-597, 1996.

PIHA, M.; NICHOLAIDES III, J.J. Selection of acid-tolerant cultivars. In: NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY. **Agronomic-economic research on soils of the tropics:** 1980-1981. Raleigh: Soil Science Department, 1983. p.49-69 (Technical Report)

PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Effects of low aluminum activity in nutrient solutions on the organic acid concentrations in maize plants. **Journal Plant Nutrition**, v.20, p.601-611, 1997.

PITTA, G.V.E.; SANTOS, F.G. dos. O potássio na nutrição e na tolerância ao alumínio em sorgo. **Relatório Técnico Anual do Centro Cacional de Pesquisa de Milho e Sorgo:** 1988-1991. Sete Lagoas: Embrapa, 1992. v.5, p.222-223.

PITTA, G.V.E.; SCHAFFERT, R.E.; BORGONOVI, R.A.; VASCONCELLOS, C.A.; BAHIA FILHO, A.F.C.; OLIVEIRA, A.C. Evaluation of sorghum lines to high soil acidity conditions. In: REUNIAO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 12., Goiânia, 1978. **Resumos**. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 1979.

POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J.A. **Rapid screening of maize for tolerance to aluminum in breeding varieties better adapted to acid soils**. Washington: Office of Agriculture Development Support Bureau, 1978a. 21p. (AID.Techical Bulletin, 22).

POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J.A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, v.18, p.823-827, 1978b.

POLLE, E.A.; KUNZAK, C.F. Genetics and breeding of cereals for acid soil and nutrient efficiency In: BALIGAR, V.C.; DUNCAN, R. **Crops as enhancers of nutrient use**. San Diego: Academic Press, 1991.

PRESTES, A.M.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J.A. An improved seedling culture method for screening wheat for tolerance to toxic levels of aluminum. **Agronomy Abstracts**, p.60,1975.

PUSHPARAJAH, E.; BACHIK, A.T. Management of acid tropical soils in Southeast Asia. In: INTERNATIONAL BOARD FOR SOIL RESEARCH AND MANAGEMENT. **Mangement of acid tropical soils for sustainable agriculture:** proceedings of an IBSRAM Inaugural Workshop, 1987. Bangkok: IBSRAM; EMBRAPA; INIAP; INCSU, 1987.

RAIL, R. Effects of soil acidity factors on interaction of chickpea (Cicerarietinum L) genotypes and Rhizobium strain. Symbiotic N. fixation, grain yield in acid soils. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURMMANN, R.P. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.619-631.

RAJARAM, S.; KOHLI,M.M.; LOPEZ-CESATI, J. Breeding for tolerance to aluminum toxicity in wheat. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURMMANN, R.P. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.1019-1028

RAJU, P.S.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R. ; MARANVILLE J.W. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on groth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. **Plant and Soil**, v.121, p.165-170, 1990.

REID, D.A. Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. **Barley Genetics**, v.11, p.409-413, 1971.

REID, D.A.; FLEMING, A.L.; FOY, C.D. A method for determining aluminium response of barley in nutrient solution in comparison to response in Al-toxic soil. **Agronomy Journal**, v.63, p.600-603, 1971.

REID, D.A.; SLOOTMAKER, L.A.J.; STOLEN, O.; CRADDOCK, J.C. Registration of barley composite cross XXXIV (Reg. Nº. G.P. 33). **Crop Science**, v.20, p.416-417, 1980.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. **New Phytologist**, v.121, p.499-513, 1992.

RENGEL, Z.; ROBINSON, D.L. Temperature and magnesium effects on aluminium toxicity in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*). In: BEUSICHEM, M.L.V. **Developments in plant soil sciences**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p.413-417.

RESENDE, M.D.V. Seleção de genótipos de milho em solos contrastantes. Piracicaba: ESALQ, 1989. 212p. Dissertação, Mestrado.

RHUE,R.D.; GROGAN,C.O.; STOCKMEYER,E.W.; EVERETT, H.L. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Science**, v.18, p.1063-1067, 1978.

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, v.36, p.905-909, 1996.

RITCHEY, K.D. Evaluating sweet potato tolerance to aluminium toxicity: Comparison of rapid test method and field results. In: WRIGHT, R.J. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.939-945.

RITCHIE, G.S.P. The chemical behaviour of aluminium, hydrogen and manganese in acid soils. In: ROBSON, A.D. **Soil acidity and plant growth**. Sidney: Academic Press, 1989. p.1-60.

RORISON, I.H. (Ed.) **Ecological aspects of the mineral nutrition of plants.** Oxford: Blackwell, 1969.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, v.196, p.103-110, 1995.

RYAN, P.R.; DiTOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.437-446, 1993.

SALAZAR, F.; PANDEY, S.; NARRO, I.; PÉREZ, J.C.; CEBALLOS, H.; PARENTONI, S.N.; BAHÍA FILHO, A.F.C. Diallel Analysis of Acid-Soil Tolerant and Intolerant Tropical Maize Populations. **Crop Science**, v.37, v.1457-1462, 1997.

SALINAS, J.G Differencial response of some cereal and bean cultivars to Al and P stress in an oxisol of Central Brazil. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 326p. Thesis, Ph.D.

SALINAS, J.G.; SANCHEZ, P.A. Tolerance to Al-toxicity and low available P. In: NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY. **Agronomic-economic research in the tropics:** annual report for 1976-1977. Raleigh, 1977. p.115-137

SANCHEZ, P.A. **Properties and management of soils in the tropics**. New York: John Wiley, 1976. 618p.

SANCHEZ, P.A.; SALINAS, J.G. Low-input technology for managing Oxisols and Utisols in tropical America. **Advances in Agronomy**, v.34, p.280-406, 1981.

SANGALANG, J.B.; BOUWKAMP, J.C. Selection of sweet potato for tolerance to aluminum toxicity: Screening procedures and field test. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.277-281, 1988.

SAPRA, V.T.; CHAUDHRY, M.A.; MUGWIRA, L.M. Genetic variability in aluminum tolerance in triticale. **Wheat Information Service**, v.50, p.47-50, 1979.

SARIC, M.R. Genetic specificity in relation to plant mineral nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v.3, p.743-766, 1981.

SARKARUNG, S. Screening upland rice for aluminum tolerance and blast resistance. In: CONFERENCE ON PROGRESS IN UPLAND RICE RESEARCH, Jakarta, Indonesia, 1985. **Proceedings**. Los Baños: IRRI, 1986. p.271-281.

SARKARUNG, S.; ZEIGLER R,S. Developing rice varieties for sustainable cropping systems for high rainfall acid upland soils of tropical America. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RICE PRODUCTION ON ACID SOILS OF THE TROPICS, Kandy, Sri Lanka, 1989. **Proceedings**. Kandy, 1990.

SARTAIN, J.B.; KAMPRATH, E.J. Aluminum tolerance of soybean cultivars based on root elongation in solution culture with growth in acid soil. **Agronomy Journal**, v.70, p.17-20, 1978.

SAWAZAKI, E.; FURLANI, P.R. Genética da tolerância ao alumínio em linhagens de milho cateto. **Bragantia**, v.46, p.269-278, 1987.

SCHAFFERT, R.E.; COSTA, L.M.; ALVES, V.M.C. Estudo da Herança genética da tolerância ao alumínio em sorgo (*Sorghum Bicolor* L. Moench). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., Uberlândia, 2000. **Resumos**. Sete Lagoas: ABMS; EMBRAPA, CNPMS, 2000.

SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; PITTA, G.V.E.; BAHIA FILHO, A.F.C.; OLIVEIRA,C.A. Performance of near isogenic sorghum lines and hybrids for tolerance to toxic levels of exchangeable aluminum. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT-SOIL INTERACTIONS AT LOW PH, 4., Belo Horizonte, 1996. **Abstracts**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1996. p.239

SCOTT, B.J. ; FISHER, J.A. Selection of genotypes tolerant to aluminium and manganese. In: ROBSON, A.D. **Soil acidity and plant growth**. Sidney: Academic Press, 1989. p.167-203

SCOTT, B.J.; FISHER, J.A. Comparing selection strategies for tolerance of acid soils. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES, Lincoln, 1993. **Proceedings**. Lincoln: University of Nebraska, 1993. p.103-116. (INTSORMIL. Publication, 94-2)

SHAO, J.Z.; JIAN, F.M.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al–induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, v.117, p.745-751, 1998.

SIMPSON, J.R.; PINKERTON, A.; LAZDOVSKIS. Interacting effects of subsoil acidity and water on the root behaviour and shoot growth of some genotypes of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.30, p.609-619, 1979.

SINT, J. V.; MACEDO, C. C.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Selection of Al-resitant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures. **Euphytica**, v.97, p.303-310, 1997.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL D.H.; MAHMUD. A.W. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.76, p.115-124, 1984.

SOMERS DJ.; BRIGGS K.G.; GUSTAFSON J.P. Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.694-700, 1996.

SOUZA, J.R. Avaliação de seis ciclos de seleção para tolerância à acidez na população de milho (*Zea mays* L.) CMS 04C. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1997. 145p. Tese, Doutorado.

SPAIN, J.M. Pasture establishment and management in the Llanos Orientales of Colombia. In: SANCHEZ, P.A.; TERGAS, L.E. **Pasture production in acid soils of the tropics**, Cali: CIAT, 1979. p.165-175.

SPAIN, J.M.; FRANCIS, C.A.; HOWELER, R.H.; CALVO, F. Differential species and varietal tolerance to soil acidity in tropical crops and pastures. In: BORNEMISZA, E.; ALVARADO, A. (Ed.) **Soil management in tropical America**. Raleigh: North Carolina State University, 1975. p.308-329.

SPEHAR, C.R. Diallel analysis for mineral element absorption in tropical adapted soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.707-713, 1995.

SPEHAR, C.R. Screening soybean germplasm for aluminum tolerance using cluster analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.113-122, 1994.

SPEHAR, C.R.; GALWEY, N.W. Diallel analysis for aluminum toerance in tropical soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.267-272, 1996.

STOUTJESDIJK, P.A.; LARKIN, P.J.; SALE, P.W.G. Improving the acid-soil tolerance of Medicago sativa by asymmetric somatic hybridisation. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAYMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: principles and management. London: Kluwer, 1995. p.455-457.

SUHAYDA, C.G.; HAUG, A. Organic acids reduce aluminum toxicity in mayze root membranes. **Physiologia Plantarum**, v.68, p.189-195, 1986.

TAKAGI, H.; NAMAI, H.; MURAKAMI, K. Evaluation of haematoxylin staining method for detecting wheat tolerance to aluminum. **Japanese Journal of Breeding**, v.31, p.152-160, 1981.

TANAKA, A.; HAYAKAWA, Y. Comparison of tolerance to soil acidity among crop plants. II. Tolerance to high levels of aluminum and manganese. **Journal of Science Soil Manure**, v.46, p.19-25, 1975.

TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. **Plant Soil**, v.171, p.89-103, 1991.

TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAYMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: principles and management. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.255-269.

THUNG, M.; ORTEGA, J.; ERAZO, O. Breeding methodology for phosphorus efficiency and tolerance to aluminum and manganese toxicities for beans. (*Phaseolus vulgaris* L.). In: WORKSHOP ON EVALUATING SORGHUM FOR TOLERANCE TO AL-TOXIC TROPICAL, Cali, 1984. **Sorghum for acid soils**: proceedings. Cali: INTSORMIL; ICRISAT; CIAT, 1987. p.197-211.

TOMOS, A.D.; MALONE, M.; PRITCHARD, J. The biophysics of differential growth. **Environmental and Experimental Botany**, v.29, p.7-23, 1989.

TORRES, G.A.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.459-465. 1997.

UHLEN, G. The toxic effect of aluminium on barley plants in relation to ionic composition of the nutrient solution. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.35, p.265-270, 1985.

USDA 2000. The Future of Planet Earth: Scientific Challenges in the Coming Century. U.S. Geological Survey, MS119 National Center, Reston, VA 20192, USA. URL News Release <http://www.usgs.gov/public/press/public_affairs/press_releases/pr1160m.html>

VAZQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, v.119, p.435-444, 1999.

VLAMIS, J. Acid soil infertility as related to soil solution and soilid phase effects. **Soil Science**, v.75, p.383-394, 1953.

WAGATSUMA, T. Effect on non-metabolic conditions on the uptake of aluminium by plant roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.29, p.323-333, 1983.

WAGNER, C.M. **Herança genética da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 69p. Dissertação, Mestrado.

WEGRZYN, V.A.; HILL, JR., R.R.; BAKER, D.E. Soil-fertility-crop genotype associations and interactions. **Journal of Plant Nutrition**, v.2, p.607-627, 1980.

WHEELER, D.M.; DODD, M.B. The effect of aluminium on the growth of a range of temperate legume species and cultivars: a summary of results. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAUMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**: principles and management. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.433-437.

WHEELER, D.M.; EDMEADES, D.C.; CHRISTIE, R.A.; GARDNER, R. Effect of aluminium on the growth of 34 plants species: a summary of results obtained in low ionic strengh solution culture. **Plant and Soil**, v.146, p.61-66, 1992.

WHEELER, D.M.; EDMEADES, D.C.; CHRISTIE, R.A.; GARDNER, R. Comparasion of techiniques for determining the effect of aluminum on the growth of roots and the inheritance of aluminum tolerance in wheat. **Plant and Soil**, v.146, p.1-8, 1992.

WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; RITCHEY, K.D.; WRIGHT, S.F. Influence of soil solution aluminum on root elongation of wheat seedlings. **Plant and Soil**, v.113, p.294-298, 1989.

WU, P.; ZHAO, B.; YAN, J.; LUO, A.; WU, Y.; SENADIDIHRA, D. Genetic control of seedling tolerance to aluminum toxicity in rice. **Euphytica**, v.97, p.289-293, 1997.

XU, A.B.; ZHU, M.Y.; DANG, B.Y.; YUAN, M.B.; HUANG, C.N.; YU, J.J. Studies on genetic improvement of barley yield on reddish soil. **Journal of Hangzhou University**, v.20, p.88-92, 1993.

YOST, R.; CALDWELL, R.; CONSTANTINIDES, M.; HERBERT, D.; FOWNES, J. The sustainability of agriculture and forestry production systems on soils with low pH. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH** : sustainable agriculture and forest production. Campinas: Brazil Soil Science Society, 1996. p.29-38.

ZAKE, V.M.; WATSON JR., C.E.; GOURLEY, L.M. Performance of grain sorghum hybrids on infertile, acid soils in Kenya. **Agronomy Abstracts**, p.120, 1992.

ZALE, J.M.; BRIGGS, K.G. Aluminum tolerance in Canadian spring wheats. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.1259-1272, 1988.

ZANELLA, C.C.; ZANETTINI, M.H.B.; FERNANDES, M.I.B.M.; ZINN, D.M. Differential effects of soil acidity and lime treatment on the chromosomes of two wheat cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.1021-1032, 1991.

ZEIGLER, R.S.; PANDEY, S.; MILES, J.; GOURLEY, L.M.; SARKARUNG, S. Advances in the selection and breeding of acid-tolerant plants: Rice, maize, sorghum and tropical forages. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAYMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Ed.) **Plant-Soil interactions at low pH**: principles and management. London: Kluwer Academic, 1995. p.391-406.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat:. I. Al – induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, v.117, p.475-751, 1998.

ZOBEL, R.W. Stress resistance and root systems. In: WORKSHOP ON ADAPTATION OF PLANTS TO SOIL STRESSES, Lincoln, 1993. **Proceedings**. Lincoln: University of Nebraska,1993. p.80-102. (INTSORMIL. Publication, 94-2)

26

GENÉTICA BIOQUÍMICA APLICADA AO MELHORAMENTO

RICARDO ANTUNES AZEVEDO
SILVIA MARIA GUERRA MOLINA

Depto. de Genética - USP/ESALQ - C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.

1. INTRODUÇÃO

Todo o funcionamento da célula e suas respostas às pressões do ambiente, dependem fundamentalmente das reações bioquímicas que nela ocorrem, as quais estabelecem seu padrão fisiológico de ação e resposta. As reações bioquímicas por sua vez, são influenciadas por diversos fatores tais como condições de pH, disponibilidade de elementos precursores, presença de co-fatores necessários às reações, ativação de mecanismos enzimáticos na célula etc. Mas, o que caracteriza uma reação como bioquímica é, essencialmente, a presença e a ação de macromoléculas, destacando-se entre essas a função das proteínas. Produtos da expressão gênica, as proteínas são integrantes essenciais dos diferentes eventos celulares. Especialmente aquelas com atividade catalítica, caracterizam-se como reguladoras da amplitude dos fenômenos bioquímicos fisiológicos, sejam esses processos de manutenção ou de indução, repressão ou inibição enzimática na célula.

A área da Genética Bioquímica prioriza o estudo dos fenômenos fisiológicos celulares como método para se obter informações sobre a ação e regulação gênica. Assim, pela análise e compreensão das reações bioquímicas envolvidas em um dado fenômeno chega-se a elucidar amplamente diversos aspectos do metabolismo celular e desta forma a identificar os possíveis pontos adequados para alteração genética. Visto que vários dos elementos envolvidos são resultado da expressão gênica, pode-se então, inferir sobre a regulação e ação dos genes relacionados a tais eventos celulares, pelo estudo das enzimas envolvidas nessas reações.

Dentre os inúmeros processos que vêm sendo estudados por meio de modelos desenvolvidos a partir da genética bioquímica, pode-se citar os processos da fotossíntese, a resposta antioxidativa ao estresse decorrente de condições do ambiente, a eficiência do uso do nitrogênio e de diversos outros elementos nutrientes e a biossíntese de aminoácidos. Pela modificação e acompanhamento de processos como esses, abre-se a perspectiva de se manipular plantas geneticamente, e mesmo, de se obter informações relevantes ao desenvolvimento de processos de melhoramento genético, estabelecendo suporte teórico-prático adequado à condução dos mesmos.

Desta forma, vem-se alterando em pontos específicos, diversos processos de desenvolvimento; o controle da síntese e acumulação de proteínas e o desenvolvimento dos grãos; características nutricionais da semente via modificações em sua estrutura e composição; níveis e características de hormônios; metabolismo de parede celular; proteínas de defesa e resposta a patógenos. Além disso, muitos dos complexos enzimáticos fundamentais a processos biológicos têm servido de forma bastante significativa à aplicação genética como marcadores utilizados no estudo da estrutura genética de populações, mediante o emprego de eletroforese de isoenzimas.

No presente capítulo, serão abordados alguns modelos de estudo e aplicação da Genética Bioquímica para a compreensão dos processos celulares e conseqüente aplicação ao melhoramento de plantas, seja por métodos convencionais ou pela biotecnologia moderna.

2. ANÁLISE DO METABOLISMO DE PLANTAS PELO USO DE MUTANTES BIOQUÍMICOS

Em uma revisão de Miflin & Lea (1982), foi ressaltado que muitas das informações sobre vias metabólicas foram obtidas pelo uso de mutantes bioquímicos de bactérias e fungos portadores de alterações em enzimas essenciais aos processos estudados. O rápido avanço na obtenção de mutantes bioquímicos em plantas superiores, especialmente em arabidopsis e cevada, comprovou a importância de tal alternativa para o estudo do metabolismo e sua possível alteração genética visando ao melhoramento para uma dada característica. Nesta seção, serão apresentados alguns exemplos de mutantes obtidos para as vias de fotorrespiração, assimilação de amônia e biossíntese de aminoácidos em plantas.

2.1 FOTORRESPIRAÇÃO

A liberação de dióxido de carbono (CO_2) em presença de luz, simultaneamente ao processo de absorção de gás carbônico pela fotossíntese, caracteriza o fenômeno da fotorrespiração. Sabe-se que a enzima Rubisco (ribulose 1,5-bifosfato) que representa de 40% a 50% das proteínas de folhas das plantas, catalisa a fixação do CO_2 ao exercer sua atividade carboxilase. Em plantas C_3 a fotorrespiração acorre pelo favorecimento na Rubisco de sua atividade oxigenase, porque nessas plantas, o oxigênio (O_2) compete com o CO_2 pelo mesmo sítio ativo daquela enzima. Já em plantas C_4, a anatomia foliar promove maior isolamento da Rubisco em relação ao O_2, sendo característico dessas plantas a presença de um anel de células que circundam os feixes vasculares, constituindo a bainha vascular. Desta forma, nas plantas C_4 a atividade carboxilase da Rubisco é favorecida, enquanto que as plantas C_3 consomem energia na assimilação de CO_2 que eventualmente não vêm a utilizar, configurando-se um modelo de fixação do carbono ineficiente em termos energéticos. Em outras palavras, quando plantas C_3 são iluminadas, elas não só irão fixar CO_2 via o ciclo de Calvin (Figura 1), mas também irão liberar o CO_2 em um processo dependente de oxigênio. Esta fotorrespiração (Figura 2), ao contrário da respiração, é um processo que desperdiça energia o que resulta em um decréscimo na eficiência da assimilação líquida de carbono.

Por outro lado, já se constatou que tanto a presença de 0,7% de CO_2 quanto a ausência de luz inibem a fotorrespiração. Somerville & Ogren (1979) desenvolveram um modelo simples de seleção de plantas C_3 que não apresentavam enzimas relacionadas à fotorrespiração. O modelo, na sua essência, envolvia a mutagênese de sementes e subseqüente crescimento de plantas (M_2) na presença de alta concentração de CO_2 (0,7%), concentração esta que inibe competitivamente a atividade de oxigenase da Rubisco, prevenindo portanto a operação do ciclo fotorrespiratório. Quaisquer plantas com mutações nesta via poderiam crescer normalmente em CO_2, entretanto, quando mantidas em ar, ou seja, menores concentrações relativas de CO_2, eventuais bloqueios existentes nessa via poderiam ser detectados porque levariam a um dano visível nas folhas pelo aumento da fotorrespiração e conseqüente redução na eficiência da fixação do CO_2. O retorno destas plantas para maiores concentrações de CO_2, por sua vez, restauraria o crescimento normal. Pelo uso desta estratégia, foram selecionados mutantes para várias enzimas (Lea *et al.*, 1992). Entre os diversos mutantes isolados por meio deste modelo, serão destacados alguns dos obtidos em cevada.

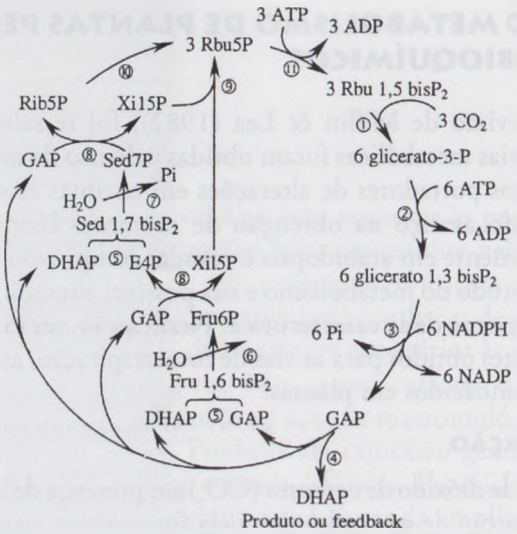


FIGURA 1. *O ciclo de Calvin.* O ciclo de Calvin é comum a todas as plantas. Virtualmente, todo o carbono orgânico da biosfera passa através do Ciclo de Calvin, que ocorre nos cloroplastos e compreende 13 reações catalisadas por 11 enzimas tendo 4 características principais: (1) Carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) para produzir glicerato 3-fosfato pela ação da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco). (2) Redução do glicerato 3-fosfato para triose fosfato com uso de ATP e NADPH. (3) Regeneração do aceptor primário, RuBP, pelo qual 5 moléculas de triose fosfato são rearranjadas em 3 moléculas de 5 carbonos (pentose fosfato). Mais uma molécula de ATP é utilizada para converter pentose fosfato em RuBP, dessa forma, 3 ATP e 2 NADPH são necessários para cada molécula de CO_2 fixada. (4) Autocatalise: para cada 3 voltas do ciclo, uma molécula de triose fosfato é gerada a partir de 3 moléculas CO_2. Esta triose fosfato tanto pode ser utilizada na síntese de amido ou sacarose como pode ser reintroduzida no ciclo de Calvin para formar RuBP. As enzimas desse Ciclo são as seguintes: 1, Rubisco; 2, glicerato 3-fosfato; 3, gliceraldeído fosfato dehidrogenase (dependente de $NADP^+$); 4, triose fosfato isomerase; 5, aldolase; 6, frutose bifosfatase; 7, sedoheptolose bifosfatase; 8, transcetolase; 9, ribulose 5-fosfato 3-epimerase; 10, ribulose 5-fosfato isomerase; 11, ribulose 5-fosfato quinase.

O isolamento de um mutante de cevada que não apresentava atividade da fosfoglicolato fosfatase provou que o fosfoglicolato era o primeiro produto da via fotorrespiratória e, portanto, fonte de glicolato e CO_2. Este mutante mostrou ser incapaz de manter as taxas normais de fixação de CO_2, ou seja, uma completa ausência de fluxo de carbono através da via fotorrespiratória (Blackwell *et al.*, 1988).

Por duas técnicas distintas, uma delas como descrita acima e outra por transformação genética, foram obtidos respectivamente um mutante de cevada e um tabaco transgênico, deficientes em atividade de catalase (Kendall *et al.*, 1983; Willekens *et al.*, 1997). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido no peroxissoma pela oxidação de glicolato é metabolizado pela ação da catalase, visto a alta toxicidade deste metabólito. Estes materiais apresentaram deficiência de crescimento se cultivadas sob condições fotorrespiratórias, apresentando desenvolvimento normal apenas quando mantidos em alta concentração de CO_2 ou baixa luminosidade, condições que inibem a fotorrespiração. O emprego de tais mutantes fica limitado a determinadas

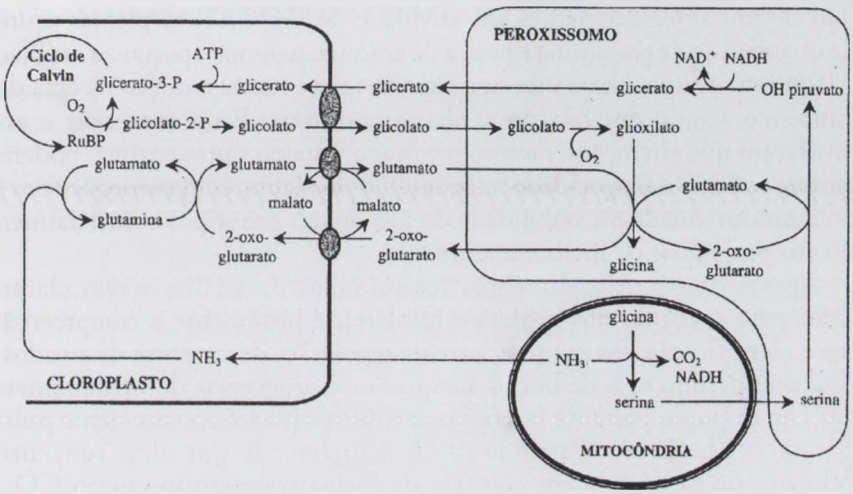


FIGURA 2. *A via fotorrespiratória e sua localização intracelular.* A enzima Rubisco no cloroplasto pode ter tanto função de carboxilase como de oxigenase. A oxigenase leva à formação do glicolato 2-fosfato a partir do qual o glicerato 3-fosfato é regenerado na via fotorrespiratória. Durante este processo, um quarto do carbono do glicolato é perdido como CO_2, junto com metade do nitrogênio (NH_3 e glicina).

condições do ambiente. Contudo, em muito podem colaborar no sentido de se observar pontos chave na regulação de processos como a fotossíntese e a fotorrespiração, visto que ambos estão envolvidos diretamente na produção de biomassa. Além disso, quando plantas são submetidas a condições de estresse oxidativo, seja ele induzido por presença de poluentes como metais pesados do solo, de gases poluentes como o ozônio e dióxido de enxofre, por variações de condições hídricas e salinas, pelo ataque por patógenos, entre outras condições, espécies reativas de oxigênio são produzidas nas células podendo levá-las à morte pela sua ação ao nível molecular e conseqüente expressão ao nível celular. Nestas condições de estresse, a concentração de H_2O_2 se eleva pela detoxificação das espécies reativas de oxigênio em uma reação catalisada pelas diferentes classes de superóxido dismutases (Azevedo *et al.*, 1998). Pela ausência de atividade de catalase e impossibilidade de metabolizar o H_2O_2 gerado, a célula modifica suas respostas fisiológicas no sentido de ativar rotas secundárias e(ou) alternativas, modificando muitas vezes todo um padrão de crescimento normal.

Dentre os vários mutantes que têm sido selecionados, aqueles apresentando alterações para as enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) são particularmente importantes (Lea *et al.*, 1992). Estas enzimas são fundamentais no ciclo do nitrogênio em plantas e, portanto, qualquer alteração pode eventualmente afetar de forma significativa as plantas. No caso da GS, vários mutantes deficientes nesta atividade têm sido obtidos e caracterizados (Blackwell *et al.*, 1987). Plantas mutantes que apresentam a atividade de GS diminuída em relação a plantas normais, mostram o acúmulo de amônia nas folhas quando expostas ao ar além de uma dramática redução na concentração de aminoácidos-chave no ciclo do nitrogênio fotorrespiratório assim como na taxa de assimilação de CO_2 (Blackwell *et al.*, 1988).

No caso de mutantes deficientes em atividade de GOGAT, as plantas acumulam grande quantidade de glutamina e pouca de amônia quando expostas ao ar (Blackwell *et al.*, 1988). Contudo, altamente significativa foi a intensa redução na taxa de CO_2 fotossintético fixado em relação a plantas normais. Estes materiais e análises demonstraram que alterações, mesmo restritas a uma ou outra enzima, podem levar a expressiva redução na capacidade fotossintética da planta, com conseqüências graves quanto à produtividade e à viabilidade do uso de tais genótipos comercialmente ou mesmo em programas de melhoramento.

Apesar desses procedimentos bioquímicos de análise serem claramente indicados para o estudo dos processos celulares, é justamente a compreensão dos eventos e identificação dos pontos-chave de regulação, decorrentes de estudos dessa natureza que permitem a definição adequada de programas de melhoramento de plantas. Um exemplo bastante interessante e ilustrativo foi recentemente publicado por Barata *et al.* (2000). Partindo-se do princípio de que altas concentrações intracelulares de O_2 interferem e atuam de forma competitiva com o CO_2 pelas atividades de oxigenase e carboxilase da Rubisco, Barata *et al.* (2000) transferiram o gene que codifica a leghemoglobina de soja para tabaco, direcionando a proteína para o cloroplasto, testando a hipótese de que a leghemoglobina viria a seqüestrar o excesso de O_2 presente nessa organela. Tal procedimento deveria favorecer a atividade de carboxilase, porque estaria reduzindo ou mesmo inibindo significativamente a operação do ciclo fotorrespiratório, com eventual aumento de biomassa de plantas C_3 nas condições normais de ambiente, que para estas plantas, favorecem a fotorrespiração. Apesar do sucesso na produção das plantas transgênicas e análise dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, ficou constatado que a relação entre a concentração de O_2 e a da proteína leghemoglobina, foi alta e desta forma insuficiente para reduzir a taxa de O_2 a níveis que permitiriam modificações fisiológicas significativas, ou seja, a redução da fotorrespiração de modo a se alcançar o esperado aumento de biomassa em função da maior fixação do CO_2.

2.2 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Dentre algumas das culturas de maior produção mundial, predominam os cereais e leguminosas. Entretanto, como cada grupo vegetal apresenta determinadas particularidades em relação à sua composição química, nenhum deles se caracteriza como um alimento completo capaz de suprir as necessidades nutricionais humanas. No caso dos cereais, o valor energético dado pela sua composição de carboidratos, apesar de significativo e de caracterizar este grupo vegetal, contrapõe-se ao baixo valor nutritivo de suas proteínas devido às reduzidas concentrações de alguns aminoácidos essenciais, mais especificamente de lisina, treonina e triptofano.

Melhorar o valor nutritivo dos vegetais vem sendo, há algum tempo, ponto de consenso entre pesquisadores. Muitas estratégias foram idealizadas com o intuito de produzir cereais com sementes acumulando lisina, o principal aminoácido limitante neste grupo vegetal. Poderiam ser destacadas quatro estratégias principais que vêm sendo testadas e adotadas, algumas delas dependentes da evolução no estabelecimento de tecnologias específicas: melhoramento genético convencional, identificação de mutantes espontâneos em populações naturais, indução de mutantes bioquímicos e produção de plantas transgênicas (Azevedo & Lea, 2001; Molina *et al.*, 2001).

Pelo melhoramento genético convencional, genótipos de milho têm sido selecionados apresentando variabilidade para a concentração de lisina (Paez *et al.*, 1969; Zuber *et al.*, 1975; Moro *et al.*, 1996). Esta técnica, no entanto, é menos eficiente que outras atualmente disponíveis, principalmente por requerer um longo tempo para se atingir algum progresso, sendo que mesmo assim com limitação em termos de elevação nos níveis de aminoácidos.

Por outro lado, o isolamento de mutantes naturais apresentou-se como uma primeira alternativa que trouxe progressos significativos nesta área. A identificação do mutante opaco-2 (o_2) de milho (Mertz *et al.*, 1964), entre muitos outros como as variações floury, e-a do mutante de cevada "Hiproly" (*lys1*), ambos para alta lisina (Munck, 1992) caracterizaram-se como eventos muito importantes que traçaram novos rumos para as pesquisas desenvolvidas desde então. Contudo, após a euforia inicial devida à alta concentração de lisina constatada nesses mutantes atribuída a uma alteração na distribuição das proteínas de reserva do endosperma e também à maior disponibilidade do aminoácido na forma solúvel, seguiu-se um grande desapontamento pela associação nos mesmos, de características agronômicas indesejáveis tais como baixa produtividade e alta suscetibilidade a patógenos, que mostraram ser devidas principalmente ao aspecto farináceo que caracteriza a estrutura da semente nestes mutantes. Apesar disto, em anos recentes, a descoberta de genes modificadores que induzem alterações pronunciadas no fenótipo do grão tornando-o vítreo, mas mantendo o valor nutritivo do opaco-2, foi um fato marcante para o avanço do melhoramento desse tipo de material mutante (Vasal, 1994; Gaziola *et al.*, 1999). Os programas de melhoramento desenvolvidos no *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo* (CIMMYT) no México e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no Brasil, resultaram na liberação de linhagens e híbridos do tipo *Quality Protein Maize* (QPM), os quais já estão disponíveis há algum tempo no mercado de sementes, com sua área de produção aumentada consideravelmente nos últimos anos. Esse material tem sido essencialmente utilizado na alimentação de porcos.

O extenso estudo enzimológico da via do ácido aspártico, pela qual são sintetizados os aminoácidos lisina, treonina, metionina e isoleucina, apresentou evidências diretas de regulação por retroinibição em seus passos chave (Figura 3) (Azevedo *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2001). Estudos bioquímicos, genéticos e moleculares contribuíram consideravelmente para o conhecimento dos aspectos regulatórios dessa via, mostrando que as enzimas-chave são reguladas por retroinibição e em alguns pontos da via podem ainda ser estimuladas pelo produto final (Azevedo *et al.*, 1997). Dentre essas enzimas, os papéis da aspartato quinase (AK), homoserina desidrogenase (HSDH) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS) foram investigados em detalhes e mostraram ser os principais pontos de controle de fluxo de carbono da via (Azevedo & Lea, 2001).

A primeira enzima da via, a AK, que converte o ácido aspártico em β-aspartil fosfato, foi bem caracterizada em plantas superiores, incluindo arroz, cevada, milho, cenoura, ervilha e tabaco. Duas classes de isoenzimas da AK que podem ser inibidas por lisina ou por treonina, foram observadas em plantas. Apesar do expressivo avanço dos estudos bioquímicos, apenas recentemente a clonagem de genes que codificam as isoenzimas da AK foi relatada em plantas (Azevedo *et al.*, 1997).

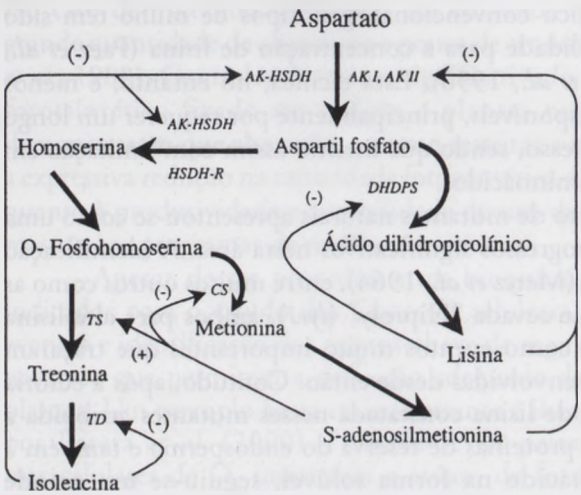


FIGURA 3. *Via do ácido aspártico em plantas superiores.* Os pontos regulatórios estão indicados com (-) para inibição ou repressão e (+) para ativação enzimática. AKI e AKII, isoenzimas da aspartato quinase sensíveis à lisina sozinha ou de forma sinergística com S-adenosilmetionina (SAM); AKI – HSDHI, isoenzima bifuncional aspartato quinase-homoserina desidrogenase sensível a treonina; DHDPS, dihidrodipicolinato sintase sensível a lisina; CS, cistationina γ-sintase reprimida por SAM; TS, treonina sintase ativada por SAM; TD, treonina dehidratase sensível a isoleucina.

A enzima HSDH, que catalisa a redução do aspartato semi-aldeído em homoserina, está presente em plantas na forma de isoenzimas, uma resistente (HSDH-R) e a outra sensível (HSDH-S) a retroinibição pela treonina (Azevedo *et al.*, 1997). Por meio de análises bioquímicas e moleculares, observou-se que a isoenzima sensível a treonina é na realidade parte de um polipeptídeo bifuncional que contém também a atividade de AK sensível a treonina (Wilson *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1992). Desde então, a existência deste polipeptídeo foi observada em todas as espécies de plantas estudadas (Azevedo *et al.*, 1997; Azevedo & Lea, 2001). Genes que codificam para a enzima bifuncional AK-HSDH têm sido isolados e estudados na sua regulação em várias espécies de plantas (Azevedo *et al.*, 1997).

No ramo da via do ácido aspártico que leva unicamente à biossíntese de lisina, a enzima DHDPS, que catalisa a fusão do piruvato e aspartato semi-aldeído em dihidrodipicolinato, apresenta papel chave na regulação, tendo sido purificada e caracterizada em várias espécies de plantas (Azevedo *et al.*, 1997) e ao contrário das outras enzimas com aspecto regulatório na via, que apresentam-se na forma de isoenzimas, a DHDPS existe em apenas uma forma, que é fortemente inibida por baixas concentrações de lisina (Wallsgrove & Mazelis, 1981). Clones de cDNA codificando DHDPS foram isolados em várias espécies de plantas (Azevedo *et al.*, 1997).

Apesar de considerável informação ter sido obtida para a biossíntese de lisina, o catabolismo deste aminoácido foi pela primeira vez demonstrado em plantas, em experimentos utilizando lisina-C^{14}, com a radioatividade sendo incorporada ao aminoadípico semi-aldeído e ao glutamato, indicando a degradação da lisina via sacaropina (Figura 4) (Sodek & Wilson, 1970; Brandt, 1975). Estudos recentes vêm indicando recorrentemente que o catabolismo da lisina tem um papel importante na acumulação deste aminoácido em sementes, pois uma deficiência no processo de degradação da lisina aumentaria a disponibilidade deste aminoácido com conseqüente acúmulo principalmente na forma solúvel. Recentemente verificou-se que o

catabolismo da lisina é regulado pela ação de duas enzimas: a lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR, também denominada lisina α-cetoglutarato redutase, LKR), que condensa a lisina e o 2-oxoglutarato a sacaropina, e a sacaropina desidrogenase (SDH), que catalisa a hidrólise da sacaropina em aminoadípico semi-aldeído e glutamato. Estas enzimas têm sido isoladas e caracterizadas em detalhe em milho (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996), arroz (Gaziola *et al.*, 1997), feijão (Lima, 1999) e soja (Miron *et al.*, 2000). No caso de cereais, LOR e SDH mostraram ser específicas do endosperma (Azevedo *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2001).

A possibilidade de seleção de mutantes bioquímicos caracterizou-se como mais uma ferramenta importante a contribuir para o entendimento da regulação dessa via. Vários estudos demonstraram que estes mutantes apresentam enzimas alteradas na sua sensibilidade à retroinibição, podendo exibir aumentos nos aminoácidos produtos-finais. Estes mutantes foram obtidos pela utilização de mutagênese de sementes ou de células *in vitro*, que foram então submetidas ao processo de seleção em meio contendo esses aminoácidos ou seus análogos (Lea *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 2001).

No caso de sementes, o sistema envolve o uso de embriões maduros da geração M_2 derivadas de sementes M_1 que são tratadas com mutagênico químico ou físico. Estes embriões então, são germinados e crescidos em meio estéril contendo agentes seletivos (lisina, treonina ou análogos desses aminoácidos). Plântulas que apresentam capacidade de crescer normalmente nestas condições, são cultivadas até a maturidade e então autofecundadas. As sementes produzidas são analisadas bioquimicamente para as atividades das enzimas-chave da regulação da via do ácido aspártico. Paralelamente, as plantas mutantes são analisadas geneticamente para determinação do modelo de herança do caráter. Finalmente, os mutantes passam por uma caracterização e avaliação agronômica, para que possam então ser incluídos em um programa de melhoramento. A maior vantagem deste sistema reside no fato dos embriões dependerem unicamente dos nutrientes do meio de cultura e da capacidade de síntese de seus próprios aminoácidos, sendo mais sensíveis aos agentes seletivos que sementes intactas porque o endosperma não está presente para prover a semente de outros nutrientes e aminoácidos, que não os do próprio meio de cultura. Por outro lado, uma limitação importante do sistema reside principalmente no fato de demandar grande quantidade de trabalho e espaço, levando conseqüentemente a uma limitação no número de indivíduos que podem ser analisados.

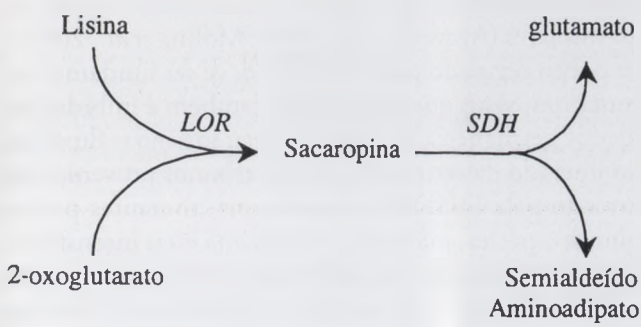


FIGURA 4. *Via de degradação de lisina em plantas superiores.* A enzima bifuncional, LOR-SDH, catalisa os dois passos da via, sendo que a atividade de LOR é fortemente modulada por eventos e constituintes celulares como força iônica, cálcio e fosforilação-desfosforilação.

O uso de cultura de tecidos com subseqüente possibilidade de regeneração de plantas em muito favoreceu a utilização deste modelo de seleção bioquímica (Figura 5). Grande número de mutantes pode ser selecionado em espaços reduzidos de placas de Petri e tubos de cultura, onde grande número de células está presente. Por este sistema, culturas de calos ou células em suspensão podem ser tratadas com mutagênico químico (geralmente azida sódica) e então transferidas para novo meio de cultura contendo o agente seletivo como descrito acima. A presença do agente seletivo irá inibir o desenvolvimento das células normais e aquelas que eventualmente crescerem deverão ser mutantes, podendo conter as enzimas-alvo alteradas na sua regulação. O processo seletivo é normalmente mantido durante vários ciclos para garantir que ocorra a multiplicacão apenas das células mutantes, processo que é repetido quando as células são transferidas para meio de regeneração. A intensidade e continuidade da pressão de seleção é importante visto que revertentes e(ou) células não mutadas normalmente são observadas. Verifica-se também que o sistema de calos geralmente é menos eficiente devido à formação de gradientes de concentração do agente seletivo, de forma que por estarem mais distantes do meio de cultura, as células localizadas na parte superior do calo podem vir a receber quantidades proporcionalmente menores do agente seletivo. Sugere-se portanto, que no caso da utilização de calos, os repiques sejam mais freqüentes. Uma vez que as plantas sejam regeneradas, as mesmas deverão passar pelos mesmos procedimentos de análise aplicados a sementes, já descritos acima.

Em milho, Hibberd & Green (1982) selecionaram mutantes resistentes a inibição por lisina + treonina utilizando exatamente o método de mutação de calos acima descrito. Estes mutantes apresentaram no endosperma altas concentrações de treonina, mas não de lisina. Os genes denominados de *ask1* e *ask2* codificam isoenzimas da AK sensíveis a lisina e que nestes mutantes mostraram estar insensíveis à retroinibição pela lisina (Dotson *et al.*, 1990). Investigação posterior de um duplo mutante Ask1/opaco-2 mostrou um efeito sinergístico para o aumento na concentração de treonina no grão, chegando a 144 vezes quando comparado com o milho Ask1 normal. Tal efeito sinergístico também foi observado para a concentração total de aminoácidos solúveis (3 vezes) e para a concentração das proteínas de reserva do endosperma (Azevedo *et al.*, 1990). Estes resultados associados a análises posteriores que incluíram o mapeamento do gene *ask1* ligado ao gene *opaco-2* no cromossomo 7 de milho, sugeriram que o gene *opaco-2* pode desempenhar um papel regulatório sobre o gene *ask1* (Brennecke *et al.*, 1996; Gaziola *et al.*, 1999).

Assim como no caso de milho, outros mutantes em outras espécies demonstraram resultados muito similares (Azevedo *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2001). Tais resultados sugeriram que o ponto regulado pela DHDPS deve ser fundamental para o acúmulo de lisina nos mutantes, visto que esta enzima também é inibida por lisina e que nos mutantes estudados permanecia sensível, ou seja, mesmo o fluxo no passo regulado pela AK estando liberado da retroinibição, os carbonos provenientes não passavam pelo passo controlado pela DHDPS. Desta forma, mutantes para a DHDPS foram obtidos em algumas espécies, mas apesar da enzima estar insensível à inibição pela lisina, o acúmulo deste aminoácido foi observado em folhas, mas não no endosperma (Frankard *et al.*, 1992; Heremans & Jacobs, 1994; Azevedo & Arruda,

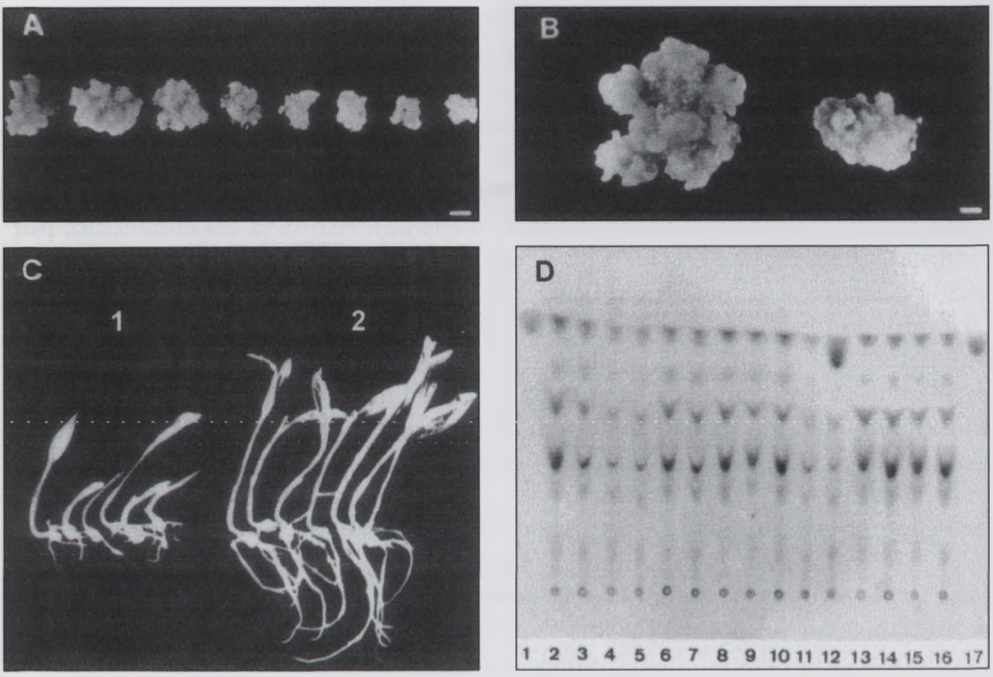


FIGURA 5. *Processo geral de indução e seleção de mutantes bioquímicos utilizando cultura de tecidos.* Como exemplo, está apresentada a estratégia adotada para a seleção do mutante de milho LT19, o qual apresenta uma AK insensível a retroinibição pela lisina + treonina, com conseqüente acúmulo de treonina nos tecidos da planta. (A) Calos de milho foram mantidos por 7 dias em meio básico Murashige e Skoog (MS) com concentrações crescentes de lisina + treonina (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 mM). (B) Detalhe dos calos após 7 dias em 0 e 2 mM de lisina + treonina. (C) Após tratamento dos calos com azida sódica e manutenção dos mesmo por 3 meses de consecutivos repiques em meio MS contendo 2 mM lisina + treonina, as plantas foram regeneradas, crescidas até a maturidade e autofecundadas. Embriões R_1 da planta regenerada LT19 e embriões da linhagem original Cat100-1 foram excisados das sementes e cultivados em meio MS contendo 2 mM de lisina + treonina por 5 dias. Ao final deste período, os embriões da linhagem original (C.1) apresentaram forte inibição do crescimento enquanto que os embriões do mutante LT19 (C.2) segregaram 1 resistente : 1 sensível (apenas embriões resistentes estão apresentados). (D) Análise bioquímica via cromatografia em camada delgada para o acúmulo de treonina solúvel em anteras de plantas LT19, mostrou acúmulo de treonina (planta 12) em relação às plantas da linhagem original (2-11 e 13-16). Linhas 1 e 17 representam o padrão de treonina. Análise genética posterior determinou que a resistência a inibição pela lisina + treonina e conseqüente acúmulo de treonina é uma característica dominante condicionada pelo gene *ask1* que foi mapeado no braço curto do cromossomo 7 de milho (Azevedo *et al.*, 1990 – Mapa Genético do Milho, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*).

1995). Embora a obtenção dos mutantes para DHDPS tenha confirmado a regulação no ponto controlado pela enzima DHDPS, o fato de não ocorrer acúmulo de lisina no grão foi surpreendente e gerou uma revisão do modelo teórico proposto para a via do ácido aspártico.

Baseado nesta idéia geral, de selecionar mutantes para a AK e a DHDPS, e com o desenvolvimento relativamente recente das técnicas de transformação, plantas transgênicas expressando AK e DHDPS, insensíveis a inibição pela lisina, foram

produzidas inicialmente em tabaco utilizando-se de uma estratégia bastante interessante (Shaul & Galili, 1992a; 1992b). Na realidade, a identificação das vias de síntese desses aminoácidos em microrganismos e os processos regulatórios envolvidos foram identificados bem antes do início desses estudos em plantas (Umbarger, 1978). Além disto, mutantes de *Escherichia coli* contendo a enzima AK insensível a lisina já haviam sido obtidos antes desta enzima ter sido isolada pela primeira vez de uma planta (Patte *et al.*, 1967). Assim, já era conhecido, por exemplo, que a enzima DHDPS de *E. coli* é caracteristicamente cerca de 50 vezes mais resistente a inibição pela lisina quando comparada a enzima de plantas. Portanto, ao invés de se utilizar mutação para esta enzima de planta, tornando-a insensível a inibição pela lisina, uma outra possível estratégia seria a transformação de plantas com o gene da DHDPS de *E. coli*. Tal procedimento teria resultado equivalente ao da alteração direta na DHDPS da própria planta e levaria uma planta transformada a necessitar de concentrações muito mais altas de lisina para a inibição dessa enzima. Desta forma, aparentemente a enzima seria insensível a inibição por este aminoácido na planta.

Com base nesses pressupostos, o grupo liderado por G. Galili realizou uma série de experimentos testando tais possibilidades. Para isto, em um primeiro momento, uma AK de *E. coli* insensível a inibição pela lisina foi utilizada na transformação de tabaco (Shaul & Galili, 1992a) e em outro grupo de transformantes, a DHDPS de *E. coli* foi utilizada, sendo esta, como já era esperado, cerca de 50 vezes mais resistente a inibição pela lisina (Shaul & Galili, 1992b). Finalmente, os mutantes de tabaco foram cruzados, produzindo uma planta de tabaco contendo tanto a AK como a DHDPS de *E. coli*, mostrando o acúmulo de treonina, condicionado pela AK, e de lisina condicionado pela DHDPS. Os resultados observados para tabaco foram exatamente idênticos àqueles observados para os mutantes bioquímicos com alterações nas enzimas das próprias plantas, ou sejam, acúmulo de treonina em todos os tecidos da planta transformada com AK e acúmulo de lisina nas folhas de plantas transformadas com DHDPS de bactéria.

Utilizando de estratégia idêntica, obteve-se também a superprodução e acúmulo de lisina em cevada (Brinch-Pedersen *et al.*, 1996), canola e soja (Falco *et al.*, 1995). No caso de canola e soja, o acúmulo de lisina foi observado também em sementes, assim como o de ácido amino adípico em canola e de sacaropina em soja (Falco *et al.*, 1995), ambos intermediários da via de degradação de lisina (Azevedo & Lea, 2001).

Parece claro que em geral, pode-se obter a superprodução de lisina pela alteração da sensibilidade da DHDPS a lisina (Bittel *et al.*, 1996), mas o acúmulo em sementes de cereais parece depender de outras manipulações envolvendo também a via de degradação da lisina, pela LOR e(ou) SDH. A favor desta hipótese bastante aceita atualmente e revisada recentemente por Azevedo & Lea (2001) e Molina *et al.* (2001), destacam-se cinco aspectos principais: a) todos os mutantes bioquímicos e plantas transgênicas não apresentaram acúmulo significativo de lisina nas sementes, mas apenas em outros tecidos; b) apenas em cereais as enzimas da degradação, LOR e SDH, são específicas do endosperma (Gonçalves-Butruille *et al.*, 1996; Gaziola *et al.*, 1997); c) o mutante opaco-2 de milho, que apresenta alta concentração de lisina solúvel e protéica nas sementes, apresenta as atividades de LOR e SDH muitas vezes

reduzidas em relação ao tipo selvagem (Brochetto-Braga *et al.*, 1992; Gaziola *et al.*, 1999; Kemper *et al.*, 1999); d) constatou-se acúmulo de intermediários do catabolismo de lisina nas sementes de soja e canola transgênicas superprodutoras de lisina (Falco *et al.*, 1995); e) entre os cereais, apesar da concentração de lisina ainda ser abaixo do recomendado pela FAO (1991), o arroz destaca-se por apresentar uma concentração relativamente mais alta de lisina na semente, o que pode ser explicado pela constatação de atividades mais baixas de LOR e SDH nesta planta (Gaziola *et al.*, 1997). Além disto, em feijão (Lima, 1999) e soja (Miron *et al.*, 2000) que naturalmente não apresentam deficiência em lisina, apresentaram as atividades de LOR e SDH significativamente mais baixas que no endosperma de cereais que são deficientes neste aminoácido.

Este modelo estabelecido para os cereais com relação à sua deficiência em lisina, demonstra claramente que a investigação dos parâmetros bioquímicos envolvidos são fundamentais para dar suporte à elaboração de estratégias de melhoramento genético, baseados principalmente no conhecimento dos passos bioquímicos regulatórios e sua possível manipulação genética dentro de um programa de melhoramento.

Outros modelos de estudo poderiam ainda ser apresentados, alguns dos quais referentes a aminoácidos que não teriam necessariamente como objetivo o aspecto nutricional. Exemplificando, vários mutantes têm sido obtidos para a síntese de prolina que é um aminoácido sintetizado diretamente a partir do glutamato ou indiretamente a partir de ornitina e arginina. O acúmulo de prolina em tecidos de plantas submetidas a estresse hídrico e salino tem sido amplamente relatado (Lea *et al.*, 1992). Na realidade, o papel da prolina ainda não está claro, mas sugere-se que este aminoácido age como um regulador osmótico e parece estabilizar enzimas na forma ativa. O acúmulo da prolina parece ser resultado do aumento da síntese *de novo* assim como de um decréscimo de sua degradação (Rhodes *et al.*, 1986).

Empregando métodos semelhantes aos descritos para obtenção de mutantes resistentes a inibição por lisina e treonina, foram obtidos mutantes de cevada para o acúmulo de prolina (Kueh & Bright, 1981). Observou-se acúmulo de prolina solúvel variando de 3-6 vezes nos diferentes mutantes. Ao contrário do sugerido por Haglund (1980) que o aumento de prolina promove o ataque por insetos, os mutantes de cevada analisados mostraram padrões muito similares ao controle normal (Bright *et al.*, 1982). Estes mutantes quando submetidos a severo estresse hídrico também apresentaram acúmulo mais rápido de prolina do que o controle. Além disso, no caso de estresse salino induzido pelo crescimento em meio contendo cloreto de sódio, as folhas dos mutantes sempre apresentaram maior concentração de prolina em relação ao controle.

Desta forma, seria possível inferir que a variação da concentração de prolina poderia ser empregada em um programa de melhoramento onde materiais contendo mais prolina viriam a ser selecionados como genótipos provavelmente mais resistentes a seca. De forma similar, durante um processo de estiagem ou de controle de irrigação, um acompanhamento das concentrações de prolina nas folhas, teoricamente poderia ser um indicativo do início de um processo de estresse hídrico que estaria se instalando.

3. USO EFICIENTE DO NITROGÊNIO

A obtenção de maior eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (Figura 6) tem sido um objetivo tanto da agricultura capitalizada, quanto para a de baixos insumos. Isto porque tanto os desperdícios quanto a escassez deste elemento mineral, que é o mais exigido pelas plantas, geram problemas econômicos, ao ambiente, de saúde publica e de segurança alimentar.

Existem diversas soluções viáveis para aumentar a EUN. Uma das mais simples é a diminuição nas doses de adubos, para níveis que sejam produtivos e seguros (Fernandéz *et al.*, 1998). Leguminosas em rotação (Kumar & Goh, 2000) ou no cultivo de aléias (Zaharah *et al.*, 1999) fornecem nitrogênio e ainda melhoram várias características do solo. A fixação biológica do nitrogênio é outra alternativa que poderá ser mais empregada em gramíneas. Esta fixação é feita por bactérias endofíticas que colonizam o apoplasto (James & Olivares, 1998) ou para-nódulos induzidos artificialmente (Christiansen-Weniger, 1998). A agricultura de precisão pode otimizar a fertilização (Raun & Johnson, 1999) e finalmente existe a possibilidade do melhoramento genético, que já está gerando milhos produtivos em solos pobres em nitrogênio (Santos *et al.*, 1998).

A seleção de genótipos com maior EUN fundamenta-se principalmente na produtividade, mas variáveis secundárias devem ser consideradas. Dentre os parâmetros genéticos, podem ser destacados a absorção de nitrogênio até o florescimento, após o florescimento e a absorção total deste elemento, sua translocação, altura da planta e da espiga, peso de sementes e produtividade em níveis altos e baixos de nitrogênio, teor de clorofila, aumento de área e redução da senescência foliar, matéria seca total e aumento do teor de nitrogênio e peso dos grãos.

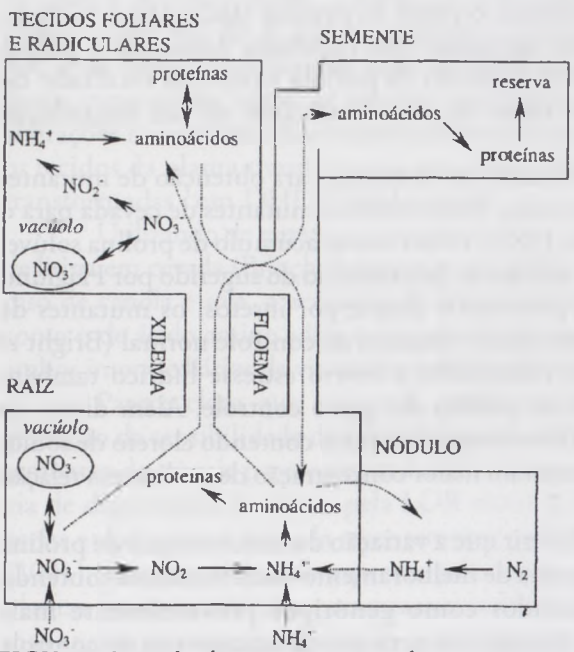


FIGURA 6. *Ciclo do nitrogênio em plantas.* Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio em plantas, desde a absorção na raiz até a deposição final em proteínas na semente.

Para identificar características de elevado valor adaptativo relacionadas à EUN, algumas variáveis inidicativas de mensuração relacionadas a parâmetros fisológicos e bioquímicos, ainda hoje pouco práticas, devem ser estudadas e validadas como é o caso da atividade da GS, que vem sendo sugerida como útil para discriminar genótipos eficientes (Machado, 1997), ou a

isomerização da Glutamato Desidrogenase (GDH) que está sendo proposta como indicadora de deficiências nutricionais de nitrogênio, potássio e fósforo em milho (Osuji *et al.*, 1998).

A obtenção de plantas transgênicas visando maior eficiência no uso do nitrogênio vem se baseando principalmente nas enzimas da assimilação do nitrogênio. Um exemplo disto é o da Universidade de Illinois que deu entrada em um processo de patente de plantas transformadas com GDH microbiana, o que condiciona maior aproveitamento do nitrogênio aplicado, resistência a herbicidas e maior teor de proteína. Algumas plantas também vêm sendo transformadas para aumento da expressão da isoforma citoplasmática da GS, apresentando também maior eficiência no uso do nitrogênio. A atividade da enzima nitrato redutase (NR) tem sido proposta como um critério auxiliar para a seleção de germoplasma eficiente no uso do nitrogênio e de maior produtividade (Feil *et al.*, 1993). Contudo, a superexpressão da NR e conseqüente aumento de crescimento parece variar entre as espécies. Feil *et al.* (1993) observaram correlação positiva e significativa entre a atividade da NR em plântulas e a produção de grãos de milho. Contudo, Eichelberger *et al.* (1989) estudando vários ciclos de seleção divergente para alta e baixa atividades de NR concluíram que embora tenha havido eficiência na seleção, a alta atividade de NR não proporcionou aumento de produtividade.

A análise de enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, especialmente aquelas relacionadas a pontos-chave nas vias metabólicas, como GS, GOGAT, GDH e NR, também poderá ser de grande valia tanto para a obtenção de plantas modificadas geneticamente como para dar suporte teórico-prático a programas de melhoramento que visem a maior eficiência no uso do nitrogênio. A extensão da utilização destas variáveis fisiológicas em apoio a um programa de melhoramento continua sob investigação e parece ser uma alternativa promissora.

4. CONCLUSÃO

Todos os exemplos apresentados procuraram mostrar que o entendimento da atividade celular sob o ponto de vista bioquímico é essencial, devendo ser colocado sempre sob a perspectiva adequada ao processo de melhoramento envolvido.

Assim, buscou-se evidenciar o valor da utilização de mutantes bioquímicos para um amplo estudo do metabolismo, um fato que já é bem conhecido de geneticistas de microrganismos desde os anos 50. De certa forma, parece surpreendente que bioquímicos e geneticistas de plantas tenham demorado tanto tempo para se aproximar dos avanços e benefícios do uso destes materiais. A continuidade do uso de genes mutantes e seu estudo no metabolismo da célula é fundamental e deve ser aplicado como suporte ao melhoramento convencional de plantas. Porém, seja qual for a técnica de melhoramento utilizada, o produto final deverá essencialmente passar pelo critério de avaliação bioquímica do fenômeno alvo e finalmente para confirmação de sua viabilidade agronômica e comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to ozone fumigation in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

AZEVEDO, R.A.; ARANA, J.L.; ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant *Ltr*19* with *opaque-2* maize mutant. **Plant Science**, v.70, p.81-90, 1990.

AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P. Dominant and recessive mutations conferring resistance to S-2 aminoethyl-L-cysteine in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.145, p.321-326, 1995.

AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, v.46, p.395-419, 1997.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, 2001. /No prelo/

AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: evidence for co-purification of threonine sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Phytochemistry**, v.31, p.3731-3734, 1992.

BARATA, R.M.; CHAPARRO, A.; CHABREGAS, S.M.; GONZÁLEZ, R.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, R.A.; SARATH, G. LEA, P.J.; SILVA-FILHO, M.C. Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effects on aerobic metabolism in transgenic plants. **Plant Science**, v.155, p.193-202, 2000.

BITTEL, D.C.; SHAVER, J.M.; SOMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G. Lysine accumulation in maize cell cultures transformed with a lysine-insensitive form of maize dihydrodipicolinate synthase. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.70-77, 1996.

BLACKWELL, R.D.; MURRAY, A.J.S.; LEA, P.J. Inhibition of photosynthesis in barley with decreased levels of glutamine synthetase activity. **Journal of Experimental Botany**, v.38, p.1799-1809, 1987.

BLACKWELL, R.D.; MURRAY, A.J.S.; LEA, P.J.; JOY, K.W. Sucrose synthesis and N metabolism in a photorespiratory mutant of barley in both chloroplastic glutamine synthetase and ferredoxin dependent glutamate synthase. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.845-858, 1988.

BRANDT, A.B. In vivo incorporation of lysine-C^{14} into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. **FEBS Letters**, v.52, p.288-291, 1975.

BRENNECKE, K.; SOUZA-NETO, A.J.; LUGLI, J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *opaque-2*. **Phytochemistry**, v.41, p.707-712, 1996.

BRIGHT, S.W.J.; LEA, P.J.; KUEH, J.S.H.; WOODCOCK, C.; HOLLOMAN, D.W.; SCOTT, G.C. Proline content does not influence pest and disease susceptibility of barley. **Nature**, v.295, p.592-593, 1982.

BRINCH-PEDERSEN, H.; GALILI, G.; KNUDSEN, S.; HOLM, P.B. Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.611-620, 1996.

BROCHETTO-BRAGA, M.R., LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase activity in normal and opaque-2 maize endosperms. **Plant Physiology**, v.98, p.1139-1147, 1992.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin induced tumors of cereal crops. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.55-76, 1998.

DOTSON, S.B.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A., GENGENBACH, B.G. Lysine insensitive aspartate kinase in two-overproducing mutants of maize. **Planta**, v.182, p.546-552, 1990.

EICHELBERGER, K.D.; LAMBERT, R.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase activity in maize. 1. Selection and correlated responses. **Crop Science**, v.29, p.1393-1397,1989.

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Biotechnology**, v.13, p.577-582, 1995.

FEIL, B.; THIRAPORN, R.; STAMP, P. In vitro nitrate reductase activity of laboratory-grown seedlings as an indirect selection criterion for maize. **Crop Science**, v.33, p.1280-1286, 1993.

FERNANDÉZ, J.E.; MURILLO, J.M.; MORENO, F.; CABRERA, F.; FERNANDÉZ-BOY, E. Reducing fertilization for maize in southwest Spain. Commun. **Soil Science Plant Analysis**, v.29, p.2829-2840, 1998.

FRANKARD, V.; GHISLAIN, M.; JACOBS, M. Two feedback-insensitive enzymes of the aspartate pathway in *Nicotiana sylvestris*. **Plant Physiology**, v.99, p.1285-1293, 1992.

GAZIOLA, S.A.; TEIXEIRA, C.M.G.; LUGLI, J.; SODEK, L.; AZEVEDO, R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, v.247, p.364-371, 1997.

GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARÃES, P.E.O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A. Quality protein maize: a biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1268-1275, 1999.

GONÇALVES-BUTRUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology**, v.110, p.765-771, 1996.

HAGLUND, B.M. Proline and valine - cues which stimulate grasshopper herbivory during drought stress? **Nature**, v.288, p.697-698, 1980.

HEREMANS, B.; JACOBS, M. Selection of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mutants resistant to aspartate-derived amino acids and analogues. **Plant Science**, v.101, p.151-162, 1994.

HIBBERD, K.A.; GREEN, C.E. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p.559-315, 1982.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.77-119, 1998.

KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; PAPES, F.; MARTINEZ-MORAES, K.C.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, v.11, p.1981-1994, 1999.

KENDALL, A.C.; KEYS, A.J.; TURNER, J.C.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, v.159, p.505-511, 1983.

KUEH, J.S.; BRIGHT, S.W.J. Proline accumulation in a barley mutant resistant to trans-4 hydroxy-L-proline. **Planta**, v.153, p.166-171, 1981.

KUMAR, K.; GOH, K.M. Crop residues and management practices: Effects on soil quality, soil nitrogen dynamics, crop yield, and nitrogen recovery. **Advances in Agronomy**, v.68, p.197-319, 2000.

LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; AZEVEDO, R.A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In: SHEWRY, P.R. (Ed.) **Barley**: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Wallingford: CAB International, 1992. p.181-208.

LIMA, S.T.C. Caracterização da enzima lisina cetoglutarato redutase (LKR)/ sacaropina desidrogenase (SDH) estudada em *Phaseolus vulgaris*. Campinas: IB/UNICAMP, 1999. 91p. Tese, Doutorado.

MACHADO, A.T. Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência no uso do nitrogênio. Rio de Janeiro: IB/UFRJ, 1997. 219p. Tese, Doutorado.

MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. **Science**, v.145, p.279-280, 1964.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In: BOULTER, D.; PARTHIER, B. (Ed.) **Encyclopedia of plant physiology new series**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v.14A, p.1-64.

MIRON, D.; BEN-YAACOV, S.; RECHES, D.; SCHUPPER, A.; GALILI, G. Purification and characterization of bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase from developing soybean seeds. **Plant Physiology**, v.123, p.655-663, 2000.

MOLINA, S.M.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina em sementes. **Scientia Agricola**, v.58, p.205-211, 2001.

MORO, G.L.; HABBEN, J.E., HAMAKER, B.R.; LARKINS, B.A. Characterization of the variability in lysine content for normal and *opaque-2* maize endosperm. **Crop Science**, v.36, p.1651-1659, 1996.

MUNCK, L. The case of high-lysine barley breeding. In: SHEWRY, P.R. (Ed.) **Barley**: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Wallingford: CAB International, 1992. p.573-601.

OSUJI, G.O.; REYES, J.C.; MANGAROO, A.S.; Glutamate dehydrogenase isomerization: A simple method for diagnosing nitrogen, phosphorus, and potassium sufficiency in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2395-2401, 1998.

PAEZ, A.V.; USSARY, J.P.; HELM, J.L.; ZUBER, M.S. Survey of maize strains for lysine content. **Agronomy Journal**, v.61, p.896-899, 1969.

PATTE, J.C.; LE-BRAS, G.; COHEN, G.N. Regulation by methionine of the synthesis of a thrid aspartate kinase and a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K12. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.136, p.245-257, 1967.

RAUN, W.R.; JOHNSON, G.V. Improving nitrogen efficiency for cereal production. **Agronomy Journal**, v.91, p.357-363, 1999.

RHODES, D.; HANDA, S.; BRESSAN, R.A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. **Plant Physiology**, v.82, p.890-903, 1986.

SANTOS, M.X.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; FRANÇA, G.E.; PARENTONI, S.N.; GOMES E GAMA, E.E.; LOPES, M.A. Melhoramento intrapopulacional no Sintético Elite NT para solos pobres em nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.55-61, 1998.

SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, v.2, p.203-209, 1992a.

SHAUL, O.; GALILI, G. Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, v.100, p.1157-1163, 1992b.

SODEK, L.; WILSON, C.M. Incorporation of leucine C^{14} into protein in the developing of normal and opaque-2 corn. **Archives of Biochemistry et Biophysics**, v.140, p.29-38, 1970.

SOMERVILLE, C.R.; OGREN, W.L. A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. **Nature**, v.280, p.833-836, 1979.

UMBARGER, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.47, p.533-606, 1978.

VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.) **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.79-120.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. **Phytochemistry**, v.20, p.2651-2655, 1981.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGERBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C_3 plants. **EMBO Journal**, v.16, p.4808-4816, 1997.

WILSON, B.J.; GRAY, A.C.; MATTHEWS, B.F. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. **Plant Physiology**, v.97, p.1323-1328, 1991.

ZAHARAH, A.R.; BAH, A.R.; MWANGE, N.K.; KATHULI, P.; JUMA, P. Management of gliricidia (Gliricidia sepium) residues for improved sweet corn yield in an ultisol. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.54, p.31-39, 1999.

ZUBER, M.S.; SKRDLA, W.H.; CHLOE, B. Survey of maize selections for endosperm lysine content. **Crop Science**, v.15, p.93-94, 1975.

27

CITOGENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO

MARIA SUELY PAGLIARINI

Depto. de Biologia Celular e Genética, UEM, Av. Colombo, 5790 - CEP: 87020-900 - Maringá, PR.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de alimentos cria, continuamente, uma necessidade de se aproveitar melhor as características herdáveis disponíveis nas plantas nos programas de melhoramento. Muitos métodos e técnicas têm sido empregados para se alcançar os objetivos desejados. O melhoramento de plantas teve, no século XX, um papel marcante no aumento de produtividade e melhoria de caracteres relacionados à qualidade de muitas espécies cultivadas.

A citogenética, ramo da ciência que superpõe os conhecimentos da citologia e da genética, estudando os cromossomos em seus mais diferentes aspectos, tem contribuído muito para o melhoramento de plantas cultivadas. Segundo Sybenga (1992) a citogenética pode ser aplicada em diferentes fases do melhoramento e de diferentes formas. O melhoramento, visto como uma atividade de manipulação de genótipos, requer técnicas e informação e a citogenética fornece ambos. A informação pode ser de natureza geral, válida para qualquer tipo de material ou para qualquer aplicação, ou específica, relacionada a um material ou a um problema a ser resolvido. Esta informação pode estar relacionada simplesmente à estrutura e número de cromossomos, ou ainda, ao comportamento dos cromossomos durante a transmissão somática ou generativa. Na manipulação genética, por exemplo, técnicas especiais de citogenética podem ser necessárias. Nestes casos, é necessário distinguir entre manipulação do genótipo, ou seja, a constituição específica dos genomas sob análise, e manipulação da transmissão genética ou sistema reprodutivo. A manipulação do genótipo pode envolver a introdução ou a substituição de genes específicos, ou a manipulação do efeito de dose. A manipulação do sistema de transmissão pode envolver, por exemplo, a introdução de limites para a segregação livre usada na fixação da heterozigosidade. A Tabela 1, proposta por Sybenga (1992), apresenta uma revisão das fases de um programa de melhoramento onde a informação e a manipulação citogenética são interessantes.

No decorrer deste capítulo, serão apresentados e discutidos suscintamente diversos exemplos sobre a importância e utilização da citogenética como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento. Serão abordados, por exemplo, o papel das variações numéricas e estruturais de cromossomos, a importância da adição, substituição e eliminação de cromossomos, a formação de gametas 2n, a ocorrência de mutantes meióticos que causam macho-esterilidade, a instabilidade na divisão celular, entre outros eventos citogenéticos relevantes ao melhoramento de plantas. Obviamente, a citogenética pode dar uma contribuição muito maior aos programas de melhoramento que as aqui apresentadas.

2. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS

Os cromossomos de uma espécie podem apresentar variações no seu tamanho, posição de centromêro, quantidade de DNA, quantidade de heterocromatina ou

TABELA 1. Fases de um programa de melhoramento de plantas e tipos de informação ou manipulação citogenética que podem ser usadas, segundo Sybenga (1992).

I	II	III	IV
a) Formulação de objetivos	a) Coleta de material (*)	a) Seleção	a) Propagação / Manipulação(**)
b) Escolha de metodologia para construção do genótipo e sistema reprodutivo (*)	b) Testes e pré-seleção do material (**)	b) Testes (**)	
c) Planejamento do programa de melhoramento (*)	c) Indução de variabilidade genética adicional (mutação, transformação etc.) (**, ***)		
	d) Construção de um sistema reprodutivo especial (**, ***)		
	e) Combinação (hibridação, etc) e recombinação (**, ***)		

* Informação da literatura; ** Informação a ser coletada; *** Manipulação.

número e posição relativa de bandas. Estas variações resultam de rearranjos estruturais, os quais ocorrem praticamente em todas as espécies em que foi possível uma análise citogenética detalhada. Tais rearranjos são reconhecidos citologicamente quando afetam a morfologia cromossômica ou mudam a posição de outros marcadores cromossômicos.

As alterações cromossômicas estruturais são, em geral, melhor toleradas pelo organismo que as numéricas. Segundo Guerra (1988) aberrações cromossômicas aparecem em 50% dos abortos na espécie humana, sendo que destes, aproximadamente 3% são do tipo estrutural. Por outro lado, em crianças nativivas, cerca de 0,6% são portadoras de aberrações cromossômicas, das quais 40%, aproximadamente, apresentam alterações estruturais. Isso indica que os rearranjos estruturais nem sempre inviabilizam o portador e, que somente em alguns casos, podem levar à morte nos primeiros meses de desenvolvimento. Embora em plantas não hajam estudos tão detalhados quanto na espécie humana, existem muitos exemplos na literatura descrevendo rearranjos cromossômicos e seus efeitos. Nesta seção serão discutidos alguns rearranjos cromossômicos que podem apresentar utilidade no melhoramento de plantas.

2.1 DEFICIÊNCIAS

As deficiências caracterizam-se pela ausência de um segmento cromossômico de qualquer tamanho, cuja quebra pode ocorrer espontaneamente ou resultar de tratamentos mutagênicos. Quando a deficiência envolve um segmento terminal é denominada, preferencialmente, como deleção. Quando as deficiências são heterozigotas e envolvem grandes segmentos, podem ser facilmente reconhecidas em cromossomos somáticos ou através do pareamento meiótico pela formação de uma alça no paquíteno ou de um bivalente heteromórfico. Como as deficiências de segmentos geneticamente importantes são geralmente inviáveis em diplóides, existem poucas razões para serem usadas em programas de melhoramento. Quando as deficiências encontram-se no estado heterozigoto, segregam na meiose e os gametas portadores da deficiência perdem em competitividade com os gametas normais.

2.2 DUPLICAÇÕES

Consistem na repetição anormal de um segmento cromossômico qualquer. Podem surgir espontaneamente ou através de tratamento com mutagênicos. O segmento duplicado pode estar no mesmo cromossomo; neste caso, no mesmo braço ou em outro braço cromossômico ou, ainda, em outro cromossomo. A orientação do segmento duplicado, se normal ou invertido, tem efeito sobre o funcionamento meiótico. Duplicações intersticiais heterozigotas podem ser também identificadas na meiose pela formação de alças no paquíteno. Assim como as deficiências, as duplicações dificultam a ocorrência de permuta genética no segmento duplicado.

Ao contrário das deficiências, existem diferentes razões para o melhorista de plantas se interessar pelas duplicações. Pequenas duplicações raramente apresentam efeito fenotípico facilmente reconhecível. Quando envolvem um gene com um pronunciado efeito de dose, o efeito fenotípico será de uma mutação dominante. Todavia, estudos de efeitos de dose em plantas diplóides são raros. No melhoramento, existe um grande interesse em se duplicar segmentos cromossômicos específicos que carregam genes comercialmente importantes com claro efeito de dose e, segundo Sybenga (1992), programas especiais para induzir estas duplicações têm sido desenvolvidos.

Um tipo diferente de duplicação que também é bastante usado no melhoramento de plantas é a transferência induzida de um segmento cromossômico carregando um gene desejado de outra espécie. Este assunto será melhor abordado em outro item deste capítulo.

2.3 INVERSÕES

Como o próprio nome indica, são rearranjos em que um segmento dentro de um cromossomo é invertido. Podem ser pericêntricas, quando envolvem o centrômero, e paracêntricas, quando envolvem somente um braço cromossômico. Enquanto as inversões paracêntricas não mudam a morfologia do cromossomo, as pericêntricas podem alterar a razão de braços quando o centromêro não está no meio do segmento invertido.

As inversões têm um efeito negativo no melhoramento de plantas. Quando estão em condição heterozigota, a fertilidade é reduzida. A redução de fertilidade em plantas portadoras de inversões é uma conseqüência da formação de cromátides deficientes e/ou duplicadas. Em heterozigotos para inversões paracêntricas, a ocorrência de permuta genética na região invertida leva à formação de pontes que se rompem na anáfase e resultam em cromátides deficientes e fragmentos acêntricos que se perdem, enquanto em inversões heterozigotas pericênticas as deficiências são sempre acompanhadas por duplicações.

2.4 TRANSLOCAÇÕES

Caracterizam-se pela transferência de um segmento cromossômico de sua posição original para outro cromossomo do complemento. A translocação pode ser simples ou recíproca. Na translocação recíproca, dois cromossomos trocam segmentos entre si. Estes segmentos, de qualquer tamanho, podem ser terminais ou intersticiais. Qualquer que seja o tipo de translocação, não há perda nem ganho de material

genético para a planta em que a translocação se originou, ocorre apenas uma redistribuição de material genético entre os cromossomos. Entretanto, após a separação dos homólogos na meiose, metade dos gametas serão não-balanceados, contendo duplicações e deficiências que os inviabilizam e, para a outra metade, 25% dos gametas conterão o mesmo rearranjo translocado do genitor e 25% serão normais. O mecanismo de origem de tais gametas pode ser encontrado em Guerra (1988) ou Sybenga (1992).

2.4.1 TRANSLOCAÇÕES TERMINAIS SIMPLES

Consistem na transposição de dois segmentos terminais entre dois cromossosmos não homólogos. De acordo com Sybenga (1992), se um dos segmentos transpostos for muito pequeno, poderá ser negligenciado e, então, na prática, a translocação será considerada uma translocação terminal simples e será difícil distingui-la.

Este tipo de translocação consiste no rearranjo cromossômico mais comum entre as plantas. Pode ter origem espontânea ou ser induzido por mutagênicos. Diferentes espécies, e até cultivares dentro de espécies, podem diferir em uma ou mais translocações e aparecer em heterozigose em seus híbridos. Muitas vezes as translocações são levadas para novas variedades inconscientemente durante programas de melhoramento. Quando ocorrem em cromossomos que carregam um gene específico que deve ser transferido de uma cultivar para outra, o nível de recombinação promovido por permuta genética em segmentos específicos é reduzido no heterozigoto, podendo chegar a zero. Além de reduzida, a recombinação é, ainda, afetada de outra forma, pois as relações de ligação são alteradas e todos os genes dos dois cromossomos envolvidos estão ligados no heterozigoto. Nestes casos, a fertilidade geralmente é reduzida. Os homozigotos tendem a ser normais, mas podem, ocasionalmente, mostrar leves irregularidades em seus fenótipos e reprodução.

As translocações são usadas para se transferir segmentos cromossômicos que contêm genes de interesse de uma espécie para outra. Todavia, para estes casos, as translocações intersticiais são mais interessantes. Translocações heterozigotas podem ser usadas para se fazer duplicações específicas e são também consideradas como uma fonte de aneuploidia, incluindo trissômicos terciários e compensados, os quais podem ser usados no desenvolvimento de trissômicos balanceados em programas de obtenção de híbridos. As conseqüências mais importantes do comportamento meiótico das translocações heterozigotas resultam da orientação em metáfase I e da subseqüente segregação da configuração em anáfase I. Detalhes sobre as características, identificação e comportamento meiótico das translocações terminais podem ser encontrados em Sybenga (1992).

2.4.2 TRANSLOCAÇÕES INTERSTICIAIS SIMPLES

Consistem na transferência de um segmento cromossômico para uma posição intersticial de outro cromossomo. A orientação do segmento com relação ao centrômero do cromossomo para o qual ele foi transferido pode ser a mesma, como em sua posição original (simétrica) ou reversa (assimétrica). Esta orientação tem conseqüências no pareamento meiótico, orientação e segregação dos cromossomos. Enquanto uma translocação terminal recíproca envolve duas quebras, a translocação

intersticial envolve três lesões, e por isso são menos freqüentes. Têm sido induzidas por irradiação e outros agentes mutagênicos com o objetivo claro de transferir segmentos específicos de um cromossomo para outro.

2.4.3 COMPLEXO DE TRANSLOCAÇÕES HETEROZIGOTAS

No heterozigoto para uma translocação recíproca, dois pares de cromossomos terão um homólogo translocado e outro normal. É possível que um desses homólogos normais sofra uma translocação com outro cromossomo do conjunto, levando à formação de um anel de seis cromossomos. Este processo pode continuar até envolver todos os cromossomos do conjunto diplóide, que em heterozigose formarão um único anel de translocação contendo todos os cromossomos. Neste caso, diz-se que o organismo apresenta um complexo de translocações. Estes complexos têm sido observados regularmente em algumas espécies, entre elas uma planta da família Commelinaceae (*Rhoeo spathacea)* que apresenta 2n=12 e, na meiose, forma freqüentemente um único anel de 12 cromossomos. Na metáfase I, este anel assume a forma de um círculo retorcido que permite a orientação alternada de todos os cromossomos envolvidos no anel. Neste tipo de rearranjo cromossômico, os cromossomos translocados segregam juntos como se fosse um único grupo de ligação, não existindo mais recombinação por separação ao acaso de homólogos.

Em *Oenothera lamarckiana* (Onagraceae), uma outra espécie de planta que apresenta todos os seus cromossomos translocados em um único anel de 14, observa-se que podem existir vários complexos de translocações diferentes. Por exemplo, em alguns indivíduos, o par 1 tem translocações com os pares 3 e 6, o par 2 com os pares 4 e 7, o par 3 com os pares 1 e 5, e assim por diante. Em outros indivíduos, o par 1 encontra-se translocado com os pares 4 e 6, o par 2 com os pares 5 e 7 etc. Cada combinação constitui um complexo de translocação diferente. Teoricamente, os sete pares de cromossomos podem formar 91 combinações ou complexos diferentes, e quase todas já foram encontradas na natureza. Como em cada complexo o tamanho dos segmentos translocados é variável, se indivíduos que apresentam complexos diferentes forem cruzados apresentarão duplicações e deleções para vários segmentos cromossômicos. No caso de *Oenothera lamarckiana*, como a reprodução é por autofecundação, os diferentes complexos são mantidos, não havendo redução da fertilidade da população.

Em complexos de translocações é comum encontrar-se inversões que contribuem para dimunuir a freqüência de recombinação gênica na espécie. Somando-se a isto, os complexos de translocações têm tendência a apresentar quiasmas apenas terminais, sugerindo que nas regiões proximais de cada cromossomo acumulam-se mutações diferentes. Isso faz com que cada complexo evolua diferentemente um do outro e, se forem cruzados com outros complexos, poderão gerar uma grande quantidade de variabilidade genética.

Como os complexos de translocações conservam a heterozigosidade na população, tentativas têm sido feitas para se criar translocados artificiais, ou seja, translocados heterozigotos completos e permanentes, em espécies cultivadas. Todavia, complexos de translocações permanentes envolvendo todos os cromossomos, como nos gêneros *Oenothera* e *Rhoeo,* são exceções. Na maioria dos casos conhecidos, a

translocação heterozigota envolve apenas um pequeno número de cromossomos. A construção artificial de translocados heterozigotos completos e permanentes, além de difícil, provoca redução de fertilidade, sendo inviável para cereais. Apesar de inúmeras tentativas (para revisão, veja Sybenga, 1992), por muitas razões, as construções artificiais de tais complexos não apresentaram ainda o resultado desejado. Muitos fatores envolvidos na estabilização dos cromossomos podem desempenhar um papel importante no estabelecimento da heterozigosidade permanente. Espécies que mostram tendência hereditária para orientação alternada e quiasmas terminais são as melhores candidatas ao sucesso. Segundo Sybenga (1992), as translocações podem ser introduzidas uma a uma, em seqüência, na mesma cultivar. Em cada estágio intermediário, o comportamento meiótico e a fertilidade do heterozigoto devem ser testados. Na construção deste complexo, genótipos podem ser selecionados para se obter as melhores combinações.

2.4.4 FUSÃO E FISSÃO CÊNTRICAS

Embora menos freqüentes que em animais, as fusões e as fissões cêntricas não são negligenciáveis em plantas. Esses rearranjos levam a um aumento ou redução no número de cromossomos sem que haja variação na quantidade de DNA. Guerra (1988) apresenta um exemplo deste tipo de rearranjo na família Podocarpaceae, onde o número de cromossomos 2n varia entre 18 e 38, enquanto que o número de braços cromossômicos para a maioria das espécies é igual a 40.

As fusões e fissões cêntricas tiveram um papel importante na especiação de diversos taxa (Stebbins, 1971), enquanto que para o melhoramento não têm muito interesse. Fusões e fissões cêntricas heterozigotas causam, algumas vezes, uma leve redução na recombinação, podendo deixar algumas regiões pericentroméricas livres de recombinação. Em outros casos, a fissão cêntrica causa aumento na formação de quiasmas, aparentemente por reduzir o efeito de interferência. Enfim, as fusões e fissões cêntricas, segundo Sybenga (1992), podem alterar a recombinação entre homólogos e isto pode ser usado para manter (fusão) ou separar (fissão) blocos gênicos específicos.

2.4.5 ISOCROMOSSOMOS

São cromossomos metacêntricos que apresentam os dois braços exatamente iguais, tanto na morfologia quanto no conteúdo gênico. São, portanto, equivalentes a grandes duplicações. Surgem a partir de fusões cêntricas entre homólogos telocêntricos, translocações recíprocas entre dois homólogos com ponto de troca exatamente na região centromérica, ou quebra do centrômero em um cromossomo com duas cromátides irmãs, seguida de rotação das duas cromátides de um braço. Neste último caso, se as cromátides do outro braço cromossômico forem perdidas, o genoma passará a ser portador de uma duplicação combinada com uma grande deficiência.

3. VARIAÇÕES NUMÉRICAS

Variações cariotípicas, revelando que os cariótipos não são estruturas rigidamente estáveis, têm sido observadas na maioria das espécies animais e vegetais

onde análises citogenéticas detalhadas puderam ser realizadas. Essas variações, que podem ser numéricas ou estruturais, desempenham um papel importante na evolução das espécies. As variações numéricas consistem em alterações no número diplóide de cromossomos, podendo envolver apenas alguns ou todos os cromossomos do genoma.

3.1 ANEUPLOIDIAS

Consistem em alterações do cariótipo onde há perda ou ganho de um ou poucos cromossomos. Indivíduos aneuplóides surgem a partir de gametas com um número irregular de cromossomos. Esses gametas se formam geralmente durante a meiose I, quando os cromossomos homólogos do bivalente não segregam corretamente, resultando em núcleos telofásicos com um número desigual de cromossomos. A separação irregular de homólogos deve-se, geralmente, a falhas na sinapse, na formação de quiasmas, ou ainda, na terminalização de quiasmas. Qualquer que seja a causa, os cromossomos univalentes formados não se orientarão devidamente na anafáse I, segregando precoce e/ou irregularmente. A formação de gametas aneuplóides pode-se dar, ainda, pela ocorrência de atraso na migração das cromátides para os pólos na anáfase I ou II. A cromátide retardatária poderá ser excluída, formando micronúcleos. A Figura 1 ilustra algumas dessas situações.

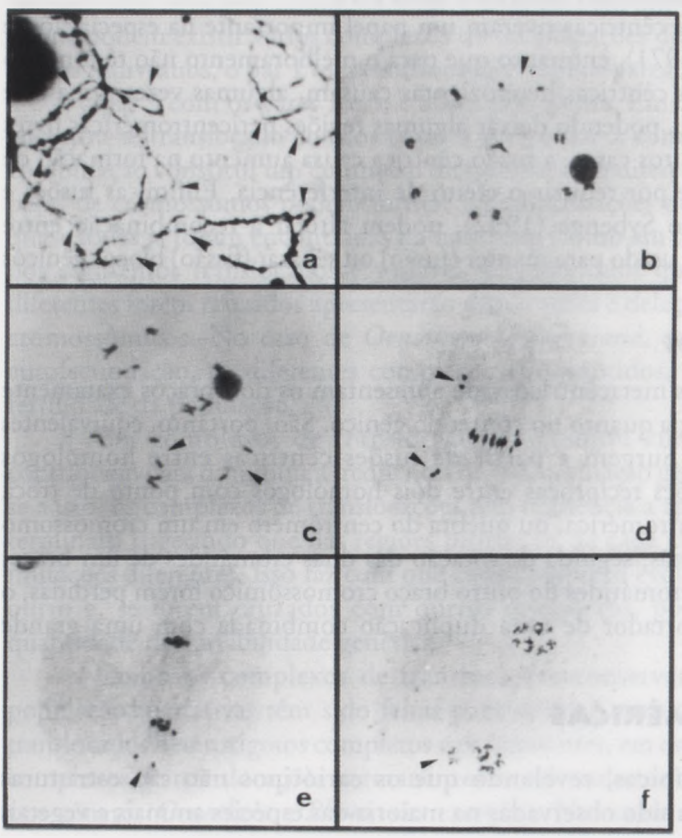


FIGURA 1. Origem de gametas aneuplóides em milho. a) Microsporócito em paquíteno mostrando assinapse parcial. b) Diacinese com um par de cromossomos univalentes. c) Diacinese com dois pares de cromossomos univalentes. Observe que a maioria dos bivalentes apresentam quiasmas terminais. d) Metáfase I com dois pares de univalentes em ascensão precoce. e) Anáfase I com dois cromossomos univalentes em ascensão precoce no mesmo pólo. Se os univalentes forem incluídos no mesmo núcleo telofásico, este núcleo será n + 1 (11 cromossomos) e o outro será n - 1 (9 cromossomos). f) Telófase I com um micronúcleo. (Fotos da autora)

3.1.1 NULISSOMIA

Caracteriza-se pela ausência de um par de homólogos no indivíduo diplóide (2n-2). São raros na natureza, pois a viabilidade do indivíduo nulissômico dependerá do conteúdo genético perdido. Nulissômicos têm sido isolados sem muita dificuldade em alopoliplóides naturais, como trigo e aveia. Nestes casos, a presença dos três genomas constituintes da espécie garante a sobrevivência do indivíduo mesmo na ausência de um par de cromossomos. A maioria dos nulissômicos de trigo e aveia pode ser facilmente distinguida de plantas monossômicas e dissômicas por características da plântula, planta adulta e espiguetas. Khush (1973) apresenta uma boa revisão sobre estas características. Considerando o complemento cromossômico de trigo, a maioria dos nulissômicos são estéreis. O restante, mediante autofecundação, pode ser mantido como linhas nulissômicas e, desses, somente oito são razoavelmente estáveis apesar das plantas serem aberrantes. Para aveia existem menos estudos sobre os efeitos da nulissomia que em trigo.

Do cruzamento entre uma planta nulissômica com uma planta normal, espera-se uma progênie monossômica. Todavia, a freqüência de monossômicos é sempre muito inferior à esperada. As causas desta discrepância será discutida em monossômicos.

3.1.2 MONOSSOMIA

Consiste na perda de um cromossomo do indivíduo diplóide. A perda de dois cromossomos não homólogos caracteriza uma monossomia dupla. Por razões de sobrevivência e transmissão, a monossomia é rara em espécies diplóides. A sobrevivência do indivíduo dependerá do conteúdo genético do cromossomo perdido. Algumas espécies diplóides com altos níveis de duplicações resultantes de ancestrais poliplóides, toleram muito bem a monossomia. Khush (1973) apresenta uma lista de monossomias em espécies diplóides. Na maioria das espécies, os monossômicos são fracos e pouco viáveis, entretanto, em milho e tomate, são suficientemente vigorosos para florescer e se reproduzir.

Segundo revisão feita por Weber (1983), a origem de monossômicos em diplóides pode ser diversa, mas raramente somática. O uso de radiação ou tratamento com colchicina em plantas em crescimento pode levar a distúrbios no fuso e resultar em progênies aneuplóides. A origem mais comum de aneuplóides é através de anomalias na primeira ou segunda divisão meiótica (vide Figura 1). Em alopoliplóides, os monossômicos ocorrem espontaneamente em baixa freqüência. Em populações naturais de trigo, por exemplo, 1% das plantas são monossômicas (Sybenga, 1992). Os monossômicos de trigo são, geralmente, oriundos da variedade Chinese Spring e transferidos para outras variedades por retrocruzamento.

Monossômicos em diplóides são de considerável interesse em programas de melhoramento, pois permitem localizar genes em cromossomos. A combinação da monossomia com um gene recessivo no cromossomo remanescente resulta na expressão hemizigota de tal gene. Contrariamente, quando a localização do gene é conhecida, ela facilita a identificação do cromossomo envolvido. Todavia, geralmente programas envolvendo cruzamento-teste com estoques portadores de marcas genéticas ou cromossômicas conhecidas podem ser necessários para identificar o cromossomo

ausente. Maiores detalhes sobre a forma de utilização de monossômicos em programas de melhoramento podem ser encontrados em Khush (1973) e Weber (1983).

Segundo Sybenga (1992) a monossomia é muito comum em alopoliplóides e também tem muito mais interesse prático. É usada para localizar genes em cromossomos, como em diplóides, mas com mais possibilidades. É usada também como um importante passo intermediário em diferentes formas de manipulação genética, principalmente para transferir genes específicos, ou para formas especiais de análise genética quantitativa. Em variedades semi-anãs de trigo que carregam o gene Rht_2, cuja expressão é dose-dependente, a monossomia para o cromossomo 4D causa anomalias que tornam algumas variedades inaceitáveis.

Em alotetraplóides, o efeito da perda de um cromossomo é mais pronunciado que para outros níveis elevados de ploidia, podendo ser comparado com um diplóide. Em *Nicotiana tabacum* (2n=4x=48) nem todos os tipos cromossômicos foram descritos e, quando ocorrem, são morfologicamente mais distintos que em trigo. Em algodão a situação é semelhante, enquanto em aveia o comportamento dos monossômicos assemelha-se ao de trigo (Sybenga, 1992). O uso das diferentes formas de aneuploidia em trigo é tão grande que na Europa criou-se uma cooperativa (*The European Wheat Aneuploid Cooperative* - EWAC), a qual congrega melhoristas e citogeneticistas desta cultura com o objetivo de coordenar os programas de melhoramento.

Teoricamente, espera-se que um indivíduo 2n - 1 produza gametas n e n - 1 em igual freqüência. Da mesma forma, espera-se que a progênie de cruzamentos (2n - 1) x 2n e 2n x (2n - 1) seja constituída pela mesma freqüência de indivíduos 2n e 2n - 1. Todavia, isto não acontece. A taxa de transmissão de monossomia é sempre maior do lado feminino. Segundo Khush (1973) as causas da variação podem ser atribuídas a diferentes fatores: a) produção de gametas n e n - 1 em freqüências desiguais, ocasionada pela perda do cromossomo univalente na meiose; b) viabilidade reduzida ou inviabilidade completa do gameta n - 1; c) diferentes habilidades competitivas entre grãos de pólen n e n - 1, sendo os normais (n) mais efetivos na fertilização; d) viabilidade reduzida do zigoto 2n - 1.

3.1.3 TRISSOMIA

3.1.3.1 TRISSOMIA PRIMÁRIA

Consiste no acréscimo de um cromossomo no indivíduo diplóide ou alotetraplóide, ou seja, um determinado cromossomo está em dose tripla, enquanto em autotetraplóides, a trissomia implica na perda de um cromossomo, isto é, somente três cromossomos de um tipo estão presentes, ao invés de quatro. Originam-se, principalmente, a partir de mutantes assinápticos ou dessinápticos parciais ou de triplóides. Em diplóides, a dessinapse por causar segregação irregular de homólogos, leva à produção simultânea de gametas trissômicos e monossômicos (vide Figura 1). Os autotriplóides, se férteis, produzem uma alta freqüência de trissômicos primários e, por isso, são utilizados para isolar duplos trissômicos em progênies. A fertilidade neste tipo de trissomia não é grandemente afetada, exceto se o cromossomo envolvido na trissomia apresentar um alto efeito negativo de dose.

Os trissômicos primários são utilizados em análise genética para localizar genes em cromossomos. São também usados como fonte de trissômicos secundários, tais como, telocêntricos e isocromossomos, que também são usados para localizar genes.

3.1.3.2 TRISSOMIA SECUNDÁRIA OU TELOCÊNTRICA

Consiste no acréscimo de um isocromossomo ou de um cromossomo telocêntrico, respectivamente, ao complemento dissômico normal. Em princípio, o isocromossomo e o telocêntrico podem ser formados por cada um dos braços cromossômicos. Originam-se, preferencialmente, na meiose de monossômicos e trissômicos por quebras na região do centrômero.

Estes tipos de trissômicos também são utilizados para localização gênica, porém são mais específicos que os trissômicos primários, pois identificam o braço cromossômico envolvido. Trissômicos telocêntricos têm sido usados em algumas construções cromossômicas para modificar o sistema genético da planta, porém com potencial limitado (Sybenga, 1992). A segregação gênica em trissômicos secundários e telocêntricos não segue as mesmas regras dos trissômicos primários, pois um isocromossomo ou um telocêntrico não é equivalente a um cromossomo com dois braços com genes distintos. Em princípio, a herança é dissômica, porém, com duas complicações: a) quando o cromossomo extra tem um alelo dominante e ambos os cromossomos normais têm um alelo recessivo, as plantas com o cromossomo extra na progênie de um cruzamento-teste ou autofecundadas terão um fenótipo dominante, e aquelas sem o cromossomo extra terão um fenótipo recessivo. Isto pode ser usado para localizar genes em braços cromossômicos específicos; b) pode ocorrer recombinação entre um determinado gene e o centrômero, transferindo o alelo do cromossomo extra para o cromossomo normal e vice-versa.

3.1.3.3 TRISSOMIA TERCIÁRIA

Neste tipo de trissomia, o cromossomo translocado é o cromossomo extra. Assim, para cada translocação, dois trissômicos terciários são possíveis. São originados quase que exclusivamente a partir de segregação não alternada de um complexo de translocação na anáfase I. Estes tipos de trissômicos são usados para localizar genes em segmentos específicos do cromossomo, ou para construir sistemas para a manutenção de linhas macho-estéreis em variedades híbridas, todavia, de acordo com Sybenga (1992), não têm sido extensivamente estudados.

3.1.3.4 TRISSÔMICOS COMPENSADOS

Neste tipo de trissomia, um cromossomo normal é substituído por dois cromossomos estruturalmente alterados, onde nenhum deles carrega o material genético completo do cromossomo que ele substitui, mas juntos, eles contêm toda a informação genética (Khush, 1973). Existem dois tipos de trissômicos compensados: a) o par compensado consiste de duas translocações cromossômicas de diferentes origens; b) o par translocado consiste de uma translocação e de um telocêntrico. Devido ao seu complicado comportamento meiótico, têm sido pouco usados em programas de melhoramento.

3.1.3.5 TRANSMISSÃO DO CROMOSSOMO EXTRA EM TRISSÔMICOS

Teoricamente, espera-se que um indivíduo 2n + 1 produza gametas n e n + 1 em igual freqüência no genitor masculino e feminino. Similarmente, deveriam produzir descendentes 2n e 2n + 1 em igual freqüência a partir de cruzamentos (2n + 1) x 2n e 2n x (2n + 1). Adicionalmente, indivíduos 2n + 1 quando autofecundados deveriam produzir progênies 2n, 2n + 1 e 2n + 2 na razão 1:2:1. Todavia, a percentagem de indivíduos 2n + 1 na progênie de um cruzamento (2n +1) x 2n é consideravelmente baixa, ou seja, menor que os 50% esperados, enquanto que na progênie de cruzamentos 2n x (2n + 1), às vezes nenhum indivíduo 2n + 1 é encontrado. Khush (1973) apresenta uma tabela com dados compilados da literatura, analisando a progênie de trissômicos em tabaco, cevada e centeio. Para as três espécies, a transmissão da trissomia é maior quando o genitor trissômico é a fêmea.

A redução no número de indivíduos 2n + 1 para menos que os 50% esperados quando o genitor feminino é trissômico tem sido atribuída a várias causas , como: a) eliminação do cromossomo extra durante a meiose; b) substituição do megásporo chalazal portador da trissomia (n + 1) por um megásporo normal (n); c) baixa viabilidade de esporos e gametas n + 1; d) desenvolvimento subnormal de zigotos e embriões 2n + 1; e) baixo poder de germinação de sementes 2n + 1; f) baixo vigor de plântulas 2n + 1; g) efeito do *background* genético.

A transmissão do cromossomo extra através do macho, quando há, é extremamente menor que através da fêmea. Todos os fatores que reduzem a transmissão do cromossomo extra através da fêmea, presumivelmente desempenham papel similar no macho. Todavia, as razões para a taxa de transmissão diferencial entre macho e fêmea podem ser explicadas com base no desenvolvimento dos gametófitos masculino e feminino. O gametófito feminino tolera mais desbalanço genético e cromossômico, bem como vários tipos de estresses ambientais que o gametófito masculino. A principal causa da transmissão diferencial do cromossomo extra em machos e fêmeas parece residir na habilidade de competição entre grãos de pólen n e n + 1 no momento da fertilização. A habilidade diferencial de competição de grãos de pólen n + 1 contra grãos de pólen n pode se manifestar em diferentes estágios: a) grãos de pólen n + 1 podem completar seu desenvolvimento após os grãos de pólen normais; b) grãos de pólen n + 1 podem produzir tubos polínicos curtos ou defectivos para concretizar a fertilização; c) grãos de pólen n + 1 podem não germinar.

3.2. EUPLOIDIAS

A presença de um conjunto haplóide completo ou de múltiplos inteiros desse conjunto é denominada euploidia. Acima do nível diplóide, a euploidia é denominada poliploidia. A poliploidia é o tipo de variação cromossômica dominante nos vegetais, tendo contribuído amplamente na evolução de muitas famílias. Apresenta, ainda, um papel fundamental no melhoramento de plantas.

3.2.1 HAPLOIDIA

Existe uma certa confusão à respeito do termo haploidia. Segundo Sybenga (1992), o termo haplóide é usado: a) para designar o número de cromossomos do gameta (fase haplôntica); b) para designar o número de cromossomos de um único

genoma em diplóides, ou de um conjunto combinado de cromossomos segregando juntos em alopoliplóides. Em diplóides e alopoliplóides, os dois significados coincidem, enquanto para autopoliplóides não. Em autopoliplóides o número gamético de cromossomos é metade do número poliplóide e, conseqüentemente, múltiplo do número básico do genoma. Por esta razão, o número básico de cromossomos é referido como monohaplóide ou monoplóide. Em alopoliplóides o número gamético de cromossomos é referido como dihaplóide, trihaplóide etc., em geral: polihaplóide.

A origem dos haplóides pode ser diversa. Podem resultar de desenvolvimento partenogenético espontâneo ou induzido de gametas femininos normalmente reduzidos, mas não fertilizados, ou de gametas ou gametófitos masculinos. Raramente resultam de redução somática. Como a freqüência de haplóides naturais é extremamente baixa, algumas técnicas têm sido empregadas para se produzir plantas com número gamético de cromossomos visando sua aplicação em programas de melhoramento.

A haploidização pode ser feita através de redução somática com base em separação de genoma ou eliminação de cromossomos. Separação espontânea de genomas em tecidos somáticos de plantas diplóides normais tem sido observada em algumas espécies, porém são mais freqüentes em poliplóides (veja Sybenga, 1992). A reversão de poliplóides à diploidia ocorre geralmente nas mitoses pré-meióticas, onde os genomas se separam e cada um forma um fuso, resultando em uma tétrade primitiva atípica. Algumas substâncias químicas induzem ou aumentam a separação de genomas. A separação de genomas pode ser feita também *in vitro,* com utilização de colchicina. Em algumas espécies, a forma mais freqüente e usada para se obter haplóides é através da eliminação de cromossomos ou de genomas inteiros em híbridos obtidos sexualmente, logo após a fertilização, ou seja, no embrião em desenvolvimento. Em espécies de cevada, por exemplo, toda vez que *Hordeum bulbosum* participa de cruzamentos interespecíficos, seus cromossomos são eliminados. A técnica mais empregada atualmente para a obtenção de haplóides é, sem dúvida, a cultura de anteras, que utiliza grãos de pólen jovens, isto é, ainda uninucleados. Nesta técnica, os grãos de pólen são colocados em meio de cultura e induzidos a se multiplicarem mitoticamente, dando origem a uma massa de células denominada calo, a qual, sob a ação de hormônios, sofre diferenciação e forma uma planta haplóide. Esta planta pode ser diploidizada. Esta técnica tem sido aplicada em várias espécies de interesse agrícola, pois os esporófitos diplóides obtidos são homozigotos para todos os locos, o que dificilmente se consegue pelos métodos convecionais de melhoramento em curto período de tempo. Maiores detalhes desta técnica serão apresentados em outros capítulos.

Fenotipicamente, os haplóides tendem a apresentar uma estatura reduzida e geralmente são estéreis. A esterildade é causada pela instabilidade meiótica que apresentam. Como apresentam somente um genoma, não há pareamento e formação de quiasmas para garantir a segregação cromossômica. Assim, todos os univalentes podem migrar para um pólo, formando dois micrósporos normais n. Isto, entretanto, é raro. O mais freqüente é a migração ao acaso de cromossomos para os pólos, formando quatro micrósporos desbalanceados.

3.2.2 POLIPLOIDIA

De acordo com sua origem, três tipos de poliplóides podem ser distinguidos: a) Autopoliplóides, onde o mesmo genoma básico está presente mais que duas vezes. Um autotetraplóide com quatro genomas homólogos é representado pela fórmula AAAA; b) Alopoliplóides, onde diferentes genomas são combinados, e cada genoma está presente duas vezes. Os genomas são geneticamnete compatíveis, mas diferenciados com relação ao pareamento meiótico. Não existe permuta entre eles e formam bivalentes entre os mesmos genomas. Um exemplo clássico é o trigo comum, um alohexaplóide com três pares de genomas distintos (A, B, D), cuja fórmula genômica é AABBDD; c) Autoalopoliplóides, onde alguns genomas presentes mais que em dose dupla (autopoliplóide) estão combinados com outros genomas não homólogos, mas geneticamente compatíveis. São raros. Um possível exemplo é *Phleum pratense* (Cai & Bullen, 1991), onde o genoma A está presente quatro vezes e o genoma B, duas vezes, sendo representado pela fórmula AAAABB.

3.2.2.1 AUTOPOLIPLOIDIA

3.2.2.1.1 AUTOTRIPLOIDIA

Consiste na presença simultânea de três genomas básicos idênticos. Autotriplóides não podem ser produzidos diretamente por duplicação do número de cromossomos. A origem mais óbvia para um autotriplóide é através de hibridização entre um diplóide e o autotetraplóide correspondente. Devido às interações gênicas desfavoráveis entre o embrião, o endosperma e o tecido da planta , o desenvolvimento do embrião é bloqueado nos estágios iniciais. Com resgate de embrião por cultura *in vitro* progênies triplóides podem ser obtidas. Para contornar este problema, a formação de híbridos somáticos originados por fusão de protoplastos tem sido a solução. Nos casos de formação de triplóides via hibridização sexual, maior sucesso pode ser conseguido quando se usa o tetraplóide como genitor feminino.

Fenotipicamente, os triplóides tendem a apresentar características entre o diplóide e o tetraplóide, mas não superior aos dois. O comportamento meiótico dos autotriplóides é característico. Como três cópias de cada cromossomo está disponível, elas podem se parear em todas as combinações, em princípio com a mesma freqüência. A segregação cromossômica é altamente irregular, produzindo gametas com uma ampla variação em número de cromossomos, resultando em grande redução de fertilidade até a completa esterilidade.

A reduzida fertilidade dos triplóides os torna valiosos para culturas onde a produção de sementes não é desejada. A banana é o exemplo natural mais bem conhecido. Dentre os triplóides artificiais, a melancia sem sementes tem sido um grande sucesso e a tulipa é outro bom exemplo. Neste último caso, a esterilidade é vantajosa porque as flores que não produzem frutos duram muito mais. Dentre outras culturas comercialmente importantes, a triploidia só teve sucesso dentre aquelas que podem ser reproduzidas assexuadamente, como mandioca, alho etc. Um clássico exemplo de cultura comercial triplóide bem sucedida é o da beterraba açucareira (*Beta vulgaris*). Neste caso, todavia, como a planta é de reprodução sexuada, o triplóide tem que ser reconstruído em cada geração, como um híbrido. Para facilitar o

cruzamento, macho-esterilidade citoplasmática é empregada. Para maximizar a eficiência no cruzamento, utiliza-se o tetraplóide como genitor feminino.

A utilização de triplóides não se baseia apenas na falta de produção de sementes, mas também em algumas características morfológicas específicas que possam apresentar. Em beterraba, por exemplo, a triploidia é explorada por causa do formato da raiz.

3.2.2.1.2 AUTOTETRAPLÓIDES

Resultam da simples duplicação do número de cromossomos de um diplóide, apresentando, portanto, quatro genomas idênticos. Embora infreqüente, a duplicação pode ocorrer espontaneamente em tecidos somáticos envolvidos na reprodução. Quando desejada, a duplicação cromossômica somática pode ser induzida por tratamentos químicos apropriados, sendo que a colchicina é o agente indutor que fornece melhores resultados. A indução de poliploidia através da simples duplicação do número de cromossomos resulta em dois conjuntos idênticos de cromossomos, implicando em um alto grau de homozigosidade o que nem sempre é desejado. Segundo Bingham (1980), os poliplóides são desejáveis porque podem apresentar maior heterozigose que os diplóides e esta heterozigosidade deve ser buscada por outros métodos. Embora não esteja sendo aplicada na prática com este objetivo, a fusão somática tem um potencial promissor para criar e manter heterozigosidade em alguns casos, devendo merecer mais atenção.

A técnica geralmente mais recomendada para criar diversidade genética e manter a heterozigosidade em autopoliplóides é a formação de gametas não reduzidos, ou seja, por duplicação meiótica. Ao contrário dos métodos somáticos onde os genomas existentes são simplesmente multiplicados, na não redução meiótica ambos os genomas dos dois genitores são combinados e o nível de heterozigosidade diplóide de ambos é, pelo menos parcialmente, mantido. Watanabe *et al.* (1991), através de simulação de computador, concluíram que embora as vantagens deste método não sejam tão grandes quanto as esperadas, ainda é muito melhor que a duplicação somática. Este método é aplicado com mais sucesso em espécies que apresentam uma freqüência relativamente alta de gametas não reduzidos. Segundo Sybenga (1992), para a produção direta de tetraplóides, este método oferece algumas limitações porque a ocorrência simultânea de gametas não reduzidos em ambos os genitores é extremamente rara. Alguns genótipos que apresentam alta freqüência de gametas não reduzidos podem ser usados para tetraploidização direta, como em *Trifolium pratensis* (Parrot *et al.*,1985).

Alguns genes recessivos específicos que atuam em determinados passos da meiose levam à formação de gametas não reduzidos. Em *Solanum tuberosum* (2n=24) alguns genes têm sido valiosos nos programas de melhoramento. O gene *ps* (*parallel spindle*) faz com que os dois fusos da segunda divisão sejam paralelos, ao invés de perpendiculares como ocorre em plantas normais. Como a batata é uma planta dicotiledônea e, portanto, não apresenta citocinese ao final da primeira divisão, o resultado é a fusão dos dois fusos e restituição do número de cromossomos esporofítico (2n) por um processo que é efetivamente restituição da primeira divisão - FDR (Peloquin *et al.*, 1989). Nestes gametas, existe apenas uma pequena perda de

heterozigosidade resultante de permuta genética. Embora as cromátides irmãs de todos os cromossomos se separem, as cromátides derivadas de diferentes cromossomos são colocadas juntas novamente por este processo, restaurando as combinações alélicas originais. Os genes *el* (*elongate*) em milho (Rhoades & Dempsey, 1966) e o *tri* (*triploid inducer*) em cevada (Finch & Bennett, 1979) têm efeito comparável ao gene *ps*. Por causa da configuração linear das células resultantes da meiose e da degeneração de três dos quatro megásporos formados, o gene *ps* não opera na parte feminina. Utilizando um mutante dessináptico, Jongedijk *et al.* (1991) conseguiram produzir gametas não reduzidos FDR com heterozigosidade acima de 98%. Em *Bougainvillea* cultivada, Ohri & Zadoo (1986) encontraram gametas não reduzidos, equivalentes a FDR, em mutantes com separação precoce de centrômero e ausência de segunda divisão meiótica. Como houve formação de progênie triplóide e tetraplóide, os resultados sugeriram que o gene é ativo no lado masculino e feminino.

Distúrbios no processo meiótico normal, devido a causas genéticas ou ambientais, incluindo desbalanço híbrido, são as principais causas da restituição. Por exemplo, ausência completa de segunda divisão resulta diretamente em gametas não reduzidos do tipo SDR (Werner & Peloquin, 1987). A ocorrência de mutantes meióticos não é um fenômeno raro. Obviamente, muitos mutantes não levam à formação de gametas não reduzidos. Algumas linhagens de milho extraídas de populações brasileiras têm revelado uma alta freqüência de ausência de citocinese na primeira e/ou segunda divisão, levando à formação de díades (Caetano-Pereira *et al.*, 1998). Fenômeno semelhante tem sido encontrado em várias espécies de *Paspalum*, gênero em que a poliploidia predomina em relação à diploidia (Pagliarini *et al.*, 1999).

Os autotetraplóides têm grande importância prática. Muitas espécies cultivadas, principalmente aquelas em que o produto principal é a parte vegetativa, são autotetraplóides naturais. Após a descoberta de agentes poliploidizantes, nas décadas de 40 e 50 a indução de tetraplóides expandiu-se tremendamente, pois os melhoristas acreditavam que o simples fato de duplicar o número de cromossomos oferecia novas oportunidades para melhorar muitas espécies usadas comercialmente. Desejava-se melhorar, por exemplo, qualidade, produtividade, caracteres morfológicos, conteúdo de metabólitos secundários e resistência a estresse, pestes e doenças. Embora muitas tentativas tenham sido feitas, os resultados nem sempre foram animadores. A crença geral de que tetraplóides apresentariam na prática um efeito prático positivo sobre produtividade porque as plantas tendem a ser maiores, foi logo refutada. O aumento esperado em produção de matéria seca foi desapontador e a redução de fertilidade em plantas cujo produto econômico é a semente foi altamente desvantajosa. Embora muitas culturas importantes sejam autopoliplóides naturais, Gottschalk (1976) aponta que a dificuldade em se produzir bons autopoliplóides artificiais consiste na competição destes com seus genitores diplóides. Todavia, segundo Sybenga (1992), existem exemplos de autotetraplóides artificiais que gradualmente tornaram-se superiores aos genitores diplóides, pelo menos para algumas características. Os principais aspectos somáticos que distinguem os autopoliplóides são: a) interações interalélicas específicas; b) interações interalélicas gerais (heterose), que são diferentes em poliplóides, porque vários alelos diferentes podem estar presentes simultaneamente;

c) mudança de tamanho celular e nuclear, resultando primariamente em características "gigas", podendo provocar também outras mudanças na morfologia da planta; d) efeitos de dosagem gênica, alguns dos quais são específicos, incluindo, por exemplo, aumento de conteúdo de metabólitos secundários, e outros mais gerais, como mudanças morfológicas. Alguns desses efeitos podem ser positivos, enquanto outros seguramente são negativos. Segundo Evans & Rahman (1990), a redução de fertilidade nos poliplóides, por exemplo, não resulta apenas de irregularidades meióticas, mas também de desbalanço em dosagem gênica. Morfologicamente, os poliplóides tendem a ser mais robustos que seus correpondentes diplóides. Esta característica, conhecida como "efeito gigas", decorre do aumento do tamanho do núcleo por elevação na quantidade de DNA. Conseqüentemente, as células também tomam-se maiores. O aumento do volume celular nem sempre reflete em órgãos de maior tamanho, pois, algumas vezes, o número de células é reduzido. Uma revisão de literatura sobre este assunto pode ser encontrada em Dijk & Delden (1990).

3.2.2.1.3 POLIPLÓIDES SUPERIORES

Dentre os autopoliplóides com número de genomas superior a quatro, somente os hexaplóides têm alguma importância. Os efeitos negativos de um elevado número de genomas são maiores que os efeitos positivos. Existe, aparentemente, um número ótimo de genomas, o qual pode variar para diferentes espécies. Isto certamente ocorre porque mudanças drásticas em dosagem gênica podem comprometer processos biológicos delicadamente balanceados. A reprodução também pode ser seriamente afetada por irregularidades meióticas. Um outro aspecto que dificulta a utilização de poliplóides com número elevado de genomas é a maior dificuldade em se obter resultados em programas de seleção por causa da herança polissômica. O caso da beterraba açucareira ilustra bem o fato que para cada espécie existe um nível ótimo de genomas. Para esta cultura, o melhor nível de ploidia encontrado é a triploidia, não por causa da produtividade, mas sim por causa de características morfológicas e razões de processamento das raízes. Situação similar ocorre em *Lolium perenne,* onde as variedades tetraplóides são mais populares por causa de sua palatabilidade, apesar de serem menos produtivas. Por outro lado, sementes diplóides de *Psathyrostachys juncea* são pequenas e dificultam a formação de pastagens, enquanto as tetraplóides são grandes e produzem plântulas robustas (Wang & Berdahl, 1990). Em plantas medicinais, o conteúdo de princípios ativos pode ser aumentado com a poliploidia. Segundo Sybenga (1992), muitos exemplos podem ser dados neste sentido, mas para maiores detalhes sobre aspectos práticos da poliploidia no melhoramento e suas complicações citogenéticas, o leitor deve consultar literatura especializada.

3.2.3.2 ALOPOLIPLOIDIA

Um indivíduo cujo complemento cromossômico é formado por dois ou mais genomas oriundos de espécies distintas, é um alopoliplóide. Embora Winge (1917), tenha sido o primeiro pesquisador a enfatizar a importância da hibridização interespecífica, seguida de duplicação cromossômica para originar novas espécies, as tentativas de hibridização tiveram início no século XIX. Burnham (1962) cita que Rimpau, por volta de 1890, produziu triticale a partir de um cruzamento entre trigo

e centeio, e que um híbrido fértil foi produzido por Janezewski em 1892, a partir de um estéril, cruzando *Anemone silvestris* (2n=16) x *A. multifida* (2n=32). A alopoliploidia, vista como uma forma de combinar genes de duas espécies diferentes, obviamente, teve um papel relevante no processo evolutivo e, até hoje, constitui-se em uma ferramenta importante para o melhoramento de plantas.

3.2.3.2.1 ALOPOLIPLODIA NATURAL

A hibridização interespecífica entre espécies diplóides morfológica e genomicamente distintas, seguida por duplicação cromossômica (anfidiploidia ou alopoliploidização) teve um papel importante na especiação de plantas. Um grande número de culturas agronomicamente importantes, como café, brássicas, algodão, soja, cana-de-açúcar, aveia, fumo, trigo, entre outras, são alopoliplóides naturais. Os alopoliplóides duplicados caracterizam-se por apresentarem aspecto vigoroso, meiose normal e total fertilidade.

Os ancestrais diplóides de alopoliplóides naturais têm sido intensamente investigados baseando-se em distribuição geográfica, aspectos morfológicos, contagem de cromossomos, análise cariotípica, padrão de bandas de isozimas e estudos moleculares. Ancestrais de espécies alopoliplóides agronomicamente importantes, como as anteriormente citadas, têm sido amplamente estudados, sendo que Singh (1993) apresenta uma boa revisão sobre este assunto. Considerando a impossibilidade de se descrever todos os casos conhecidos, neste capítulo nos limitaremos a apresentar um caso classicamente citado na literatura para exemplificar a alopoliplodia natural. Trata-se da alopoliploidia no gênero *Brassica.* Este gênero consiste de três genomas básicos específicos (*B. campestris,* n=10=A; *B. oleracea,* n=9=C; *B.nigra,* n=8=B) que são poliplóides secundários de uma espécie extinta com um número básico de cromossomos x=6, fato elegantemente demonstrado por Röbbelen (1960), baseando-se na análise de cromossomos paquitênicos. Os estudos revelaram que *Brassica nigra* (B) é um duplo tetrassômico (genoma ABCDDEFF), *B. oleracea* (C) é triplo tetrassômico (genoma ABBCCDEEF) e *B. campestris* é duplo tetrassômico e um hexassômico (AABCDDEFFF), sendo que cada letra designa um cromossomo particular. Os alotetraplóides naturais *B. napus* (n=19, AC), *B. juncea* (n=18, AB) e *B. carinata* (n=17, BC) exibem meiose normal, como um diplóide, e herança dissômica. As espécies ancestrais de *B. napus, B. juncea* e *B.carinata,* foram determinadas há muitos anos (U, 1935) através de estudos de pareamento meiótico em híbridos triplóides de *B. napus* x *B. campestris, B. napus x B. oleracea, B. carinata x B. oleracea* e *B. carinata x B. nigra.* A Figura 2, mostra, com clareza, os genomas envolvidos na formação de cada espécie. Estas informações têm sido confirmadas por outros autores através da ressíntese de anfidiplóides e também através de eletroforese de proteínas em sementes, variação no DNA mitocondrial e cloroplastidial e padrão de fragmentos de restrição (para revisão, veja Singh, 1993). Attia & Röbbelen (1986) verificaram, inclusive, que anfidiplóides já estabelecidos têm um comportamento meiótico mais estável que os recém-sintetizados, sugerindo um controle genético para esta catacterística.

Nem sempre a identificação dos ancestrais do alopoliplóide é uma tarefa fácil. Um bom exemplo desta dificuldade ocorre em trigo (*Triticum aestivum,*

2n=6x=42). A natureza alohexaplóide desta espécie foi identificada e descrita por Kihara & Nishiyama (1930). Híbridos triplóides (*T. turgidum*, 2n=4x=28 x *T. monococcum*, 2n=2x=14) e pentaplóides (*T. turgidum* x *T. aestivum*) exibiram configurações cromossô-micas de 7II + 7I e 14II + 7I, respectivamente. Este pareamento indicou que o diplóide (*T. monococcum*), o tetraplóide (*T. turgidum*) e o hexaplóide (*T. aestivum*) têm, respectivamente, um (AA), dois (AABB) e três (AABBDD) genomas e que A está presente nos três níveis de ploidia. Durante muitos anos, *T. monococcum* (2n=2x=14) foi considerado como o doador do genoma A, e *T. urartu*, outra espécie diplóide, doadora do genoma B. Todavia, análises desenvolvidas por Kerby & Kuspira (1987), demonstraram que o genoma A provavelmente proveio de *T. urartu* e não de *T. monococcum*.

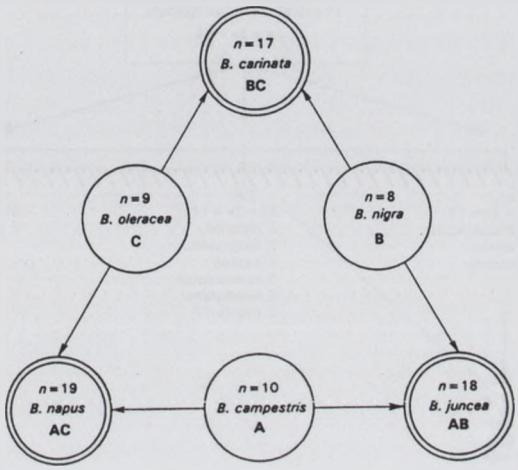


FIGURA 2. Esquema de alopoliploidia natural em *Brassica* (De acordo com U, 1935).

A origem do genoma B é, até hoje, um quebra-cabeça para os citogeneticistas. Baseados em distribuição geográfica, aspectos morfológicos, análises de cariótipos, padrão de bandas C e N, pareamento meiótico, conteúdo de DNA nuclear, estudos de hibridização *in situ* , padrão de fragmentos de restrição de genes de RNAr, hibridização DNA:DNA, padrão de bandas de proteínas de sementes, estudos de compatibilidade e incompatibilidade citoplasmática, Kerby & Kuspira (1988) propuseram seis espécies diplóides selvagens como possíveis fontes do genoma B.

Com base em caracteres morfológicos, distribuição geográfica, análise cariotípica e suscetibilidade à ferrugem, Pathak (1940) propôs *T. tauschi* (*Aegilops squarrosa*), uma espécie diplóide selvagem, doadora do genoma D, e isto foi independentemente verificado por muitos outros autores (para revisão, veja Singh, 1993). A Figura 3 mostra um diagrama da possível origem do trigo hexaplóide (*T. aestivum*).

3.2.3.2.2 ALOPOLIPLOIDIA ARTIFICIAL

A transferência de genes de espécies selvagens para espécies comercialmente importantes tem produzido lucros cada vez maiores no melhoramento de plantas. O domínio das técnicas de poliploidização abriu amplos caminhos para este embaralhamento de genes. O cruzamento de duas espécies distintas, formando um alopoliplóide, obviamente, tem problemas de pareamento cromossômico. Em geral, os híbridos interespecíficos F_1 são estéreis. A fertilidade pode ser restaurada duplicando-se os cromossomos. Este procedimento promove homologia cromossômica. Este

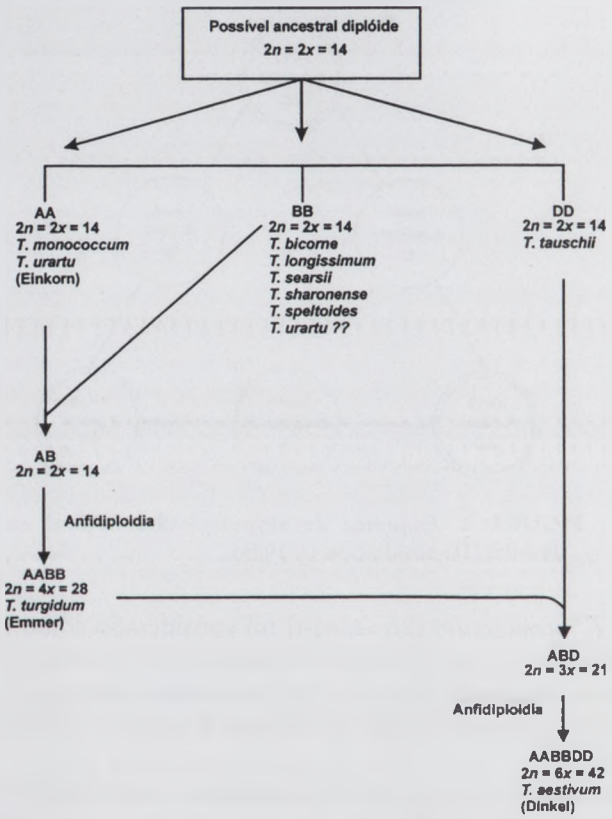


FIGURA 3. Diagrama da possível origem do trigo hexaplóide (De acordo com Singh, 1993).

indivíduo híbrido fértil, com o número de cromossomos duplicado, conhecido como anfidiplóide, é, na verdade, uma nova espécie, a qual pode ou não assemelhar-se aos genitores

Um exemplo clássico de alopoliploidia artificial citado na literatura é o caso do híbrido intergenérico entre rabanete (*Raphanus*) e repolho (*Brassica*), que deu origem a espécie artificial *Raphanobrassica*. Este cruzamento foi feito pelo citogeneticista russo, Karpechenko, em 1927. Embora as duas espécies apresentassem o mesmo número de cromossomos (2n=18), o híbrido F_1 foi totalmente estéril por falta de homologia cromossômica entre os dois genomas. A duplicação cromossômica devolveu a homologia para cada genoma (R e B), criando artificialmente uma espécie alopoliplóide fértil (RRBB), com 2n=36 cromossomos. Ao realizar este cruzamento, o melhorista esperava, provavelmente, uma planta com raiz de rabanete e cabeça de repolho. Todavia, quis a sorte que o híbrido apresentasse raiz de repolho e folha de rabanete. Este exemplo mostra, claramente, que ao se realizar uma hibridização interespecífica os resultados obtidos nem sempre são condizentes com os desejados.

Um outro exemplo clássico de alopoliplóide artificial freqüentemente encontrado na literatura é o *Triticosecale*, vulgarmente conhecido como triticale, resultante do cruzamento entre trigo e centeio. A primeira tentativa de cruzar estas duas espécies deu-se ainda no século XIX. Todavia, somente na década de 30 do século XX, é que este cruzamento começou a ser estudado citogeneticamente. Triticale é um octaplóide (2n=56) contendo dois genomas do trigo hexaplóide (*Triticum aestivum*, 2n=6x=42) e dois genomas de centeio (*Secale cereale*, 2n=14). A duplicação cromossômica no híbrido F_1 resgatou a fertilidade no triticale. Neste cruzamento, também a intenção do melhorista era reunir as boas características do trigo para panificação com a rusticidade do centeio. Embora as sementes do híbrido (triticale) não sejam favoráveis à panificação, apresentam boas qualidades para ração animal.

A hibridização interespecífica tem mais êxito em plantas que não necessitam ser propagadas por sementes. Entre as plantas ornamentais, principalmente aquelas em que as flores são exploradas comercialmente, as variedades cultivadas geralmente são híbridas. Nesta categoria incluem-se, por exemplo, rosas, gladíolos, dálias, lírios, orquídeas etc. Dentre as orquídeas, as mais raras e belas resultam de hibridização intergenérica.

3.2.3.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ALOPOLIPLÓIDES

Se considerarmos que há necessidade de um certo grau de parentesco entre as espécies para que a hibridização ocorra, espera-se que haja, pelo menos, homologia parcial (homeologia) entre os seus cromossomos. Esta homologia parcial pode resultar na formação de multivalentes ou bivalentes originados por diferentes combinações cromossômicas entre as espécies. A extensão deste comportamento irá variar de acordo com as espécies que foram cruzadas. Em um extremo, estão aqueles alopoliplóides formados por espécies distantemente relacionadas que não apresentam homologia entre os genomas, pareando-se somente em bivalentes. No outro extremo, estão os alopoliplóides em que os cromossomos das duas espécies são totalmente homólogos, podendo formar associações multivalentes. No primeiro caso, o pareamento é denominado autossindético e, no segundo, alossindético. Entre estes dois extremos, estão aqueles com diferentes graus de homologia entre os genomas constituintes. Estes intermediários são conhecidos como alopoliplóides segmentares. Nestes casos, nem sempre a homologia é suficiente para formar apenas bivalentes, podendo formar também multivalentes. Segundo Burnham (1962), a homologia cromossômica dos alopoliplóides pode ser evidenciada por diferentes formas: a) Pareamento multivalente no alopoliplóide e bivalente no haplóide derivativo. Em alopoliplóides, associações multivalentes são freqüentes e indicam homologia entre os cromossomos genitores. Em haplóides derivados de alopoliplóides, a presença de bivalentes reforça esta homologia. Bivalentes em anel indicam mais homologia que bivalentes em cadeia; b) Freqüência de mutantes visíveis em alopoliplóides. Em um diplóide, uma mutação recessiva em um único loco pode se tornar visível logo na próxima geração, enquanto na presença de dois genomas distintos, uma mutação só aparecerá se houver dominância completa. Quanto maior for o número de genomas, maior será a dificuldade para a expressão da mutação; c) Grau de esterilidade em heterozigotos estruturais. Quanto mais genomas estiverem presentes, menor será o efeito das aberrações estruturais heterozigotas sobre o genoma; d) Efeito compensante de tetrassômicos específicos sobre combinações nulissômicas. Para grupos cromossômicos que apresentam homeologia, uma condição nulissômica pode ser ocultada quando outros cromossomos do grupo estão presentes como tetrassômicos. Para cromossomos não homeólogos, obviamente, não há este efeito compensante; e) Razões genéticas duplicadas ou triplicadas. Razões genéticas duplicadas ou triplicadas, correspondentes à heterozigosidade de 2 ou 3 locos são comuns em alopoliplóides.

3.2.3.2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PROVÁVEIS GENITORES DE ALOPOLIPLÓIDES

Em muitas situações é interessante, ou até mesmo necessário, conhecer as espécies que deram origem ao alopoliplóide. O maior problema nesta identifiacação

é que nem o alopoliplóide e nem seus ancestrais diplóides permaneceram inalterados desde a sua origem. Geralmente, os alopoliplóides reduzem a duplicação genética, num processo conhecido como diploidização. Nesta identificação, a análise genômica tem um papel fundamental.

O primeiro passo em uma análise genômica é a seleção com base na morfologia, histologia, anatomia e bioquímica das espécies que são os melhores candidatos a genitores do alopoliplóide. O próximo passo é a análise de homologia cromossômica. Na análise genômica, um íntimo parentesco entre as espécies é expresso por um bom pareamento entre os cromossomos, seguido de formação de quiasmas. O alopoliplóide sob investigação é cruzado com o provável ancestral para ver se há pareamento entre um genoma do alopoliplóide com o genoma do genitor. Este método vem sendo usado desde a década de 20. O mais antigo exemplo de análise genômica foi dado por Goodspeed & Clausen (1928), mostrando que os ancestrais de *Nicotiana tabacum* (2n=4x=48) são *N. sylvestris* (2n=24) e *N. tomentosa* (2n=24). O híbrido F_1 entre *N. tabacum* x *N. sylvestris* apresentou 12 bivalentes grandes e 12 univalentes menores em metáfase I. O mesmo comportamento foi observado no híbrido entre *N. tabacum* x *N. tomentosa,* formando, porém, 12 bivalentes menores e 12 univalentes de maior tamanho.

Quando mais espécies são elegíveis a genitores, aquela que mostrar a mais extensiva associação cromossômica é considerada a ancestral. O teste da análise genômica é a ressíntese artificial. Quando o alopoliplóide sintético e o natural assemelham-se intimamente e mostram fertilidade em F_1, pode-se assumir que a análise está correta. Após checar a análise, a ressíntese artificial pode ter outros dois propósitos: a) aumentar a variabilidade genética do alopoliplóide antigo por hibridização com o artificial pode ser muito interessante para os programas de melhoramento; b) detectar possíveis alterações evolutivas entre os ancestrais e o alopoliplóide.

Nos últimos anos, técnicas de biologia molecular como eletroforese de proteínas, variação no DNA mitocondrial e DNA cloroplastidial, padrão de fragmentos de restrição (RFLP) e hibridização *in situ,* têm auxiliado enormemente na identificação dos genitores de alopoliplóides. Sem dúvida, dentre estas técnicas, a citogenética molecular talvez seja a que mais contribuiu para a identificação genômica. Embora a técnica de hibridização *in situ* (*in situ hybridization - ISH)* tenha sido desenvolvida há 30 anos (Gall & Pardue, 1969), sua aplicação em plantas tornou-se ampla somente no final da década de 80, quando passou a ser um método rotineiro para mapear fisicamente seqüências de DNA repetitivo e famílias multigênicas. O padrão de hibridização em cromossomos tornou-se uma excelente forma de marcar cromossomos. A ISH em plantas, usando sondas de DNA marcadas com biotina e detectadas por métodos enzimáticos, foi introduzida por Rayburn & Gill (1985). Uma modificação nesta técnica feita por Pinkel *et al.*(1986), utilizando fluorocromo para detecção do sinal (*fluorescence in situ hybridization - FISH*), trouxe mais vantagens. Na FISH, além de diferentes sondas de DNA utilizando fluorocromos poderem ser utilizadas simultaneamente, os sinais fluorescentes podem ser capturados e analisados por sistema digital de imagem, permitindo um mapeamento mais preciso. Todavia, uma modificação nesta técnica marcando todo o genoma (*genomic in situ hybridization*

- *GISH*) permitiu analisar com sucesso, a estrutura cromossômica e a evolução de espécies alopoliplóides. Nesta técnica, desenvolvida por Durnam *et al.* (1985), o DNA total do genoma de um genitor ou de um híbrido é marcado como sonda, e o DNA total não marcado do genoma do outro genitor é adicionado à mistura para hibridização. A hibridização dependerá da presença de seqüências de DNA repetitivo genoma-específicas. Se os genomas dos genitores forem muito próximos e compartilharem a maioria das seqüências de DNA repetitivo, a distinção entre os dois genomas torna-se difícil. Bennett (1995) traz bons exemplos de como a hibridização genômica *in situ* auxiliou na identificação de genomas em genitores de espécies alopoliplóides. A hibridização genômica *in situ* pode ter, ainda, outras aplicações. Pode ser usada na análise meiótica para monitorar pareamento intergenômico homeólogo. Quando as espécies são intimamente relacionadas, como *Hordeum vulgare* e *H. bulbosum,* é difícil distinguir pareamento intragenômico por análise convencional. Uma outra aplicação desta técnica consiste na identificação de rearranjos cromossômicos. Várias translocações cromossômicas, por exemplo, foram identificadas em genomas de tabaco, aveia, trigo (para revisão, veja Jiang & Gill, 1994). Esta técnica tem sido aplicada também para monitorar a introgressão de segmentos cromossômicos de espécies selvagens em espécies cultivadas. Bennett (1995), analisando vários casos, concluiu que a hibridização genômica *in situ* tem-se mostrado ser a mais eficiente entre todas as demais técnicas utilizadas para este propósito, pois além de ser rápida, sensível e acurada, é a mais informativa. Tão grande é a sua eficácia, que chegou a ser patenteada na Europa por Heslop-Harrison *et al.* (1990), como um método para identificar seqüências de DNA em cromossomos de plantas.

4. MÉTODOS CITOGENÉTICOS PARA A INTRODUÇÃO DE GENES EM PLANTAS CULTIVADAS

A introdução de caracteres agronomicamente importantes de espécies selvagens para plantas cultivadas através de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos tem sido demonstrada em inúmeras culturas (Goodman *et al.*, 1987). Esta metodologia tem-se transformado em uma ferramenta valiosa para criar variabilidade e aumentar a base genética de plantas cultivadas. A plena exploração de genitores selvagens muitas vezes é dificultada por causa do baixo poder de cruzamento entre o doador e o receptor, aborto precoce de embrião, inviabilidade da semente híbrida, letalidade da plântula e esterilidade do híbrido. Estas barreiras podem ser superadas pelo uso de hormônios de crescimento que reduzem o aborto de embrião, melhoria das condições de cultura, restauração da fertilidade por duplicação dos cromossomos do híbrido F_1 estéril e utilização de cruzamento-ponte onde cruzamentos diretos não são possíveis. A introgressão de caracteres desejáveis de genitores selvagens (doador) para plantas cultivadas (receptor) pode ser feita através da produção de linhas de adição, linhas de substituição e linhas de translocação.

4.1 LINHAS DE ADIÇÃO

Nem sempre a introdução de todo o genoma selvagem é interessante para a planta cultivada. Quando isto acontece, pode-se lançar mão da introdução apenas

do cromossomo desejado. As linhas de adição consistem na introdução de um ou dois cromossomos de uma espécie selvagem no genoma de uma espécie cultivada. No primeiro caso, são chamadas linhas de adição monossômicas e, no segundo caso, linhas de adição dissômicas. Ambas podem ser produzidas tanto em espécies diplóides quanto poliplóides. O'Mara (1940) descreve o procedimento básico para a formação de linhas de adição, no qual modificações devem ser feitas dependendo do nível de ploidia e natureza da cultura. O procedimento básico envolve a produção de híbrido interespecífico ou intergenérico F_1, duplicação cromossômica (anfiploidia), retrocruzamento (RC_1) com o genitor receptor, isolamento de monossômicos em um segundo retrocruzamento (RC_2) e seleção de linhas de adição dissômicas após autofecundação de linhas monossômicas. Sem dúvida, as espécies mais estudadas em termos de adição de cromossomos são trigo-centeio. Todavia, Singh (1993) apresenta uma extensa lista de espécies diplóides e poliplóides de interesse econômico onde genes importantes foram introduzidos utilizando esta metodologia. A Figura 4 ilustra o método básico para obtenção de linhas de adição monossômicas e dissômicas em trigo (2n=6x=42)-centeio(2n=2x=14).

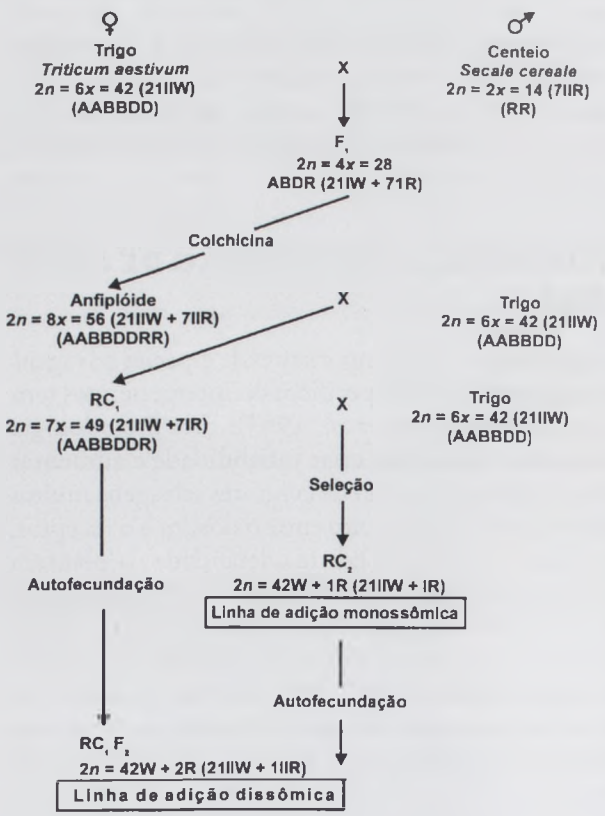


FIGURA 4. Método para obtenção de linhas de adição monossômicas e dissômicas de trigo (2n=6x=42)-centeio (2n=2x=14) (De acordo com Singh, 1993).

Quando se adiciona um cromossomo em uma determinada espécie, este precisa ser reconhecido. A identificação de uma linha de adição pode ser feita de diferentes maneiras: a) **Identificação morfológica**. As linhas de adição monossômicas e dissômicas podem ser identificadas morfologicamente, pois o cromossomo adicionado pode modificar o aspecto vegetativo da planta. As alterações podem ser qualitativas e quantitativas. A maioria das modificações é devida a interações entre os genes do genitor doador e do receptor e cada cromossomo tem um efeito específico sobre a morfologia da planta e fertilidade. O efeito de cada um dos sete pares de cromossomos de centeio sobre a morfologia da espigueta de trigo é mostrado por Singh (1993); b) **Identificação citológica**. Os cromossomos introduzidos nas linhas de adição muitas vezes podem ser reconhecidos simplesmente

através da morfologia cromossômica, como comprimento total, comprimento relativo e razão de braços. Em outros casos, marcadores cromossômicos como padrão de bandas, distribuição da eucromatina/heterocromatina, posição do centrômero e presença de região organizadora do nucléolo, facilitam a identificação. O bandamento C, sem dúvida, tem sido uma ferramenta importante na identificação dos cromossomos introduzidos. Singh & Röbbelen (1976) e Mukai *et al.* (1992) mostram bons exemplos do uso desta metodologia para identificar cromossomos de centeio adicionados ao genoma de trigo. Nos últimos anos, a técnica de hibridização *in situ* tem sido muito empregada, pois localiza com precisão os cromossomos adicionados ao genoma do genitor receptor. Os cromossomos introduzidos podem ser identificados também na meiose. Em linhas de adição monossômicas, geralmente permanecem como univalentes. Todavia, se houver homologia total ou parcial com algum par de cromossomos do genitor receptor, pode formar trivalente. Nas linhas de adição dissômicas espera-se a formação de um bivalente. A presença de dois univalentes pode indicar que os cromossomos não são homólogos. Em muitos casos, o cromossomo introduzido sofre fissão na primeira meiose originando cromossomos telocêntricos. Nestes casos, formam-se linhas de adição ditelossômicas; c) **Identificação bioquímica**. Caracteres bioquímicos, como padrão de bandas de isoenzimas, podem ser também muito úteis para a identificação do cromossomo introduzido. Utilizando esta metodologia, Islam & Shepherd (1990) mapearam genes em cromossomos ou braços cromossômicos de cevada que controlam um grande número de isoenzimas.

O comportamento meiótico do cromossomo introduzido durante o processo de melhoramento é variável. Em linhas de adição monossômicas, o cromossomo introduzido, por ser univalente, pode ser eliminado ou incluído em um dos gametas. Assim, a transmissão do cromossomo extra é esperada ser baixa e depende do cromossomo envolvido. Em *Oryza officinalis*, por exemplo, não houve transmissão masculina para os cromossomos 2, 5, 6, 8 e 11, enquanto para o cromossomo 12 foi de 14,6% (Singh, 1993).

Nas linhas de adição dissômicas, por formarem bivalentes, espera-se que os cromossomos extras apresentem um comportamento meiótico normal. Todavia, isto nem sempre ocorre. Diferenças no ciclo meiótico entre o receptor e o doador levam a eliminação de cromossomos do doador.

A fertilidade da semente em linhas de adição monossômicas e dissômicas é influenciada pelo nível de ploidia do genitor receptor, pela afinidade genômica entre as espécies doadora a receptora e pela constituição genética dos cromossomos adicionados.

4.2 LINHAS DE SUBSTITUIÇÃO

As linhas de substituição podem ser de três tipos: substituição genômica, substituição cromossômica e substituição segmental. Embora a substituição cromossômica seja uma ferramenta poderosa para se aumentar a variabilidade genética, a maioria dos exemplos de linhas de substituição provém do trigo.

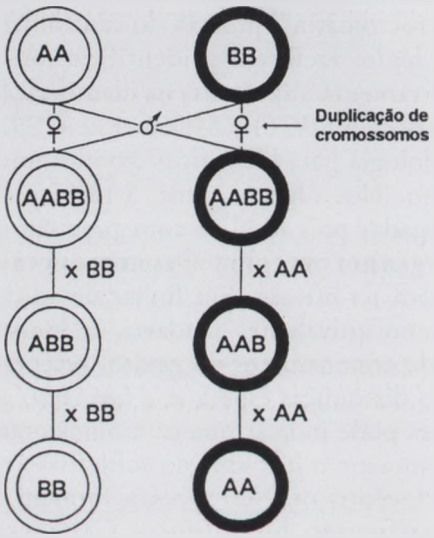


FIGURA 5. Diagrama mostrando substituição de genoma após duplicação de cromossomos (De acordo com Singh, 1993).

4.2.1 SUBSTITUIÇÃO GENÔMICA

Na substituição genômica há uma total substituição do genoma da espécie cultivada dentro do citoplasma da espécie selvagem. Citoplasma de espécies selvagens são excelentes fontes de macho-esterilidade citoplasmática. A substituição genômica pode ser através de cruzamentos entre a espécie selvagem (fêmea) e a espécie cultivada (macho), seguida por retrocruzamentos recorrentes para eliminar os caracteres indesejáveis doados pela espécie selvagem (Figura 5). A cultivar modificada é conhecida como linha aloplásmica. Linhas aloplásmicas não são fáceis de serem produzidas. Em geral é necessário cultura de embrião para se resgatar as plantas F_1 aloplásmicas. Tais linhas mostram, ocasionalmente, redução na germinação de semente, alteração no hábito de crescimento, fertilidade de semente variável, mudanças na maturidade e deformações na semente.

4.2.2 SUBSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA

Neste procedimento é feita a completa substituição de um cromossomo ou de um par cromossômico dentro do genoma da espécie cultivada. A substituição só é possível quando há uma estreita relação genética entre os cromossomos a serem substituídos. Linhas de substituição têm sido pesquisadas amplamente em trigo com o objetivo de se introduzir genes para resistência a doenças e pragas.

Para se produzir uma linha de substituição cromossômica é necessário primeiramente isolar uma linha monossômica para uma das espécies e uma linha de adição dissômica para a outra espécie. A primeira será usada como fêmea e a segunda como doadora de pólen. Por seleção e autofecundação de plantas F_1, pode-se chegar a completa substituição de um par cromossômico. A Figura 6 esquematiza o processo de obtenção de linhas de substituição.

4.3 LINHAS DE TRANSLOCAÇÃO

Muitas vezes, a substituição total de um cromossomo traz consigo uma série de caracteres indesejáveis da espécie selvagem. Nestes casos, pode-se proceder apenas a substituição do segmento cromossômico desejado. A substituição segmental do cromossomo da espécie selvagem no cromossomo da espécie cultivada pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por mutagênicos. Este método é especialmente efetivo quando um gene dominante deve ser introduzido, pois o reconhecimento de um gene recessivo seria bastante complicado. Na aplicação desta metodologia tem-se

que tomar cuidado para que a introdução intercalar do pequeno segmento desejado não seja acompanhada por uma perda de segmento cromossômico da espécie receptora. Uma outra forma de introduzir um segmento cromossômico desejado é através da recombinação genética entre a espécie doadora e receptora. Para tal, é necessário remover as barreiras do pareamento cromossômico entre as espécies. Neste caso, também é desejável que o segmento permutado seja o menor possível.

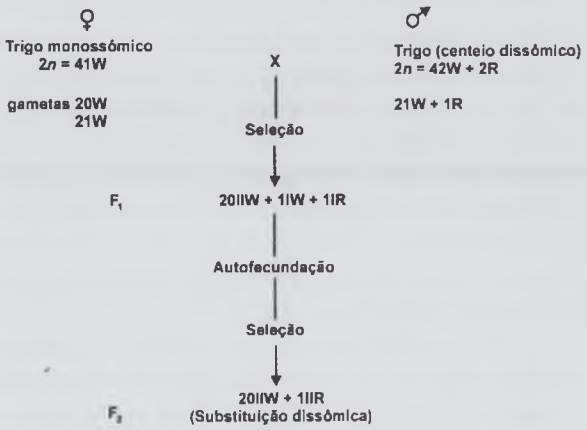


FIGURA 6. Esquema de produção de linha de substituição em trigo (De acordo com Singh, 1993).

Teoricamente, a produção de linhas de adição e linhas de substituição é muito fácil. Todavia, segundo Singh (1993), muitas vezes é necessário uma década de trabalho para se produzir uma linha de adição monossômica. Para encorajar citogeneticistas e melhoristas envolvidos em programas de hibridização, Harlan (1976) coloca que cruzamentos amplos não exigem somente paciência, mas determinação, confiança e, freqüentemente, uma boa dose de habilidade e ingenuidade. Assim, não surpreendentemente, os materiais mais simples são os mais usados.

5. INSTABILIDADE NA DIVISÃO CELULAR

5.1 INSTABILIDADE SOMÁTICA

A constância do número de cromossomos em eucariotos é de tal importância que pode ser usada como um parâmetro na identificação de espécies. Todavia, variações cromossômicas somáticas em plantas têm sido descritas em mais de 240 espécies (para revisão, veja Nirmala & Rao, 1996). A ocorrência de variação intra-individual no número de cromossomos, conhecida como mosaicismo, consiste na presença simultânea de células diplóides, poliplóides e/ou aneuplóides em diferentes partes da planta ou de um mesmo tecido. As causas do mosaicismo, natural ou induzido, podem ser diversas. Dentre elas citam-se a ocorrência de endopoliploidia, anormalidades de fuso, formação de sincícios, não-disjunção cromossômica, eliminação de cromossomos etc. Mosaicismo envolvendo euploidias em tecidos somáticos são muito mais comuns que aqueles envolvendo aneuploidias. São freqüentes em raízes, meristemas apicais e tapetum.

Em plantas de reprodução assexuada, o mosaicismo é uma força potencial na evolução e diferenciação de raças cromossômicas, criando diversidade citológica. Muitas espécies de monocotiledôneas bem sucedidas, onde o único modo de reprodução é por meio vegetativo, a origem de novas formas é através de variantes somáticos. Em plantas propagadas sexuadamente, a instabilidade somática canalizada

nos tecidos reprodutivos leva à produção de gametas com número não balanceado de cromossomos, os quais podem se tornar abortivos ou serem efetivos na fertilização. Neste último caso, podem formar plantas hipo ou hiperplóides na próxima geração, as quais poderão apresentar problemas de fertilidade devido às irregularidades meióticas. Além de implicações evolutivas, o mosaicismo tem implicações práticas. Os mixoplóides, produzidos por eliminação de cromossomos em híbridos interespecíficos, têm sido usados para se transferir caracteres desejáveis, como genes para resistência a doenças. A eliminação de cromossomos, formando aneuplóides, tem sido usada também na determinação de grupos de ligação, relações genômicas e criação de linhas de adição.

A instabilidade somática pode levar também à desuniformidade varietal. Um bom exemplo de instabilidade somática, supostamente responsável por decadência varietal, é encontrado em uma variedade brasileira de trigo, a IAS 54. Esta variedade, descendente de uma variedade meioticamente instável, a Norin 10, foi amplamente cultivada no Estado do Rio Grande do Sul; apresentava grande desuniformidade em suas características agronômicas e alta freqüência de aberrações cromossômicas somáticas (Moraes-Fernandes *et al.*, 1984).

A presença de mosaicismo pode ter ainda outras implicações. Plantas diplóides de seringueira submetidas à poliploidização, apresentam várias alterações morfológicas na área do painel que, além de provocar exudação de látex, limita e dificulta a sangria. Estudos sugerem que estas alterações são causadas por mosaicismo. Contagens de cromossomos em células somáticas de folhas jovens de plantas poliploidizadas mostraram uma mistura de células 2n=36 e 2n=72(Ong, 1980) e variações numéricas entre 2n=36 e 72 (Gonçalves *et al.*, 1983).

5.2 INSTABILIDADE MEIÓTICA

A divisão meiótica caracteriza-se pela ocorrência de uma série de fenômenos mecânicos e bioquímicos que culminam, com a formação de quatro células haplóides. Em plantas de reprodução sexuada, a formação da semente exige dupla fertilização. Assim, em uma cultura onde o produto meiótico é a semente, como é o caso dos cereais, é de se esperar que problemas meióticos que causem alterações no genoma afetem a sua produtividade. Por outro lado, a instabilidade meiótica, por gerar gametas desbalanceados, pode levar à formação de plantas aneuplóides.

Uma cultivar, de acordo com Jensen (1965), é uma população mantida artificialmente fora do equilíbrio natural, criada pela engenhosidade humana e, que portanto, depende de cuidados. A preocupação do melhorista com a uniformidade varietal não é recente. Segundo este autor, a desuniformidade varietal é causada por segregação do cruzamento original, mutação, mistura mecânica e instabilidade inerente ao sistema reprodutivo da planta. Enquanto os três primeiros fatores mencionados manteriam a freqüência dos tipos aberrantes em proporções constantes, as falhas no sistema reprodutivo (instabilidade meiótica) tenderiam a aumentar, podendo ser responsável pela decadência da cultivar. Dentro deste contexto, o uso de material citogeneticamente instável em cruzamentos pode trazer problemas tanto para a seleção, diminuindo a eficiência, como para a uniformidade e a pureza da futura cultivar.

No Brasil, a instabilidade meiótica responsável pela desuniformidade varietal tem sido amplamente estudada em trigo e triticale. Os resultados obtidos pelo laboratório de citogenética da Embrapa Trigo (CNPT), em conjunto com o Departamento de Genética da Universidade do Rio Grande do Sul, revelaram que oscilações climáticas drásticas, baixa insolação, excesso de água, moléstias fúngicas, uso de defensivos agrícolas e acidez do solo são fatores importantes no aumento de anormalidades cromossômicas responsáveis pela ocorrência de tipos desviantes. As anormalidades meióticas mais freqüentes foram cromossomos univalentes, bivalentes não orientados na placa, pontes cromossômicas acompanhadas por fragmentos, aderências cromossômicas, segregações irregulares gerando aneuploidias e micronúcleos em tétrades (para revisão, veja Moraes-Fernandes, 1982; Moraes-Fernandes *et al.*, 1984; 1991). Um outro exemplo de desuniformidade varietal ocasionada provavelmente por instabilidade meiótica é o do alho-porró (*Allium ampeloprasum* spp. *porrum*), uma espécie comercialmente importante e extensivamente cultivada na Europa (Khazanehdari & Jones, 1997). As cultivares em uso, resultantes de métodos tradicionais de melhoramento e multiplicadas por polinização aberta, mostram níveis de variabilidade inaceitáveis pelo mercado consumidor. Estudos citogenéticos em quatro variedades revelaram que irregularidades meióticas relacionadas à segregação cromossômica eram responsáveis pela formação de micronúcleos nas díades e tétrades, resultando em gametas aneuplóides. Análises somáticas revelaram que uma alta freqüência de plântulas eram aneuplóides, e que a aneuploidia estava ligada à desuniformidade fenotípica.

Plantas alógamas, quando autofecundadas, mostram depressão por endogamia, a qual é manifestada por redução de vigor e produtividade. Os efeitos da endogamia sempre foram interpretados à luz da genética Mendeliana, havendo fixação de alelos e aumento de homozigose. Alguns estudos têm demonstrado, entretanto, que parte da redução de produtividade observada em linhagens endogâmicas deve-se à presença de irregularidades meióticas (para revisão, veja Pagliarini, 1989). A capacidade de combinação tem sido definida com base na genética quantitativa, sendo considerada uma função direta da diferença de freqüências alélicas. Todavia, estudos realizados em linhagens endogâmicas de milho por Pagliarini (1983; 1989) e Pagliarini *et al.* (1986) revelaram que as linhagens portadoras de baixa capacidade de combinação apresentam sempre um maior nível de instabilidade meiótica, sugerindo que além da maior freqüência de alelos favoráveis, a capacidade de combinação de uma linhagem é influenciada também pela estabilidade meiótica.

Os efeitos da instabilidade meiótica sobre a fertilidade ou a uniformidade varietal podem ser diferentes dependendo do nível de ploidia da espécie. Em geral, plantas poliplóides como aveia, trigo e triticale, podem tolerar desequilíbrios cromossômicos mais drásticos do que uma espécie diplóide, por causa do "efeito tampão da poliploidia" que compensa, parcialmente, as perdas de material genético. Quando se avalia os efeitos da instabilidade meiótica sobre a fertilidade de plantas poliplóides afetadas, nem sempre se encontra correlação entre as variáveis. Todavia, nas progênies de plantas afetadas a correlação é mais estreita. Moraes-Fernandes *et al.* (1984) propõem duas interpretações para este fato: a) as anormalidades cromossômicas podem levar a perda de genes. Se os genes perdidos não estiverem relacionados com

funções vitais para o desenvolvimento do pólen ou da semente, não deverão afetar a viabilidade do portador. Na descendência de plantas instáveis, existe uma possibilidade maior de se evidenciar a sua falta já que, em algum momento, desde a formação do embrião até o indivíduo adulto, os genes ausentes deverão ser solicitados e sua falta poderá se refletir em maior ou menor grau na fertilidade; b) a outra alternativa seria a de que a instabilidade afetasse somente um dos gametas, de modo que os grãos formados seriam heterozigotos para as deficiências cromossômicas, o que não afetaria a fertilidade. Nas progênies de plantas instáveis, por autofecundação, as deficiências entrariam em homozigose numa certa porporção de zigotos, tornando evidente a esterilidade.

5.2.1 INSTABILIDADE MEIÓTICA VS. PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

Considerando que a instabilidade meiótica pode levar à decadência da cultivar, Baezinger & Knowles (1969) consideraram ser essencial a existência de um programa citológico contínuo operando ao lado dos programas de melhoramento. Como a análise de todo o processo meiótico é difícil e demorada e envolveria um grande número de plantas, Love (1949) propôs o uso de um parâmetro, definido por ele como "Índice Meiótico", que refletisse a ocorrência de anormalidades meióticas. Considerando que as anormalidades meióticas, em geral, levam à formação de tétrades de micrósporos anormais, o Índice Meiótico, que representa a percentagem de tétrades normais, seria um indicador da regularidade meiótica. Do ponto de vista prático, e considerando sua experiência como melhorista, o autor sugeriu que plantas com índices inferiores a 90 trariam problemas quando usadas em cruzamentos. Outros pesquisadores relataram ser mais rigorosos quanto ao nível de regularidade meiótica preconizado como importante.

Em alguns países, para o preenchimento das exigências de pureza varietal, a regularidade meiótica teria que ser praticamente perfeita. No Brasil, como não existem exigências rígidas de pureza varietal, as novas cultivares não sofrem um processo de seleção tão rigoroso para uniformidade, podendo acumular uma elevada incidência de irregularidades meióticas. Um bom exemplo da falta de controle de pureza varietal no Brasil ocorreu em um híbrido duplo de milho produzido por uma cooperativa do Estado do Paraná. Alguns anos após o seu lançamento no mercado, os agricultores perceberam que o mesmo não apresentava mais a produtividade inicial e muitas plantas não produziam pólen. A análise citológica deste híbrido realizada por Taschetto & Pagliarini (1993) revelou que algumas plantas eram portadoras de uma mutação meiótica nunca antes descrita na literatura, a qual inviabilizava completamente a produção de grãos de pólen, causando total macho-esterilidade (Figura 7). A detecção desta anormalidade levou a empresa a retirar o híbrido do mercado.

De acordo com Moraes-Fernandes *et al.* (1984), a ocorrência de instabilidade meiótica pode, em alguns casos, colocar o melhorista em situação difícil em relação à utilização ou não de uma cultivar em cruzamentos. As cultivares utilizadas em programas de melhoramento o são por suas boas características agronômicas e a não utilização das mesmas limitaria o germoplasma disponível. Ao usar cultivares meioticamente instáveis, o melhorista deve estar consciente de que a introdução de

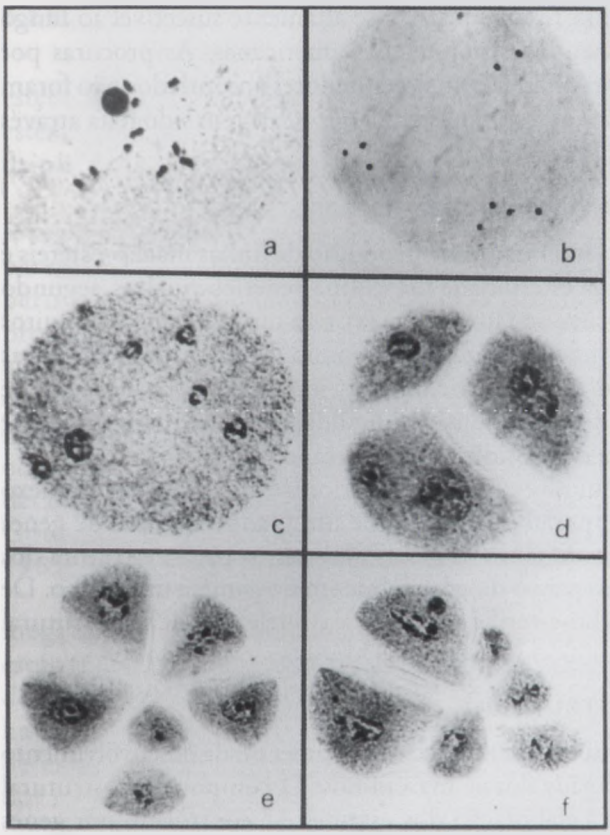


FIGURA 7. Mutante meiótico em milho que exibe ausência de formação de fibras de fuso. Neste mutante a meiose é normal até a fase de diacinese (a). Como não há formação de fibras de fuso, os bivalentes não convergem para a região equatorial, permanecendo dispersos no citoplasma (b). Bivalentes próximos podem ser incluídos em um mesmo núcleo. O número de núcleos na telófase dependerá da distância entre os bivalentes (c). Não há meiose II. Nesta telófase já ocorre a citocinese final, levando à formação de políades com micrósporos de diferentes tamanhos (d, e, f). (Fotos da autora).

genes para instabilidade prejudicará, no mínimo, a homogeneidade das futuras cultivares. A transmissão regular das características de uma geração para outra fica afetada. A tendência será de haver um aumento gradual de tipos aberrantes, pois a instabilidade geralmente é recorrente. A intensidade desse aumento dependerá de fatores intrínsecos a cada cultivar e a instabilidade poderá ocasionar e/ou acelerar a deterioração varietal.

6. MACHO-ESTERILIDADE

O principal objetivo da produção de variedades híbridas consiste na utilização máxima da heterozigosidade, a qual, em baixa escala, pode ser conseguida através de alopoliploidização ou translocação permanente. Todavia, para muitas espécies, a produção de uma variedade híbrida envolve muitos cruzamentos ao acaso entre linhas homozigóticas, até se conseguir a heterozigosidade desejada. Para facilitar tais cruzamentos, geralmente são plantadas várias fileiras da linhagem feminina, as quais são regularmente intercaladas com poucas fileiras da linhagem masculina. O grande problema deste sistema consiste na produção e manutenção de linhagens unicamente femininas. Muitas metodologias têm sido propostas, mas a mais usada universalmente é a da macho-esterilidade condicionada pelo citoplasma (*cytoplasmic male sterility - CMS*). Este sistema foi amplamente utilizado em milho, até o momento em que o

citoplasma mais usado (citoplasma Texas) mostrou-se altamente suscetível ao fungo *Helminthosporium maydis,* dizimando as populações americanas. As procuras por novas fontes de citoplasma macho-estéreis com restauradores apropriados não foram bem sucedidas e a produção de linhas femininas em larga escala tem sido feita através da remoção mecânica ou manual dos pendões.

6.1 MACHO-ESTERILIDADE GENÉTICO-NUCLEAR

Um outro sistema extremamente útil na produção de linhas macho-estéreis é o genético-nuclear. A vantagem da esterilidade masculina genético-nuclear, segundo Sybenga (1992), não consiste apenas no fato de que existem muitos genes em muitos cromossomos que podem sofrer mutações úteis que causam macho-esterilidade, mas também que cada linha normal é, automaticamente, um perfeito restaurador de fertilidade. O grande problema desse sistema é a dificuldade em manter e aumentar as linhas fêmeas para larga escala de hibridização no campo.

O desenvolvimento masculino em plantas superiores é um processo complexo que requer a correta expressão espacial e temporal de um grande número de genes para a macho-esterilidade, incluindo tanto os genes necessários para a estrutura dos órgãos, quanto aqueles requeridos para o desenvolvimento do gameta masculino. De acordo com Singh (1993), a macho-esterilidade genético-nuclear pode ser estrutural ou esporogênica.

6.1.1 MACHO-ESTERILIDADE ESTRUTURAL

A macho-fertilidade estrutural é definida como o processo de desenvolvimento que forma especificamente os órgãos florais masculinos. O componente estrutural da fertilidade envolve o início e a elaboração dos estames e é controlado por genes esporofíticos. Mutantes que perturbam este processo podem ser estruturalmente macho-estéreis se a fertilidade feminina permanecer inalterada. Um número considerável de mutantes macho-estéreis estruturais têm sido isolados em diversas plantas (Chaudhury *et al.*, 1992; 1994). Estas mutações podem incluir desde má formação ou ausência de estames, até não-deiscência de anteras. Em milho, por exemplo, na presença dos genes mutantes nucleares recessivos *at* (*antherless*), d_2, d_3, d_5, an_1 e an_2, há desenvolvimento de mini-anteras, nas quais a quantidade de pólen produzida é insuficiente (veja Kaul, 1988).

A fertilidade esporogênica, por outro lado, envolve o desenvolvimento de gametas masculinos normais dentro dos lóculos das anteras e sua liberação para iniciar a interação pólen-estigma, sendo controlada por genes esporofíticos e gametofíticos em conjunto. Segundo Chaudhury *et al.* (1992), estes genes podem ser facilmente distinguidos pelo seu modo de herança. Se uma mutação recessiva *ms* (*male-sterile*) é esporofítica, todos os pólens nas plantas heterozigotas *ms/Ms* serão funcionais. Contudo, se a mutação *ms* é gametofítica, metade dos grãos de pólen será não-funcional. Como a esterilidade gametofítica origina pólens não-funcionais, a mutação gametofítica *ms* não poderá ser propagada via pólen, sendo, então, transferida via gameta feminino. Como a maioria dos mutantes *ms* é total ou parcialmente estéril, a infertilidade gametofítica é difícil de ser identificada. Assim, a maioria dos mutantes macho-estéreis identificados é esporofítica.

6.1.2 MACHO-ESTERILIDADE ESPOROGÊNICA

Em um levantamento feito por Kaul (1988), dentre 210 espécies macho-estéreis investigadas, para a maioria, a base da esterilidade foi esporogênica. A macho-esterilidade esporogênica caracteriza-se pela completa ausência ou escassez de grãos de pólen devido ao aborto de micrósporos ocasionado por mutações meióticas.

A meiose é um processo complexo que ocorre em todos os organismos que se reproduzem sexuadamente. Através de eventos geneticamente controlados, como pareamento cromossômico, formação de complexo sinaptonêmico, ocorrência de permuta genética, formação de quiasmas e segregação cromossômica, origina produtos meióticos haplóides. A precisa seqüência dos eventos meióticos pode ser alterada pela presença de mutações. Mutantes meióticos podem alterar drasticamente o comportamento cromossômico levando à esterilidade do grão de pólen. Mutantes meióticos, de origem espontânea ou induzidos, são comuns em plantas superiores, ocorrendo em um grande número de culturas de interesse econômico. Maiores detalhes sobre controle genético e mutantes meióticos, podem ser encontrados em Gottschalk & Kaul (1974; 1980 a,b), Baker *et al.* (1976) e Golubowskaya (1979; 1989).

Os genes *ms* causam completa avaria na microsporogênese, enquanto a megasporogênese não é afetada. Os genes *ms* atuam com remarcável precisão em estágios específicos, podendo agir na pré-meiose, meiose ou pós-meiose. A maioria dos genes *ms* é pós-meiótico. Em milho, por exemplo, segundo Kaul, até 1988, haviam, no mínimo, 45 mutantes macho-estéreis descritos que afetavam o desenvolvimento esporogênico. Em 27 deles, os genes *ms* atuavam após a liberação dos micrósporos das tétrades, enquanto nos 18 restantes, os genes atuavam na pré-meiose ou meiose.

Os mutantes pré-meióticos são raros em plantas superiores e difíceis de serem identificados por questões metodológicas. Dentre os mutantes meióticos, predominam aqueles que afetam o pareamento cromossômico (*mutantes sinápticos*). Os genes *as* (*assinápticos*) causam assinapse, afetando total ou parcialmente o pareamento dos cromossomos homólogos nos estágios iniciais da meiose, enquanto os genes *ds* (*dessinápticos*) causam dessinapse, promovendo separação precoce dos cromossomos homólogos. A Figura 8 mostra alguns aspectos do comportamento citológico de um mutante sináptico encontrado em soja.

Apesar dos inúmeros mutantes meióticos já identificados em milho, muitas mutações espontâneas que causam macho-esterilidade têm sido identificadas por Pagliarini e colaboradores em populações brasileiras. Tais mutantes, ainda em estudo, poderão constituir-se em importantes ferramentas em programas de hibridização. A Figura 9 mostra alguns aspectos citológicos de alguns desses mutantes.

A maioria dos sistemas explorados de macho-esteriladade nuclear é baseada em alelos recessivos (*ms*) do tipo selvagem dominante fértil (*Ms*) (Rao *et al.*, 1990). Macho-esterilidade dominante é rara. Tem sido descrita ocorrer espontaneamente em *Brassica rapa* (Meer, 1987) e, por indução mutagênica, em *Brassica oleracea* (Dunemann & Grunewaldt, 1991). Um método para explorar a macho-esterilidade nuclear dominante em programas de melhoramento foi proposto por estes últimos

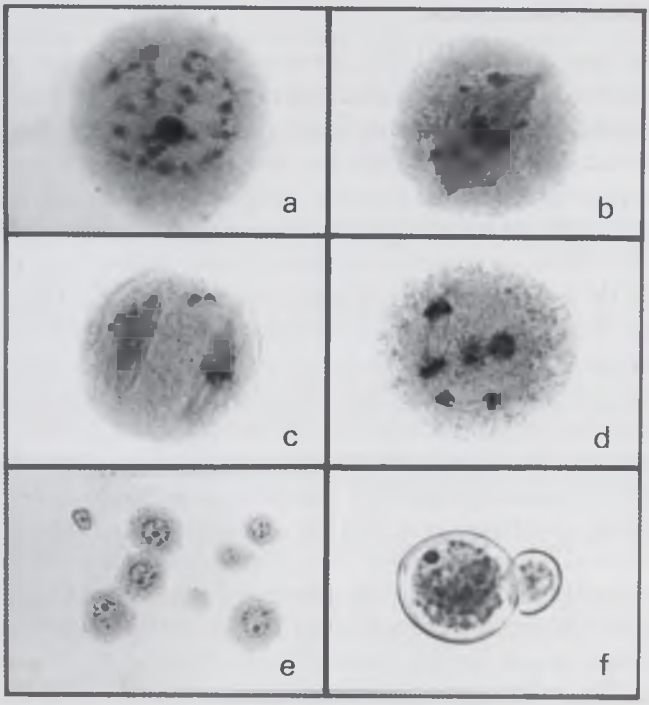


FIGURA 8. Aspectos citológicos de um mutante sináptico em soja que causa macho-esterilidade total. a) Microsporócito em diacinese mostrando cromossomos univalentes. b) Metáfase I com inúmeros univalentes em ascensão precoce. c) Metáfases II com fusos múltiplos. d) Anáfase II com fusos múltiplos. e) Micrósporos de diferentes tamanhos resultantes da formação de micronúcleos. f) Grãos de pólen de diferentes tamanhos. (Fotos da autora)

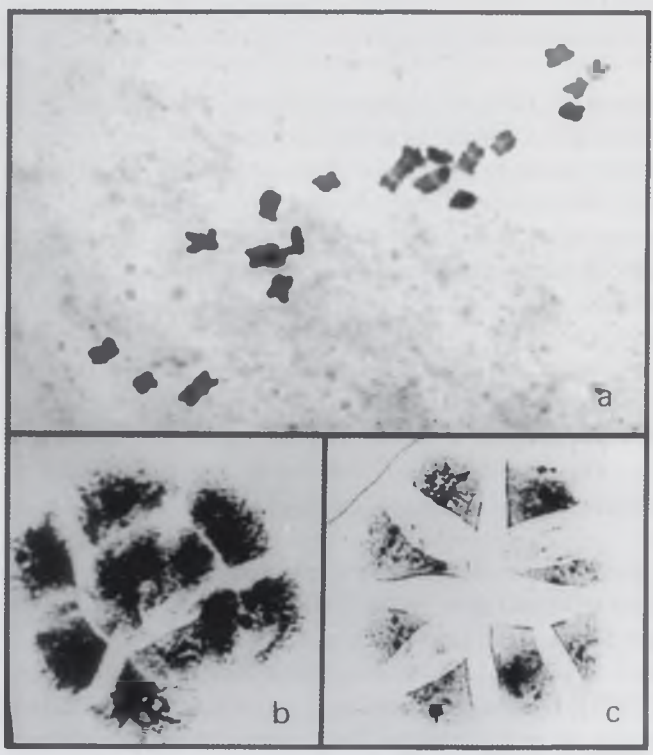


FIGURA 9. Aspectos citológicos de dois mutantes meióticos de milho que causam macho-esterilidade: a) mutante *afd* (*absence of first division*); b,c) mutante *po* (*polymitotic*). Na presença do gene *afd*, o pareamento cromossômico não ocorre e a primeira divisão meiótica é substituída por uma mitose típica. Os cromossomos, na forma de univalentes, exibem morfologia de metáfase tratada com inibidor de fuso (a). Neste mutante a segregação cromatídica ocorre na anáfase I, comprometendo a regularidade segregacional na meiose II. Na presença do gene *po*, a tétrade sofre as mitoses pós-meióticas precocemente (b, c), isto é, sem a ocorrência prévia de replicação de DNA, causando total esterilidade do pólen. (Fotos da autora)

autores. De acordo com Horner & Palmer (1995) e Phillips & Suresh (1997), o uso de um sistema de macho-esterilidade nuclear permite a produção de sementes híbridas a um custo mais compatível, pois resulta em plantas macho-estéreis estáveis. Todavia, a produção de híbridos será mais eficiente se um sistema adequado estiver disponível para a sua manipulação. A busca de tal sistema intensificou-se nos últimos anos. O uso de um sistema acoplando o gene *po (polymitotic)* a um cromossomo duplicado-deficiente (Dp-Df), desenvolvido por Phillis & Suresh (1997), produziu 98,3% de plantas estéreis.

7. ELIMINAÇÃO DE CROMOSSOMOS

A eliminação de cromossomos é um fenômeno comum em embriões de híbridos interespecíficos e intergenéricos entre certas espécies de plantas e constitui-se numa ferramenta poderosa no melhoramento de plantas. A eliminação diferencial de cromossomos facilita a produção de linhas de adição, enquanto a eliminação completa de um genoma permite a formação de haplóides. O caso de eliminação de cromossomos mais bem estudado é o do gênero *Hordeum*. Quando *Hordeum vulgare* (espécie cultivada) é cruzada com *H. bulbosum* (espécie selvagem), os cromossomos desta última são gradual e seletivamente eliminados (Subrahmanyam & Kasha, 1973). A eliminação se dá por fragmentação cromossômica, formação de pontes e fragmentos, incapacidade de migração dos bivalentes para a placa equatorial, falta de migração de cromossomos para os pólos, com posterior formação de micronúcleos e degradação de cromatina. O processo de eliminação de cromossomos nos embriões de híbridos interespecíficos entre *H. bulbosum* e *H. vulgare* ocorre entre o terceiro e o quinto dia após a polinização e é geneticamente controlado, sendo que a estabilidade do híbrido é influenciada pelo balanço dos genomas genitores. Plantas haplóides são produzidas em alta freqüência (98,2%) a partir de cruzamentos entre diplóides das duas espécies. Todavia, no híbrido entre um genitor haplóide de *H. vulgare* com um de *H. bulbosum,* cuja razão genômica é 1V : 2B, a eliminação não acontece. Baseando-se em anormalidades cromossômicas e desenvolvimento, Subrahmanyam & Kasha (1973) concluíram que a estabilidade do endosperma obedece a razão genômica em ordem decrescente: 1V : 4B > 1V : 2B > 1V : 1B > 2V : 1B. Os embriões VBB são muito maiores e desenvolvem-se melhor em cultura que os embriões com outras razões genômicas.

A maioria dos casos de eliminação cromossômica descrita na literatura refere-se à eliminação nos estágios iniciais do desenvolvimento do embrião. Eliminação de cromossomos durante a gametogênese ocorre mais freqüentemente em animais. Todavia, um estudo recente em um acesso brasileiro de *Paspalum subciliatum* (Gramineae) revelou eliminação cromossômica na microsporogênese (Adamowski *et al.*, 1998). Tratava-se de um alotetraplóide (2n=40), cujos genomas genitores apresentavam clara assincronia no ciclo celular e os cromossomos dos dois genomas não atingiam os pólos ao mesmo tempo. O genoma retardatário era eliminado em micronúcleos. Como resultado, os gametas formados apresentavam apenas o genoma de um dos genitores. A Figura 10 mostra alguns aspectos da eliminação de cromossomos nesta espécie.

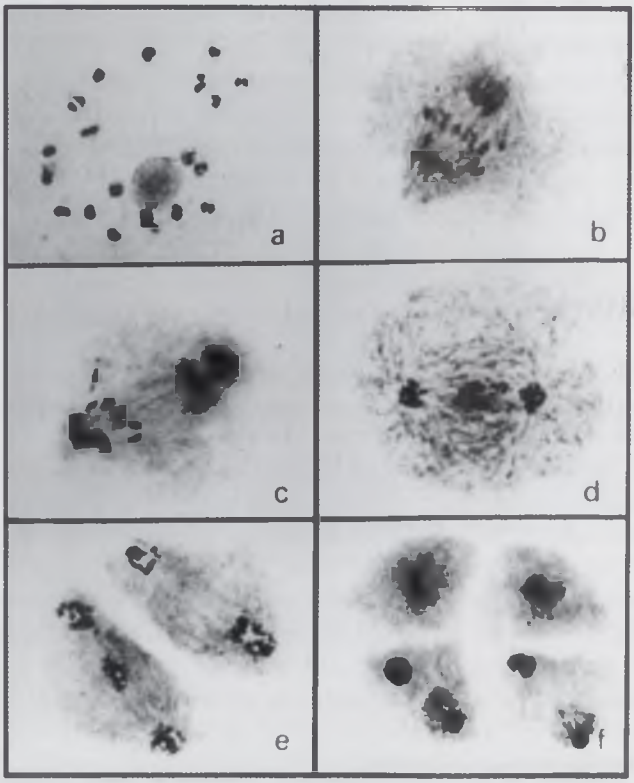


FIGURA 10. Eliminação de cromossomos durante a microsporogênese de *Paspalum subciliatum* por assincronia no ciclo celular. a) Diacinese com 20 bivalentes. b) Meiose I com um genoma genitor em anáfase I e o outro ainda em metáfase I. c) Final de anáfase I com um genoma genitor nos pólos e o outro, já segregado, mostrando claro atraso. d) Telófase I para um dos genomas genitores, enquanto o outro ainda se encontra na região equatorial na forma de bivalente. e) Telófase II mostrando o genoma retardatário englobado em um micronúcleo. f) Tétrade de micrósporos com o genoma eliminado em dois micronúcleos. (Fotos da autora)

8. APOMIXIA

No melhoramento de plantas, principalmente na produção de híbridos, é interessante e desejável manter a heterozigosidade. A forma mais fiel de reprodução por semente para se manter a heterozigosidade de um genótipo é através de apomixia. A apomixia é uma forma de reprodução assexuada em que o embrião formado não é resultante da união de gametas, mas as estruturas envolvidas na produção deste embrião são concernentes à reprodução sexuada. Existem várias formas de apomixia (veja Rutishauser, 1967), sendo que o embrião apomítico pode se desenvolver a partir do gametófito ou do esporófito. Em alguns casos o embrião diplóide é formado diretamente a partir de tecidos diplóides dos órgãos reprodutivos maternais, por exemplo, do integumento, sem sofrer meiose (apomeiose e aposporia). Em outros casos, envolve meiose, mas o embrião formado não é resultante de fertilização, mas sim de óvulos não fertilizados, os quais podem ser reduzidos (partenogênese haplóide) ou não (partenogênese diplóide).

A aplicação da apomixia no melhoramento de plantas não é muito fácil, pois uma fase generativa precedendo a fixação genética final pela apomixia é um pré-requisito. Considerando que a apomixia é geneticamente controlada, a solução é introduzir genes para apomixia no material a ser melhorado e selecionar, em fases posteriores, o genótipo desejado portador de apomixia. Entre muitas tentativas feitas em diferentes espécies, Murty *et al.* (1984) e Dujardin & Hanna (1986)

conseguiram introduzir genes para apomixia em sorgo e milho, respectivamente. A transferência de genes para apomixia e sua exploração, requer conhecimento do tipo da base genética complexa da apomixia a ser utilizada na espécie concernente. Muitos autores têm sugerido, em muitas ocasiões, que a hibridização interespecífica e a poliploidia desempenham um papel importante no surgimento da apomixia (veja Sybenga, 1992). Uma possível razão para explicar porque muitos apomíticos são híbridos e/ou poliplóides, é que nestes indivíduos a fertilidade sexual é extremamente reduzida devido a anormalidades meióticas, não garantindo a reprodução via gametas. Segundo Gröber & Zacharias (1983), este fato não exclui a possibilidade de que a poliploidia, por si só, seja um fator estimulante do desenvolvimento partenogenético por desregular o processo de reprodução sexual. O inverso também tem sido observado. Asker (1980) descreveu casos em diplóides apomíticos facultativos que deram origem a autotetraplóides totalmente sexuais. Sybenga (1992) fornece outros exemplos onde a poliploidia e a apomixia não se mostraram correlacionadas. A forte tendência ao desenvolvimento partenogenético deve ser a base da apomixia em plantas onde o ciclo reprodutivo principal permanece intacto. Para a indução artificial de apomixia, esta tendência deve ser considerada como ponto de partida.

A base da capacidade para o desenvolvimento partenogenético, levando à indução de apomixia funcional, envolve, principalmente, dois processos. Um é a endorreduplicação pré-meiótica ou endomitose, que resulta em dois cromossomos idênticos com duas cromátides cada um, que ficam muito próximos e em alinhamento paralelo, formando autobivalentes no zigóteno com exclusão dos outros homólogos, que são igualmente duplos. Na anáfase I, dois núcleos filhos diplóides idênticos são formados, resultando em uma tétrade com quatro células diplóides com o genótipo genitor. Quando uma destas células se desenvolve partenogeneticamente em embrião, o ciclo apomítico está completo. Este ciclo pode requerer fertilização dos núcleos secundários do saco embrionário (pseudogamia) para garantir o desenvolvimento do endosperma. Um bom exemplo deste tipo de processo pode ser dado no gênero *Allium,* onde *A. tuberosum* indiano (*Chinese chives*) é autotetraplóide e tem uma grande importância comercial regional.

O segundo processo de origem de apomixia, baseado primariamente em uma anormalidade meiótica combinada com uma tendência ao desenvolvimento partenogenético com provado potencial para manipulação, é a restituição da primeira divisão (FDR). Hermsen *et al.* (1985), citogeneticistas de batata, propuseram usar FDR para produzir sementes com toda ou pelo menos a maior parte da heterozigosidade maternal. No caso de batata, existem pelo menos duas razões principais para se substituir a reprodução vegetativa por reprodução por semente. Uma é a razão fitossanitária, pois a infecção por vírus é um grande problema na produção de batata, especialmente em países tropicais. A reprodução por semente elimina o vírus. A outra razão é a manutenção de tubérculos de uma estação a outra para plantio, pois são mais difíceis de serem armazenados que sementes. A desvantagem da semente é o período juvenil, que aumenta o ciclo da cultura. Em batata, a restituição da segunda divisão (SDR) também é possível, porém não conserva a mesma heterozigosidade genotípica que a FDR.

Em muitas espécies de *Solanum,* a FDR ocorre espontaneamente e está sob controle genético. Para se trabalhar com este sistema de apomixia, é importante que outros genes, como aqueles que causam dessinapse, possam ser introduzidos, pois reduzem o nível de recombinação mantendo a heterozigosidade e estimulam a restituição da primeira divisão. Muitos experimentos têm sido conduzidos com batatas diplóides (veja Sybenga, 1992) e deram bons resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; BATISTA, L.A.R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata Group). **Sexual Plant Reproduction**, v.11, p. 272-276, 1998.

ASKER, S. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. **Hereditas**, v.93, p.277-293, 1980.

ATTIA, T.; RÖBBELEN, G. Meiotic pairing in haploids and amphidiploids of spontaneous versus synthetic origin in rape, *Brassica napus* L. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.28, p.330-334, 1986.

BAEZINGER, H.; KNOWLES, R.P. Agronomic significance of supernumerary chromosomes in controlled-cross progenies and experimental synthesis of crested wheatgrass. **Canadian Journal of Plant Science**, v.49, p.173-179, 1969.

BAKER, B.S.; CARPENTER, A.T.C.; ESPOSITO, M.S.; ESPOSITO, R.E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. **Annual Review of Genetics**, v.10, p.53-134, 1976.

BENNETT, M.D. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biossystematics. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 4., Kew, 1995. **Proceedings**. Kew: Royal Botanic Garden,1995. p.167-183.

BINGHAM, E.T. Maximum heterozigosity in autopolyploids. In: LEWIS, W.H. (Ed.) **Polyploidy**: biological relevance. New York: Plenum Press, 1980. 583p.

BURNHAM, C.R. **Discussions in cytogenetics**. Minneapolis: Burgess, 1962. 375p.

CAETANO-PEREIRA, C.M.; DEFANI-SCOARIZE, M.A.; PAGLIARINI, M.S.; BRASIL, E.M. Syncytes, abnormal cytokinesis and spindle irregularities in maize microsporogenesis. **Maydica**, v.43, p.235-242, 1998.

CAI, Q.; BULLEN, M.R. Characterization of genomes in timothy (*Phleum pratense* L): I. Karyotypes and C-banding patterns in cultivated timothy and two wild relatives. **Genome**, v.34, p.52-58, 1991.

CHAUDHURY, A.M.; CRAIG, S.; BLOEMER, K.C.; FARREL, L.; DENNIS, E.S. Genetic control of male fertility in higher plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.419-426, 1992.

CHAUDHURY, A.M.; LAVITHIS, M.; TAYLOR, P.E.; CRAIG, S.; SINGH, M.B. SIGNER, E.R.; KNOX, R.B.; DENNIS, E.S. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analysis of premeiotic developmental mutants. **Sexual Plant Reproduction**, v.7, p.17-28, 1994.

DIJK,P.; DELDEN, W. Evidence for autotetraploidy in *Plantago* media and comparisons between natural and artificial cytotypes concerning cell size and fertility. **Heredity**, v.65, p.349-357, 1990.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. An apomictic polyhaploid obtained from a pearl millet x *Pennisetum squamulatum* apomictic interspecific hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.33-36, 1986.

DUNEMANN. F.; GRUNEWALDT, J. Identification of a monogenic dominant male sterility mutant in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). **Plant Breeding**, v.106, p.161-163, 1991.

DURNAM, D.M.; GELINAS, R.; MYERSON, D. Detection of species specific chromosomes in somatic cell hybrids. **Somatic Cell Molecular Genetics**, v.11, p.571-577, 1985.

EVANS, G.M.; RAHMAN, M.M. The basis of low grain yield and infertility in autotetraploid barley (*Hordeum vulgare*). **Heredity**, v.64, p.305-313, 1990.

FINCH, R.A.; BENNETT, M.D. Action of triploid inducer (tri) on meiosis in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Heredity**, v.43, p.87-93, 1979.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.63, p.378-383, 1969.

GOLUBOVSKAYA, I.N. Meiois in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. **Advances in Genetics**, v.26, p.149-192, 1989.

GOLUBOVSKAYA, I.N. Genetic control of meiosis . **International Review of Cytology**, v.58, p.247-290, 1979.

GONÇALVES, P.S.; VALOIS, A.C.C.; PAIVA, J.R. Induction and investigation of polyploidy in IAN 717 rubber tree clone. A perliminary study. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.18, p.789-796, 1983.

GOODMAN, R.M.; HAUPTLI, H.; CROSSWAY, A.; KNAUF, V.C. Gene transfer in crop improvment. **Science**, v.236, p.48-54, 1987.

GOODSPEED, T.H.; CLAUSEN, R.E. Interspecific hybridization in *Nicotiana*: VIII. The *sylvestris-tomentosa-tabacum* hybrid triangle and its bearing on the origin of *tabacum*. **University California Publications: Botany**, v.11, p.245-256, 1928.

GOTTSCHALK, W. **Die Bedeutung der Polyploidie für die Evolution der Pflanzen**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1976.

GOTTSCHALK, W.; KAUL, M.L.H. Asynapsis and desynapsis in flowering plants: I. Asynapsis. **Nucleus**, v.23, p.1-15, 1980a.

GOTTSCHALK, W.; KAUL, M.L.H. Asynapsis and desynapsis in flowering plants. II. Desynapsis. **Nucleus**, v.23, p.97-100, 1980b.

GOTTSCHALK, W.; KAUL, M.L.H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants. **Nucleus**, v.17, p.133-166, 1974.

GRÖBER, K.; ZACHARIAS, M. Über Nutzungsmöglichkeiten der apomiktischen Samenausbuilding bei ausgewählten kulturpflanzen. **Kulturpflanze**, v.31, p.145-163, 1983.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

HARLAN, J.R. Genetic resources in wild relatives of crops. **Crop Science**, v.16, p.239-333, 1976.

HERMSEN, J.G.; RAMANA, M.S.; JONGEDIJK, E. Apomictic approach to introduce uniformity and vigour into progenies from true potato seed (TBS). In: PLANNING Conference Present and Future Strategies for Potato Breeding and Improvement. Lima: CIP, 1985. p.99-114.

HESLOP-HARRISON, J.S.; LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; BENNETT, M.D. A method of identifying DNA sequences in chromosomes of plants. **European Patent Application 8828130.8**, December 8, 1990.

HORNER, H.T.; PALMER, R.G. Mechanisms of genic male stertelity. **Crop Science**, v.35, p.15527-15535, 1995.

ISLAM, A.K.M.R.; SHEPHERD, K.W. Incorporation of barley chromosomes into wheat. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotecnhology in agriculture and forestry**: wheat. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p.128-151.

JENSEN, N.F. Population variability in small grains. **Agronomy Journal**, v.57, p.153-162, 1965.

JIANG, J.; GILL, B.S. Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. **Genome**, v.37, p.717-725, 1994.

JONGEDIJK, E.; HUTTEN, R.C.B.; WOLK, J.M.A.D.A.; SCHUURMANS-STEKHOVEN, S.E.J. Synaptic mutants in potato, *Solanum tuberosum* L.: III. Effect of the *Ds-1/ds-1* locus (desynapsis on genetic recombination in male and female meiosis. **Genome**, v.34, p.121-130, 1991.

KARPECHENKO, G.D. Polyploid hybrid of *Raphanus sativus L x Brassica oleracea*. **Bulletin of Applied Botany**, v.17, p.398-410, 1927.

KAUL, M.L.H. **Male-sterility in higher plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

KERBY, K.; KUSPIRA, J. Cytological evidence bearing on the origin of the B genome in polyploid wheats. **Genome**, v.30, p.36-43, 1988.

KERBY, K.; KUSPIRA, J. The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). **Genome**, v.29, p.727-737, 1987.

KHAZANEHDARI, K.A.; JONES, G.H. The causes and consequences of meiotic irregularity in the leek (*Allium ampeloprasum* spp *porrum*); implications for fertility, quality and uniformity. **Euphytica**, v.93, p.313-319, 1997.

KHUSH, G.S. **Cytogenetics of aneuploids**. New York: Academic Press, 1973. 301p.

KIHARA, H.; NISHIYAMA, I. Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*: I. Genomaffinitäten in tri-, tetra- und pentaploiden weizenbastarden. **Cytologia**, v.1, p.270-284, 1930.

LOVE, R.M. La citologia como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina de Agronomia**, v.16, p.1-13, 1949.

MEER, Q.P. Chromosomal monogenic dominant male sterility in Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* (Lour) Hannet). **Euphytica**, v.36, p.927-931, 1987.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Estudo da instabilidade meiótica em cultivares de trigo. Efeito genotípico, relação com fertilidade e seleção de plantas estáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1177-1191, 1982.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; ZANATTA, A.C. Fatores responsáveis pela desuniformidade varietal no trigo *Triticum aestivum* (L) Thell e o papel da instabilidade cromossômica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.353-369, 1991.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ZANETTINI, M.H.B.; GUERRA, M.; DEL DUCA, L.J.A.; SERENO, M.J.C.; ZANELLA, C.C. Instabilidade cromossômica e adaptação em trigo. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P.S.; BANDEL, G. (Ed.) **Tópicos de citogenética e evolução de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984. p.69-110.

MUKAI, Y.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of "Imperial" rye chromosomes added to "Chinese Spring" wheat. **Japanese Journal of Genetics**, v.67, p.71-83, 1992.

MURTY, E.R.; KIRTI, P.B.; BHARARTHI, M.; RAO, N.G.P. The nature of apomixis and its utilization in the production of hybrids ("Vybrids") in *Sorghum bicolor* (L.). **Z. Pflanzenzuecht**, v.92, p.30-39, 1984.

NIRMALA, A.; RAO, P.N. Genesis of chromosome numerical mosaicism in higher plants. **Nucleus**, v.39, p.151-175, 1996.

OHRI, D.; ZADOO, S.N. Cytogenetics of cultivated *Bougainvilllea*: IX. Precocious centromere division and origin of polyploid taxa. **Plant Breeding**, v.97, p. 227-231, 1986.

O'MARA, J.G. Cytogenetic stydies on triticale: I. A method for determining the effects of individual *Secale* chromosomes in *Triticum*. **Genetics**, v.25, p.401-408, 1940.

ONG, S.H. Mutation and polyploid. In: RESEARCH INSTITUTE OF MALAYSIA. **RRIM *Hevea* breeding course lecture notes**. Kuala Lumpur, 1980. p.1-6.

PAGLIARINI, M.S. Avaliação da freqüência de quiasmas em milho (*Zea mays* L.) e suas implicações com a capacidade de combinação para a produção de grãos. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 190p. Tese, Doutorado.

PAGLIARINI, M.S. Correlação entre freqüência de quiasmas e capacidade de combinação em linhagens autofecundadas de milho (*Zea mays* L.): uma análise prévia. **Revista Unimar**, v.5, p.37-46, 1983.

PAGLIARINI, M.S.; MIRANDA-FILHO, J.B.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Correlação entre freqüência de quiasmas e capacidade de combinação em linhagens autofecundadas de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 15., Maceió, 1994. **Anais**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1986. p.183-188.

PAGLIARINI, M.S.; TAKAYAMA, S.Y.; FREITAS, P.M.; CARRARO,L.R.; ADAMOWSKI, E.V.; SILVA, N.; BATISTA, L.A.R. Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. **Euphytica**, v.108, p.129-135, 1999.

PARROT, W.A.; SMITH, R.R.; SMITH, M.M. Bilateral sexual tetraploidization in red clover. **Canadian Journal Genetic Cytology**, v.27, p.64-68, 1985.

PATHAK, G.N. Studies in the cytology of cereals. **Journal of Genetics**, v.40, p.437-467, 1940.

PELOQUIN, S.J.; YERK, G.L.; WERNER, J.E.; DARMO, E. Potato breeding with haploids and 2n gametes. **Genome**, v.31, p.1000-1004, 1989.

PHILLIPS, R.L.; SURESH, J. Cytogenetic basis for fertile plants in a maize nuclear male sterility system. **Maydica**, v.42, p.127-131, 1997.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.2934-2938, 1986.

RAO, M.K.; DEVI, K.U.; ARUNDHATI, A. Applications of genic male sterility in plant breeding. **Plant Breeding**, v.105, p.1-25, 1990.

RAYBURN, A.L.; GILL, B.S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. **Journal of Heredity**, v.76, p.78-81, 1985.

RHOADES, M.M.; DEMPSEY, E. Induction of chromosome doubling at meiosis by the elongate gene in maize. **Genetics**, v.54, p.505-522, 1966.

RÖBBELEN, G. Beiträge zur analyse des *Brassica* genoms. **Chromosoma**, v.11, p.205-228, 1960.

RUTISHAUSER, A. **Fortpflanzungsmodus und meiosis apomiktischer blütenpflnzen**. Berlin: Springer-Verlag, 1967.

SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391p.

SINGH, R.J.; RÖBBELEN, G. Giemsa banding technique reveals deletions within rye chromosomes in addition lines. **Z. Ppflanzenzücht**, v.76, p.11-18, 1976.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216p.

SUBRAHMANYAM, N.C.; KASHA, K.J. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. **Chromosoma**, v.42, p.111-125, 1973.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 437p.

TASCHETTO, O. M.; PAGLIARINI, M.S. Description of a new meiotic abnormality in maize. **Maydica**, v.38, p.47-50, 1993.

U, N. Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. **Japanese Journal of Genetics**, v.58, p.33-41, 1935.

WANG, R.R.; BERDAHL, J.D. Meiotic association at metaphase I in diploid, triploid and tetraploid Russian wild rye (*Psatyrostachys juncea*) (Fisch). Nevski). **Cytologia**, v.55, p.639-643, 1990.

WATANABE, K.; PELOQUIN, S.J.; ENDO, M. Genetic significance of mode of polyploidization: somatic doubling or 2n gametes? **Genome**, v.34. p.28-34, 1991.

WEBER,D.F. Monosomic analysis in diploid crop plants. In: SWAMINATHAN, M.S.; GUPTA, P.K.; SINHA, U. (Ed.) **Cytogenetics of crop plants**. Delhi: MacMillan, 1983. p.351-378.

WERNER, J.E.; PELOQUIN, S.J. Frequency and mechanisms of 2n egg formation in haploid *Tuberosum* wild species F_1 hybrids. **American Potato Journal**, v.64, p.641-654, 1987.

WINGE, O. The chromosomes. Their numbers and general importance. **Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire carlsberg**, v.13, p.131-276, 1917.

28

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS NO MELHORAMENTO

MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA[1]
BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA[2]

[1]Lab. de Biologia Celular e Molecular de Plantas, Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.
[2]Lab. de Anatomia Vegetal, Depto. de Ciências Biológicas - USP/ESALQ, C.P. 9 - CEP: 13418-900- Piracicaba, SP.

1. HISTÓRICO DA CULTURA DE TECIDOS

As primeiras técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais surgiram no início do século XX embora alguns conceitos e descobertas importantes de citologia, anatomia e fisiologia de plantas tenham sido estabelecidos anteriormente. Nos textos de Schleiden e Schwann, publicados em 1838 e 1839, sobre a teoria celular, os autores afirmam: "*among the lower plants, any cell can be separated from the plant and continue to grow. Thus, entire plants may consist of cells whose capacity for independent life can be clearly demonstrated...*". Assim, na literatura científica dos séculos XVIII e XIX já está registrado o processo de formação de calo, induzido por ferimento a partir de células do câmbio, floema e partes jovens do xilema, se tem conhecimento sobre *polaridade* de segmentos excisados da planta, como os caulinares, cuja parte superior desenvolve brotos e a inferior calo ou raiz e sobre *totipotência celular*, isto é, de que toda célula é capaz de sofrer divisões e dar origem a um organismo inteiro.

Na década de 20 se iniciam as tentativas de cultivo de células a partir de tecidos meristemáticos em meio salino com adição de glicose e extrato de carne ou outros compostos nitrogenados. White (1934) obteve bons resultados cultivando raízes de tomate, adicionando à cultura extrato de levedura, e percebeu a necessidade das subculturas. Nas duas décadas seguintes se descobre que a adição de certos elementos em quantidades ínfimas (traços) como cobre, manganês e iodo, de vitaminas e agentes quelantes favorece o desenvolvimento *in vitro*. As culturas de meristemas apicais são estabelecidas a partir do trabalho de Ball (1946) que descobre o princípio da micropropagação.

A descoberta de que é possível cultivar tecidos vegetais por um período ilimitado de tempo foi anunciada em 1939 por R.J. Gautheret, a partir da adição ao meio de cultura de ácido indol acético (IAA), uma auxina natural. G. Morel foi pioneiro na micropropagação de orquídeas *in vitro* e também na eliminação de vírus em culturas de meristemas (Gautheret, 1939; Morel, 1963).

A. Blakeslee, um geneticista interessado em cultivar embriões interespecíficos descobriu que a adição da água de coco favorecia o desenvolvimento das culturas. Esta propriedade da água de coco foi evidenciada em culturas de tecidos de cenoura, uma das principais espécies cultivadas *in vitro*. Extratos de frutos, como o de tomate (Nitsch & Nitsch, 1955), mostraram efeitos similares aos da água de coco, ou seja, de intensificar a proliferação celular. Várias substâncias estimuladoras, de efeitos similares, porém diferentes do efeito da auxina, foram descobertas. A essa classe de substâncias deu-se o nome de citocininas.

O etileno, o ácido abscísico (ABA), a zeatina (uma citocinina), o IAA e o ácido giberélico (GA3, uma giberelina) são exemplos de cada uma das classes de fitorreguladores naturais isto é, sintetizados pelas células vegetais e, por isso, ditos endógenos. São compostos pequenos, de fácil transporte de célula a célula e de múltiplos efeitos os quais podem ser modulados pelo ambiente e estado fisiológico da planta. Os receptores que reconhecem os fitorreguladores e seu modo de ação

passaram a ser estudados recentemente (Ulmasov *et al.*, 1999a,b) porém ainda não estão claramente definidos.

Diz-se, portanto, que uma célula quando devidamente estimulada por ação dos fitorreguladores exógenos e/ou endógenos torna-se competente para manifestar sua totipotência. Skoog (1957) demonstrou o efeito isolado e combinado destes fitorreguladores em discos foliares de tabaco, portanto, em tecidos diferenciados. Estes experimentos clássicos mostraram que a adição combinada de auxinas e citocininas levam à formação de calo e regeneração de parte aérea enquanto, isoladamente, a auxina leva ao desenvolvimento de raízes adventícias e a citocinina estimula a formação de brotos. Este padrão de resposta morfogênica não pode ser generalizado, porém essa descoberta promoveu um grande avanço na cultura de tecidos vegetais nas décadas seguintes.

2. A MICROPROPAGAÇÃO COMO TECNOLOGIA

Os tecidos meristemáticos são as principais fontes de explante usadas na clonagem de plantas *in vitro* (*klón*, do grego, broto, brotação). Os ápices caulinares são bastante utilizados e devem sofrer desinfestação e esterilização antes de serem introduzidos em cultura. A desinfestação do explante é feita com detergentes e fungicidas, o qual, em seguida, é tratado com soluções à base de cloro e etanol 70% (v/v). Uma pré-desinfestação pode também ser realizada na planta da qual o explante vai ser excisado.

Após a esterilização, o tecido meristemático deve sofrer múltipla brotação, normalmente induzida por fitorreguladores. Nesta condição, pode-se manter a cultura por vários meses, com transferências mensais para meio fresco. Ainda *in vitro*, os brotos devem ser individualizados (ou não, dependendo do caso) para sofrer enraizamento. Nesta etapa, geralmente, é feita a retirada do fitorregulador e a concentração do meio basal (salino) é reduzida. Há espécies que exigem hormônios para a indução do enraizamento, como o ácido naftalenoacético (NAA) e o ácido indolbutírico (IBA).

A próxima etapa é conhecida por *aclimatação*. As plantas são retiradas do frasco, as raízes devem ficar livres dos resíduos de meio de cultura, por lavagem em água, e as plantas transferidas para a casa de vegetação em suportes contendo substrato autoclavado. Inicialmente, se mantém a umidade, colocando sacos plásticos sobre as mudas as quais sofrem pulverização diária com água. Gradualmente, as plantas passam a adquirir vigor tornando-se aptas para o plantio.

As áreas mais favorecidas por esta tecnologia são a florestal, e de horticultura, fruticultura e floricultura. Em um curto espaço de tempo é possível se produzir milhares de mudas. No Brasil, por ex., a área plantada de banana varia de 50 até 500 ha por produtor para médios e grandes produtores: a ocupação da área pelo método tradicional é lenta de tal forma que o investimento de US$ 0.50 por muda oriunda de cultura de meristemas é compensador. O custo de produção, dependendo do laboratório e da demanda, está em torno de US$ 0.30 por muda. Um meristema de banana fornece de 800 a 1000 mudas[1].

Além do curto tempo e da necessidade de um pequeno espaço para a sua produção, as mudas de cultura têm a vantagem de serem sadias uma vez que os explantes desinfectados estão livres de patógenos (vírus, bactérias, micoplasmas e fungos). Esse procedimento recebe o nome de *limpeza clonal*.

[1]MATSUMOTO, K. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Comunicação pessoal, 1998

Nas várias espécies que se têm usado a micropropagação como tecnologia de produção de mudas, têm se observado o aparecimento de indivíduos *off type*, isto é fora do padrão. Em banana, por ex., o nanismo é comum. Estas aberrações geradas *in vitro* têm sido objeto de vários estudos. Ao que tudo indica, o número de transferências (repicagens) não deve ultrapassar cinco, há genótipos mais suscetíveis às alterações causadas pelo estresse *in vitro* e por certos fitorreguladores sintéticos, como o 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), que provocam o aparecimento de *off types*.

No Brasil, estudos teóricos sobre micropropagação de orquídeas têm sido conduzidos por Kerbauy e colaboradores, na Universidade de São Paulo (Kerbauy, 1984). Mudas produzidas *in vitro* de várias ornamentais (violetas, orquídeas, crisântemos etc), banana, morango, eucalipto, cana-de-açúcar, entre outras espécies são comercializadas no Brasil. No caso da cana-de-açúcar, cerca da metade das mudas plantadas no Estado de São Paulo é oriunda da cultura de meristemas.

Outros procedimentos experimentais podem ser usados para a geração de mudas *in vitro* a partir de explantes diferenciados, estimulados a formar meristemóides os quais se desenvolvem dando origem a brotos ou a embriões somáticos. Esses processos ditos, respectivamente, organogênese e embriogênese somática, serão caracterizados posteriormente.

3. CONSERVAÇÃO *In vitro*

A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleções de indivíduos, sementes ou partes da planta sob diferentes condições: no campo ou em casas de vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina ou criopreservadas. As alternativas de conservação *in vitro* (em meio de cultura ou por criopreservação) são usadas no caso de sementes recalcitrantes, plantas de propagação vegetativa, de certas espécies arbóreas, para eliminação de patógenos ou para facilitar o transporte de germoplasma (Grout, 1995).

Coleções de plantas podem ser estabelecidas a partir da cultura de ápices caulinares, por ex., sob temperatura de 25 a 28°C, sendo que este procedimento exige subculturas mensais só se prestando, portanto, para pequenas coleções. Normalmente o que se faz é baixar a temperatura da sala para 15 até 20°C de tal forma a obter crescimento mínimo *in vitro* e reduzir as trocas de meio de cultura para uma ao ano. Dessa forma, por ex., são conservados cerca de 1.600 acessos de mandioca na Embrapa Mandioca e Fruticultura/CNPMF, Bahia.

Criopreservação é uma técnica que permite manter o germoplasma por vários anos (*long term storage*) sob temperatura ultra-reduzida, usualmente -196°C. Nesta temperatura, a movimentação de moléculas é super reduzida e não há fase líquida na célula. Os riscos de perda do material biológico são menores e os custos mais baixos em relação aos da conservação em meio de cultura.

Todos os procedimentos de criopreservação têm uma etapa em comum que é preparar a parte vegetal a ser conservada para a imersão em nitrogênio líquido (LN). É uma etapa de desidratação da célula para evitar a formação de cristais de gelo no seu interior, o que é fatal. A desidratação pode ser induzida por cristalização do meio externo durante uma fase lenta de resfriamento até atingir - 30 a - 40°C. Transferindo-se

rapidamente o material vegetal para o LN, obtém-se a vitrificação da célula, isto é, os componentes celulares solidificam, formando *um vidro*, sem haver formação de gelo.

Outra alternativa é submeter o material a agentes crioprotetores (à base de DMSO, glicerol, sacarose ou etileno glicol), primeiramente em soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula, depois em soluções concentradas de crioprotetores para promover a vitrificação e então transferir os frascos, no caso de suspensões celulares, ápices caulinares ou embriões para o LN.

Em algumas situações a imersão em LN pode ser direta, desde que os ápices caulinares sejam pré-tratados em solução osmótica de concentração moderada uma vez que a desidratação é necessária antes de haver a vitrificação.

É possível também criopreservar ápices, embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio (3 a 5 mm). Esta técnica é conhecida por *encapsulação*. As cápsulas são mantidas em meio de cultura contendo 0,5 a 0,7 M de sacarose sob agitação, *overnight* (etapa de desidratação) sendo então lavadas e colocadas em ampolas que serão mantidas em LN.

Espécies terrestres de orquídeas têm sido conservadas no Japão por criopreservação (Ishikawa *et al.*, 1997), a partir de embriões zigóticos cobertos com uma mistura de glicerol e sacarose a 25°C, e desidratados em solução de vitrificação altamente concentrada (PVS2) por 3 h a 0°C, antes da imersão em LN.

Um parâmetro importante deve ser definido para cada tipo de técnica: é o *storage time*. É o tempo que um material pode ser conservado de tal forma que, quando avaliado, mostre pelo menos 60 % de sobrevivência. Cada método só pode ser recomendado quando a sobrevivência da coleção for avaliada.

Coleções de germoplasma tropicais têm sido conservadas em meio de cultura ou criopreservadas na Embrapa, principalmente no Cenargen, Brasília, Brasil; no CIRAD, em Montpellier, França; no INIBAP, em Leuven, Bélgica, e em instituições do Japão, Itália etc.

O Departamento de Genética da ESALQ dispõe de uma pequena coleção *in vitro* de *Passiflora* na qual há cerca de 20 espécies silvestres, acessos comerciais de maracujá azedo e de híbridos somáticos, obtidos por fusão de protoplastos. Ressalte-se também, o trabalho que vem sendo feito pelo grupo da Dra. E. Mansur (UERJ) sobre criopreservação de espécies nativas de *Arachis*.

4. ANATOMIA DAS VIAS DE REGENERAÇÃO *In vitro*

A regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro* de células e tecidos pode ocorrer pela formação de gemas caulinares (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática).

A organização do meristema apical caulinar *in vivo* nas plantas superiores envolve a participação de grupos de células iniciais apicais e, portanto, a origem é sempre multicelular. Por outro lado, os embriões zigóticos sempre originam-se de uma única célula, ou seja, da célula-ovo fertilizada (Esau, 1977). Porém, nas condições *in vitro*, o critério origem não pode ser utilizado para distinguir as duas vias de regeneração (Medeiros, 1997).

Haccius (1978) definiu o embrião somático como um novo indivíduo surgindo de uma única célula. Porém, na embriogênese somática indireta,

freqüentemente ocorre a formação de um conjunto compacto de células embriogênicas, o complexo celular *pré-embriônico*. A partir deste complexo um ou mais embrióides são originados. Também, a embriogênese somática direta pode ser multicelular, por clivagem poliembriônica ou, os embriões somáticos podem surgir a partir de células únicas superficiais (Williams & Maheswaran, 1986). Segundo estes autores, a questão da origem uni ou multicelular para os embriões somáticos está diretamente relacionada ao comportamento coordenado das células vizinhas como um grupo morfogenético. Além disto, tem sido verificado que as duas origens podem ocorrer numa mesma condição de cultura *in vitro*.

A organogênese da parte aérea *in vitro* também pode ser unicelular ou multicelular. Embora existam mais relatos sobre a origem multicelular, a formação de gemas adventícias a partir de células corticais únicas vem sendo descrita em algumas espécies (Villalobos *et al.*, 1985; Klimaszewska & Keller, 1987; Creemers-Molenaar *et al.*, 1994; Arai *et al.*, 1997). A organogênese *in vitro* pode também ocorrer diretamente a partir de células do explante original ou, indiretamente, via formação de calos.

Portanto, as duas vias de regeneração *in vitro* podem ser identificadas apenas através das diferenças anatômicas existentes entre as gemas caulinares e os embriões somáticos. Enquanto a gema é uma estrutura monopolar que desenvolve ampla conexão vascular com o tecido do explante, os embriões somáticos são estruturas bipolares e não conectadas ao explante pela vascularização (Haccius, 1978).

Os estudos histológicos são importantes não apenas para a confirmação da via de regeneração *in vitro*, mas também para a determinação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos ou as gemas caulinares. Estas informações são de grande interesse, especialmente em sistemas de transferência de genes (Matsumoto *et al.*, 1996). A baixa eficiência do processo de transformação tem sido atribuida ao fato da regeneração de plantas ocorrer a partir de células meristemáticas que, por estarem localizadas muito além da superfície do explante, não são acessíveis à agrobactéria (Mukhopadhyay *et al.*, 1992), ou então, não são fisiologicamente competentes para a transformação (Colby *et al.*, 1991; Laparra *et al.*, 1995). Células competentes para a transformação genética via *Agrobacterium* são células pequenas, isodiamétricas com paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente. Além disto, o modo como a planta regenera pode interferir na capacidade de gerar plantas transgênicas (Sangwan *et al.*, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 1992).

4.1 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA ORGANOGÊNESE *In vitro*

A organogênese *in vitro* é considerada indireta quando ocorre uma fase intermediária de calo como em *Bauhinia forficata* (Figura 1) e em *Stylosanthes guianensis* (Figura 2) (Appezzato-da-Glória, 1998). Nessas duas espécies verifica-se um aumento no tamanho das células antes que a atividade mitótica inicie (Figura 1 A-B e 2A). O aumento do volume citoplasmático anterior à atividade mitótica vem sendo registrado em várias espécies e implica indubitavelmente no alongamento celular incluindo um aumento na síntese de proteínas (Pihakashi-Maunsbach *et al.*, 1993).

A análise anatômica dos calos em *B. forficata* revela características em comum com as encontradas em *Cichorium endivia* e *Petunia inflata* (Vasil & Hildebrandt,

1966; Handro *et al.*, 1973). Nestas três espécies, os calos são constituídos de células arranjadas compactamente; conforme o crescimento progride, ao longo da periferia do calo são organizadas faixas marginais de tecido meristemático nas quais elementos traqueais são diferenciados. Em *B. forficata*, a conexão vascular das gemas expandidas com o calo sempre é estabelecida ao nível da faixa meristemática (Figura 1E, F) porém, as divisões responsáveis pela formação das gemas caulinares ocorrem por fora desta faixa meristemática (Figura 1C). Em *Petunia inflata*, as gemas caulinares são formadas a partir de divisões celulares deste meristema. A formação indireta de gemas caulinares a partir de áreas meristemáticas situadas na superfície de calos vem sendo relatada em várias espécies a partir de explantes e condições de cultura distintas (Vasil & Hildebrandt, 1966; Handro *et al.*, 1973; Kelkar *et al.*, 1996; Appezzato-da-Glória, 1998). Os meristemóides, constituídos de células pequenas com citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 1C, seta), indicam o início da diferenciação das gemas caulinares, sendo possível verificar a presença de pequenas protrusões de células na superfície do calo (Figura 1D, setas).

Em todos os registros da literatura referentes à organogênese direta ou indireta em espécies de leguminosas, a origem das gemas caulinares é sempre superficial e o padrão de desenvolvimento das mesmas muito similar. Em espécies de leguminosas, o único relato referente à origem interna das gemas caulinares, foi realizado por Dornelas *et al.* (1992) em *Stylosanthes scabra*. Segundo os autores, a formação de gemas caulinares ocorre a partir de estruturas nodulares vasculares situadas no interior do calo. Porém, as análises realizadas em *Stylosanthes guianensis* mostram claramente que os meristemóides (Figura 2 C-D) dão origem às estruturas foliares e, na base

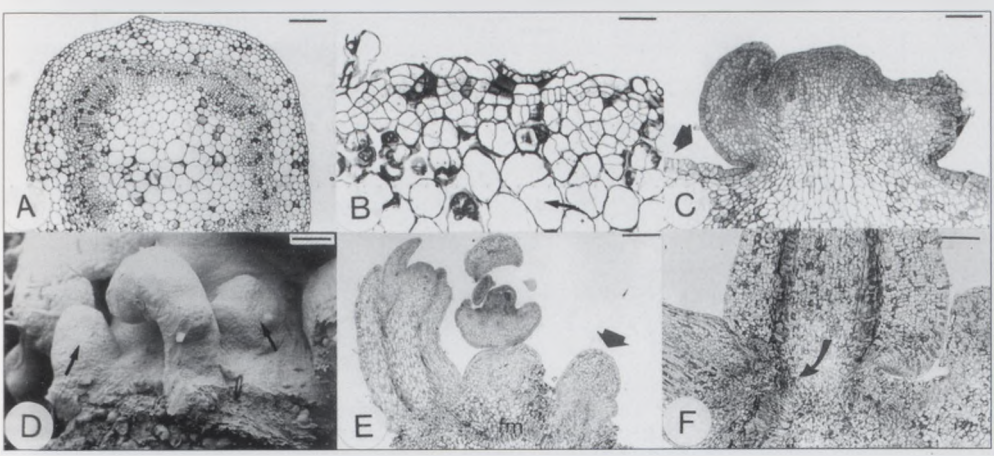


FIGURA 1. Corte transversal do hipocótilo de *Bauhinia forficata* Link utilizado como fonte de explante (A) e após uma semana em meio MS/2 contendo 4,0 mg L^{-1} de BAP (B). As alterações neste período foram marcadas pela hipertrofia seguida de hiperplasia das células do parênquima cortical (B). Calo de *Bauhinia forficata* Link aos 42 dias de cultura (após uma semana de subcultivo). Observa-se a presença de meristemóides e gemas em diferentes fases de desenvolvimento (C-E). Os primórdios de gemas caulinares são formados na região periférica dos calos e estabelecem conexão vascular com o calo pela faixa meristemática (F, seta). A, C (barra = 204 µm); B (barra = 102 µm); D (barra = 100 µm); E, F (barra = 552 µm). fm = faixa meristemática.

destas estruturas foliares são organizados outros meristemóides (Figura 3, **m**) que dão origem às gemas caulinares nas camadas periféricas do calo (Figura 4). As análises histológicas da organogênese *in vitro* em *Glycine max* (Alves, 1999) revelam que as gemas adventícias possuem origem superficial a partir da desdiferenciação de células epidérmicas e subepidérmicas (Figura 5A) e que, durante o desenvolvimento das gemas, ocorre a formação de um nódulo vascular próximo à sua base através do qual se estabelece a conexão vascular com o tecido de origem (Figura 5 B-C, setas). Acredita-se que as gemas de *Stylosanthes scabra,* à exemplo de outras espécies, já deviam estar mais desenvolvidas e conectadas ao calo por meio dos nódulos vasculares sem necessariamente terem surgido dos mesmos.

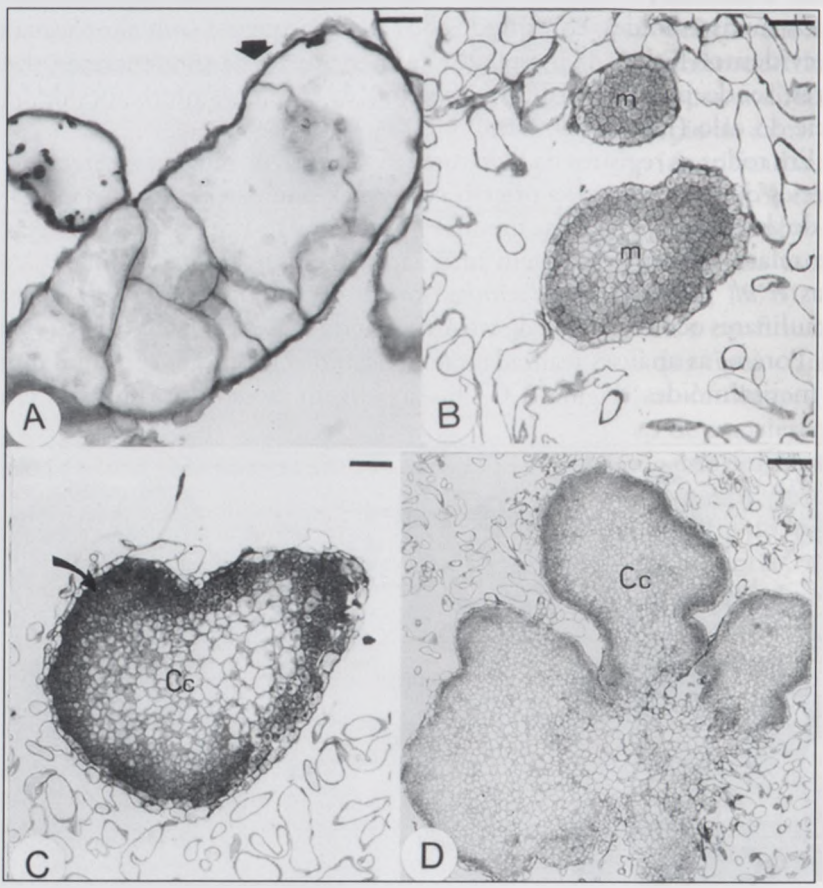


FIGURA 2. *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Calo formado a partir do explante cotiledonar, após 30 dias em meio MS suplementado com 2,0 mg L^{-1} de BAP. A. Observam-se nove células-filhas de tamanhos distintos ainda envolvidas pela parede da célula-mãe que é mais espessa. A seta indica uma das divisões onde a placa celular forma-se de maneira centrípeta (barra = 19 μm). B. Meristemóides (m) formados na periferia dos setores compactos do calo (barra = 74 μm). C. Meristemóide mais desenvolvido apresentando, na região periférica, células pequenas justapostas, com citoplasma denso, núcleo e nucléolo evidentes (seta). Em contraste, as células centrais (Cc) são maiores, mais vacuolizadas e deixam espaços intercelulares entre si (barra = 74 μm). D. Crescimento vertical desses meristemóides levando à formação de estruturas semelhantes às folhas (barra = 199 μm).

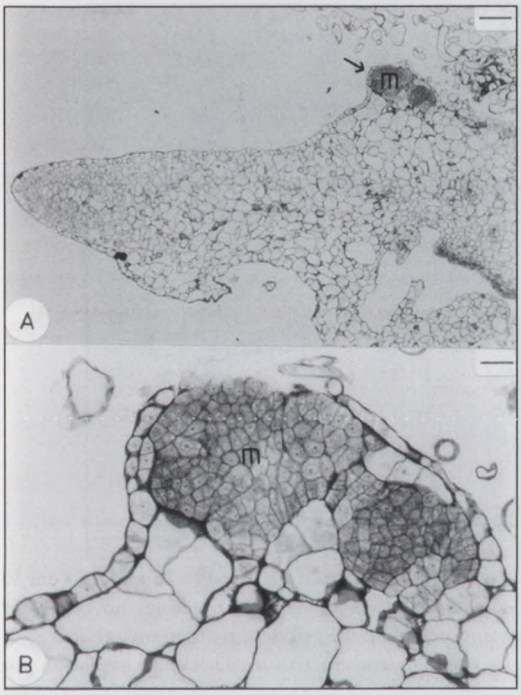


FIGURA 3. *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. A. Seção transversal da lâmina foliar (f) resultante do crescimento vertical dos meristemóides mostrados na figura 2D, cujas células subepidérmicas da região basal, entram em divisão ativa formando novas áreas meristemáticas (seta) (barra = 199 μm). B. Detalhe do meristemóide (m) indicado em A (barra = 37 μm).

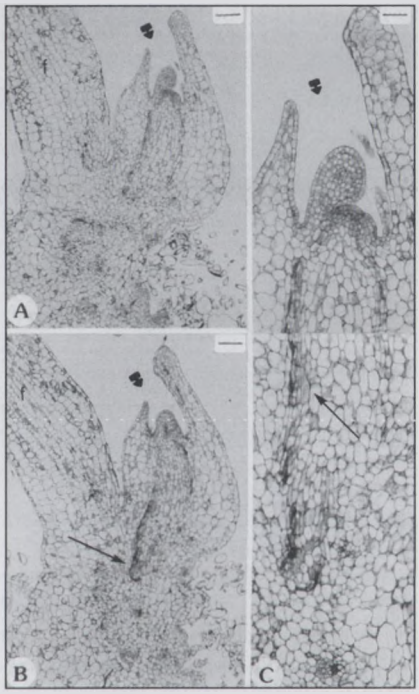


FIGURA 4. *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. A e B. São apresentados dois planos de corte mostrando uma gema caulinar (setas) estreitamente associada à região basal de uma lâmina foliar (f), apresentando ampla ligação com o calo (barra = 199 μm). C. Detalhe da gema caulinar evidenciando a conexão vascular com o calo (seta) (barra = 74 μm).

Em várias espécies, as gemas caulinares formam-se nas camadas superficiais do calo enquanto a organização das raízes, ocorre em áreas meristemáticas diferenciadas em regiões mais internas, profundas do calo (Vasil & Hildebrandt, 1966; Detrez *et al.*, 1988; Araújo *et al.*, 1997). Em *Passiflora edulis*, os meristemóides responsáveis pela origem das gemas caulinares formam-se nas camadas subepidérmicas na lâmina foliar enquanto a formação das raízes adventícias ocorre a partir de divisões nas proximidades do tecido vascular na nervura central e ao longo da lâmina foliar (Appezzato- da-Glória *et al.*, 1999). Estes relatos vêm reforçar a idéia de que a formação das gemas caulinares *in vitro* tende a ocorrer nas camadas superficiais do calo (se a via for indireta) ou do tecido do explante (se a via for direta).

O processo organogênico *in vitro* pode ser assincrônico ou sincrônico. O processo assincrônico pode ser devido à aquisição de competência e determinação pelas células em estágios diferenciados do processo organogênico, seja este direto ou indireto.

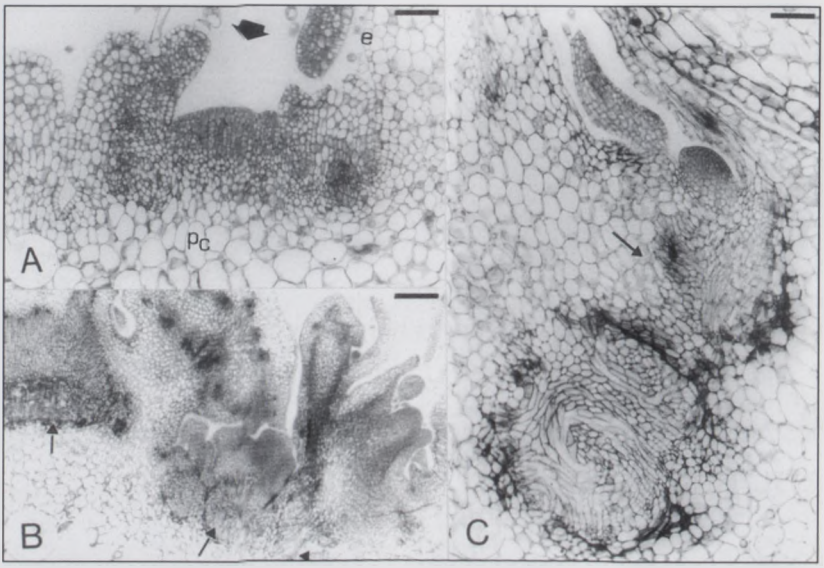


FIGURA 5. *Glycine max* (L.) Merrill. Seções transversais do segmento nodal, após a inoculação em ½ MS, suplementado com 0,56 mg L^{-1} de BAP. A e B mostrando o setor intercotiledonar no 10º e 15º dias de cultura, respectivamente. A. A seta indica um meristemóide em desenvolvimento (barra = 74 µm). Em B, verificam-se várias gemas caulinares apresentando conexão vascular com o explante, por meio de nódulos vasculares que são formados no tecido do nó cotiledonar nas proximidades da base das gemas (setas). (barra = 199 µm). e = epiderme; pc = parênquima cortical. C. Seção longitudinal do segmento nodal mostrando o setor intracotiledonar no 15º dia de cultura. A gema caulinar adventícia apresenta conexão vascular com o explante poe meio de nódulo vascular formado no tecido do nó cotiledonar nas proximidades da base da gema (seta). (barra = 74 µm).

4.2 ANÁLISES ULTRA-ESTRUTURAIS DA ORGANOGÊNESE *In vitro*

A fim de compreender o processo da organogênese e obter uma visão clara da seqüência das fases iniciais do desenvolvimento dos meristemóides é necessário observar as alterações que ocorrem ao nível subcelular e, desta forma, correlacionar estas mudanças com as alterações bioquímicas.

Duas características ultra-estruturais consideradas associadas à competência embriogênica e verificadas no processo organogênico em *Bauhinia forficata* e em *Glycine max* : retículo endoplasmático rugoso (RER) em arranjos concêntricos e plastídios contendo amido (Figura 6 A-B), reforçam as observações de que, em ambos os processos de regeneração, ocorre uma expressão da alta capacidade de síntese dos tecidos associada à uma reorganização do padrão de crescimento durante a indução da morfogênese somática. A presença de grãos de amido nos plastídios das células em divisão dos meristemóides parece ser uma característica comum ao processo organogenético e pode estar associada ao alto requerimento nutricional das populações de células (Villalobos *et al.*, 1985; Arai *et al.*, 1997; Appezzato-da-Glória, 1998).

Em *G. max* e em *B. forficata* os meristemóides não se originam de células meristemáticas típicas e sim de células altamente vacuolizadas que sofrem divisões desiguais formando células-filhas de tamanhos distintos (Figura 6A). Essas observações reforçam a idéia proposta por Villalobos *et al.* (1985) de que o desenvolvimento organizado *in vitro* inicia-se com alterações numa célula individual que torna-se ativada.

Em *G. max* e em *B. forficata* as paredes entre as células-filhas são extremamente delgadas quando comparadas à parede da célula-mãe (Figura 6A). Tal característica já havia sido relatada no processo organogenético em *Pinus radiata* (Villalobos *et al.*, 1985) e no processo embriogênico em *Citrus sinensis* (Button *et al.*, 1974). Em *G. max* as conexões citoplasmáticas, via plasmodesmos, são numerosas entre as células-filhas indicando intensa interação via simplasto (Figura 6C, seta) como verificado entre as células da região apical em embriões somáticos de *Zea mays* (Fransz & Schel, 1991).

Comparando-se o núcleo das células dos meristemóides de *Bauhinia forficata* e de *Glycine max* verifica-se que, na primeira espécie, o envelope nuclear possui um número maior de poros os quais são conspícuos. Os poros nucleares são estruturas dinâmicas que mudam dependendo da necessidade do transporte nucleo-citoplasmático sendo que, em sistemas vegetais e animais, o número de poros nucleares é diretamente proporcional à produção e transporte de proteínas. Portanto, sugere-se que a reprogramação celular durante o processo organogenético indireto, como observado em *B. forficata*, exija uma atividade transcricional maior do que aquela requerida pelo processo direto, verificado em *G. max* (Appezzato-da-Glória, 1998).

A presença de cloroplastos e mitocôndrias em divisão (Figura 6 D) nas células dos meristemóides assegura a distribuição parelha destas organelas entre as células-filhas durante a citocinese. As mitocôndrias ocorrem em grande número e são providas de matriz elétron-densa e de um sistema de cristas bem desenvolvido, os dictiossomos são hipersecretores e parecem estar envolvidos na produção de material de parede celular (Pihakashi-Maunsbach *et al.*, 1993). Estas características vêm sendo descritas em sistemas embriogênicos, como sendo associadas à aquisição de uma atividade metabólica maior (Canhoto *et al.*, 1996).

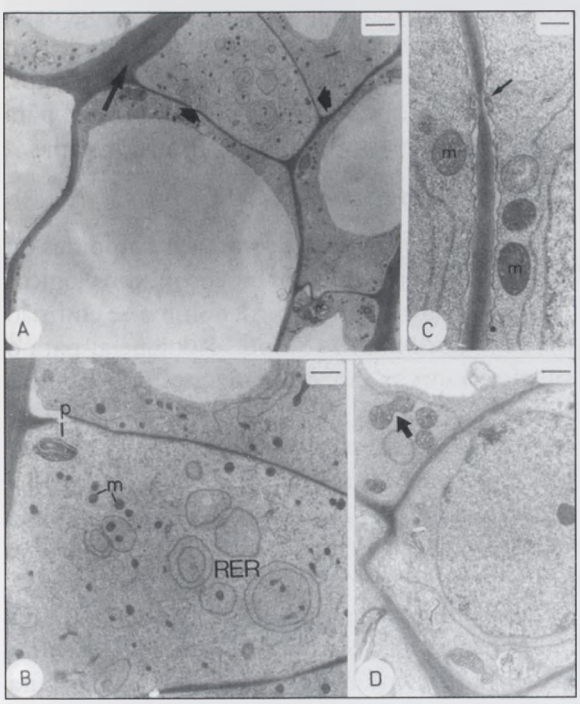


FIGURA 6. *Glycine max* (L.) Merrill. Células subepidérmicas de segmentos nodais após 10 dias de cultivo em ½ MS/2, suplementado com 0,56 mg L^{-1} de BAP. As células dividem-se para formar os meristemóides. A. As paredes entre as células-filhas são relativamente finas (setas curtas) quando comparadas com a parede da célula-mãe (seta longa) (barra = 4,0 µm). B. Detalhe da célula indicada na figura anterior, na qual mitocôndrias (m), plastídios (P) e retículo endoplasmático rugoso (RER) em arranjo concêntrico estão presentes em abundância (barra = 1,7 µm). C. Detalhe das mitocôndrias providas de matriz elétron-densa e de um sistema de cristas bem desenvolvido (barra = 0,4 µm). D. A seta indica uma mitocôndria em divisão (barra = 0,7 µm). Fonte: Appezzato-da-Glória & Machado, 2001.

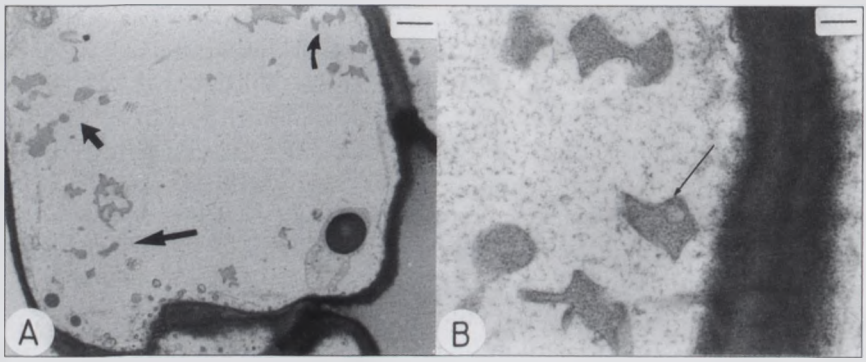


FIGURA 7. *Bauhinia forficata* Link. aos 42 dias de cultura em ½ MS contendo 4,0 mg L^{-1} de BAP (B). A. Em uma célula recém-dividida, verificam-se fragmentos de cromatina interfásica dispersos no citoplasma (setas, barra = 1,3 μm). B. Fragmentos parcialmente envolvidos por uma dupla membrana (seta) (barra = 0,2 μm). Fonte: Appezzato-da-Glória & Machado, 2001.

Em *Bauhinia forficata*, a característica ultra-estrutural mais marcante nas células recém-divididas dos meristemóides é a ocorrência de fragmentos de cromatina interfásica dispersos no citoplasma (Figura 7). Estes fragmentos podem estar parcialmente envolvidos por uma dupla membrana (Figura 7B). Em algumas células ocorre a desintegração do envelope nuclear sem que haja a condensação simultânea de cromatina. O aparecimento de fragmentos de cromatina interfásica dispersos no citoplasma e a desintegração do envelope nuclear são indicativos da ocorrência de amitose. A presença de dupla membrana envolvendo tais fragmentos sugere que esteja ocorrendo a reorganização do envelope nuclear. Conforme salientado por Bayliss (1980) a fragmentação nuclear (amitose) que ocorre nas fases iniciais da calogênese, seguida pela mitose, pode ser uma fonte importante de variação cromossômica em cultura de tecidos. Se a variação cromossômica, causada por processos amitóticos, puder gerar variação somaclonal, a via organogenética direta seria mais indicada para a obtenção de brotos transgênicos, regenerados a partir das células transformadas.

4.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides se desenvolvem em plantas diferenciadas passando por estágios embriológicos distintos sem que ocorra a fusão de gametas. O embrião formado denomina-se embrião somático. A embriogênese somática *in vitro* tornou-se um modelo potencial para o estudo de eventos regulatórios e morfogenéticos em embriogênese de plantas (Zimmerman, 1993).

Existem dois tipos de processos que podem produzir embriões somáticos: *embriogênese direta*, na qual os embriões se originam diretamente do explante, sem a proliferação de calos (Figura 8) e *embriogênese indireta* (Figura 9A), na qual o calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões somáticos.

A embriogênese somática direta é precedida por células pré-embriogênicas determinadas (PEDC's), requerendo somente reguladores de crescimento ou condições favoráveis para o início da divisão celular e a expressão da embriogênese. Por outro lado, o termo célula embriogênica determinada induzida (IEDC's) é usado para

identificar células capazes de adquirir o potencial embriogênico durante o período de cultivo. Neste caso, a embriogênese indireta requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e o desenvolvimento do estado embriogenicamente determinado.

A exposição a hormônios é um dos mecanismos que influenciam a resposta embriogênica (Parrott *et al.*, 1995). A formação de embriões somáticos de *Glycine max* em resposta às auxinas ocorre diretamente sem uma fase de calo (Figura 8 A) (Fernando, 1999). De maneira similar, estudos histológicos da embriogênese somática de *Trifolium repens* obtida a partir de embriões zigóticos imaturos cultivados na presença de 0,05 mg L^{-1} de BAP demonstram que células da epiderme do hipocótilo proliferam produzindo embriões somáticos diretamente, sem a intervenção de uma fase de calo (Maheswaran & Williams, 1985). Entretanto, em uma mesma cultura, é possível verificar tanto embriogênese somática direta como indireta. Em *Carica papaya* L. (Figura 10), utilizando-se 2,0 mg L^{-1} de 2,4-D, ocorre a formação de embriões somáticos diretamente a partir de células únicas da epiderme hipocotiledonar do explante (Figura 10 C) e indiretamente a partir de células superficiais de complexos pré-embriônicos (Figura 10 B e E) presentes nas camadas periféricas e internas do calo (Fernando *et al.*, 2000). Também em *Medicago sativa* L. a origem dos embriões somáticos induzidos por 2,4-D e cinetina ocorre a partir de células epidérmicas únicas de cotilédones, hipocótilos e raízes de plântulas induzidas bem como a partir de calos friáveis.

A produção direta de embriões somáticos a partir de células superficiais, observada em *Trifolium repens*, *Feijoa sellowiana* e em *Carica papaya* (Figura 10 A,C), ocorre somente quando a epiderme do embrião torna-se destacada do tecido subjacente mas as células ainda possuem aspecto meristemático.

Estudos realizados por Liu *et al.* (1992) em *Glycine max* indicam que a origem de embriões somáticos ou tecidos embriogênicos pode ser determinada pela concentração de 2,4-D aplicada ao meio de indução, assim como pelas diferentes fontes doadoras de explantes. Os autores observam que, embriões somáticos formados a partir de explantes embrionários de origem somática cultivados na presença de 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D, têm origem unicelular a partir de células epidérmicas sem a intervenção de uma fase de calo. Por outro lado, Hartweck *et al.* (1988) e Fernando (1999), utilizando cotilédones de embriões zigóticos imaturos como explantes sob a concentração de 25,0 mg L^{-1} e 40,0 mg L^{-1} de 2,4-D, respectivamente, descrevem a formação multicelular dos embriões somáticos (Figura 8A). Similarmente, Dornelas

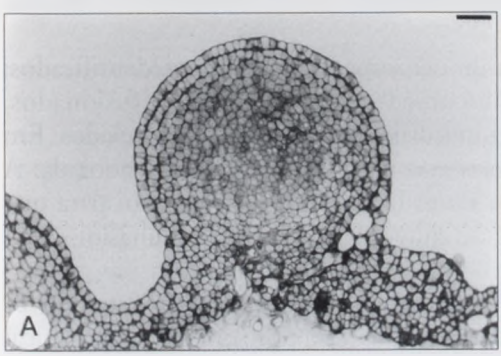


FIGURA 8. *Glycine max* (L.) Merrill. A. Explante cotiledonar obtido a partir de embrião zigótico imaturo de 'Williams 82' aos 8 dias de inoculação em meio MSB contendo 0,5% de carvão ativado, 40,0 mg L^{-1} 2,4-D. Observa-se a origem multicelular e direta de um embrião somático pré-globular a partir de divisões celulares nas camadas subepidérmicas do mesofilo cotiledonar (barra = 102 µm).

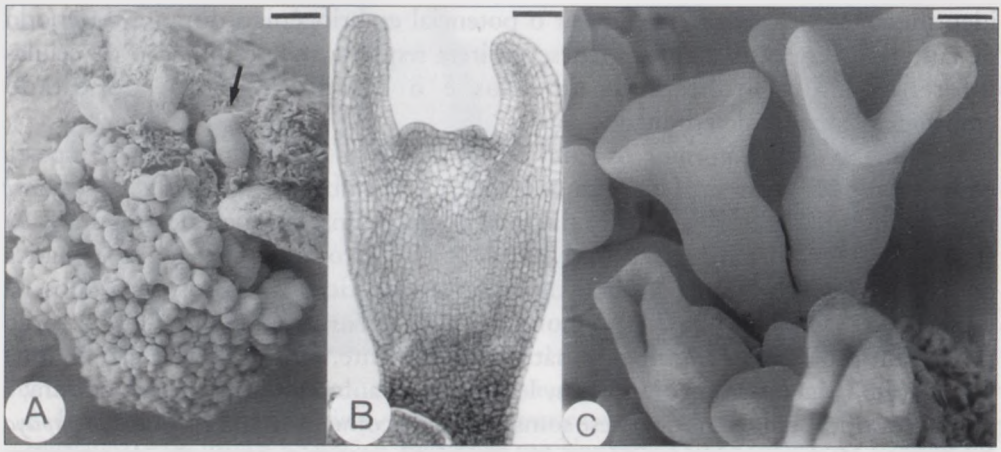


FIGURA 9. Eletromicrografia de varredura do calo (A, barra = 1700 µm) e de embriões somáticos (C) de *Carica papaya* L., após 56 dias de cultura em MS contendo 2,0 mg L^{-1} 2,4-D. B. Corte longitudinal de um embrião somático similar ao indicado pela seta em A (barra = 270 µm). C. Embriões somáticos exibindo anomalias na estrutura cotiledonar (barra = 500 µm).

et al. (1992) sugerem uma origem multicelular dos embriões somáticos de *Stylosanthes scabra* a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio de cultura contendo 5,0 mg L^{-1} de 2,4-D.

Tendo em vista que as auxinas estão relacionadas com a polaridade das células embriogênicas, o transporte polar das auxinas desempenha um importante papel na formação dos cotilédones durante o desenvolvimento dos embriões (Liu *et al.*, 1993). A interferência nesse transporte ocasiona deficiências na transição da simetria axial para a bilateral (Figura 9), resultando na formação de embriões com cotilédones fusionados (Figura 9C).

A fonte de auxina pode afetar a freqüência e a morfologia dos embriões somáticos havendo uma maior diversidade morfológica de embriões em culturas induzidas com 2,4-D. Por exemplo, em *Carya illinoinensis* a indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos em meio de cultura suplementado com 2,0; 6,0 e 12,0 mg L^{-1} de NAA ou 2,4-D, resulta na formação de embriões somáticos que diferem quanto ao ápice caulinar e a morfologia dos cotilédones. Em culturas induzidas com NAA, 34-41% dos embriões somáticos apresentam bipolaridade e ápice caulinar e cotilédones bem definidos, porém culturas induzidas com 2,4-D apresentam 69-84% dos embriões com ápice caulinar reduzido ou ausente (Rodriguez & Wetzstein, 1994).

Diferentes tipos morfológicos de embriões somáticos podem ser identificados: monocotiledonares, dicotiledonares, multicotiledonares, cotilédones fusionados, trombeta, cotilédone vestigial associado a hipocótilo longo e embriões fasciados. Em soja, mamão (Figura 9C) e *Cicer arientinum* essa classificação tem sido adotada. A ausência de um meristema apical caulinar é um fator vital que contribui para que embriões aberrantes percam a capacidade de conversão em plantas (Suhasini *et al.*, 1996; Fernando, 1999).

Morfologias divergentes também têm sido descritas *Arachis* (Wetzstein & Baker, 1993): embriões somáticos com formato trombeta apresentam região apical

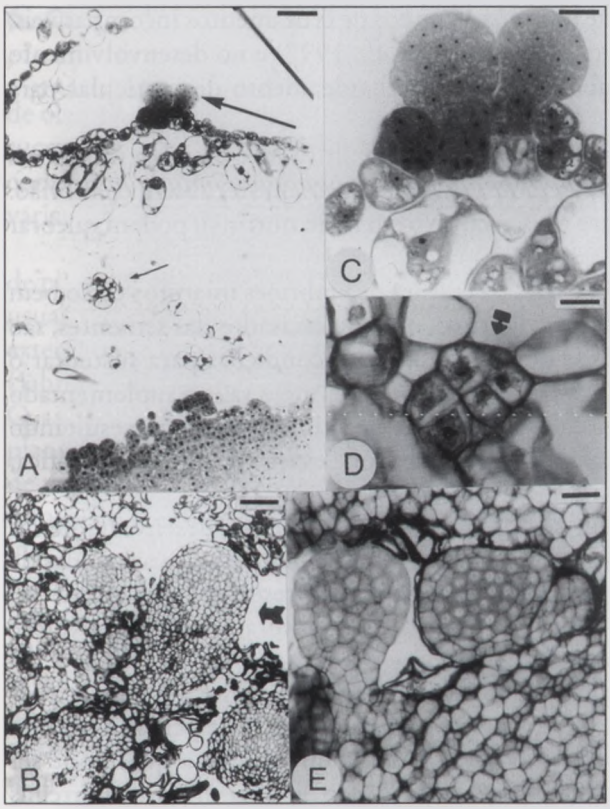


FIGURA 10. *Carica papaya* L. A. Corte longitudinal do eixo embrionário mostrando a epiderme hipocotiledonar do explante e regiões subjacentes no 18° dia de cultura em meio MS contendo 2,0 mg L^{-1} 2,4 - D (barra = 270 µm). C. Detalhe das estruturas indicadas pela seta maior em A, verifica-se a origem unicelular e direta de dois embriões somáticos globulares (barra = 26 µm); B, D e E. Cortes transversais do calo no 40° e 49° dias de cultura. Observam-se vários complexos pré-embriônicos (B) formados a partir de divisões de células (D) do padrão indicado pela seta menor em A e a formação dos embriões somáticos a partir das células da superfície destes complexos (E). B (barra = 100 µm).D (barra = 26 µm); E (barra = 30 µm). (Adaptado de Fernando *et al.* 2000).

caulinar pouco definida em que as células mitóticas estão restritas a poucas camadas sem uma área apical delimitada e os embriões fusionados exibem múltiplas áreas meristemáticas. Estudos recentes realizados por Passos *et al.* (1999) revelaram a formação de embriões somáticos gigantes em *Vitis* spp. Estes embriões apresentaram cotilédones múltiplos e ausência de um meristema apical caulinar.

A assincronia do processo de embriogênese somática pode ser observada para diferentes culturas (Dornelas *et al.*, 1992; Rodriguez & Wetzstein, 1994). Em *Vitis* spp. (Passos *et al.*, 1999) e em *Glycine max* (Fernando, 1999) ocorre assincronia do processo embriogênico bem como a formação de embriões somáticos secundários na região de contato entre o hipocótilo e a radícula de embriões somáticos primários. O processo de embriogênese somática *in vitro* é repetitivo sendo a formação de embriões secundários uma das causas da assincronia verificada na maioria das culturas (Ammirato, 1987).

As ilustrações apresentadas neste ítem fazem parte de um conjunto de dados referentes à uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida nos Departamentos de Ciências Biológicas e de Genética da ESALQ/USP e financiada pela FAPESP.

5. CULTURA E RESGATE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A cultura de embriões é uma área da cultura de tecidos de aplicação bem definida no melhoramento vegetal. Tem importância na quebra da dormência e

esterilidade de sementes, resgate de híbridos oriundos de cruzamentos incompatíveis, produção de haplóides e poliplóides (Kaneyoshi *et al.*, 1997) e no desenvolvimento *in vitro* de embriões maduros submetidos ao bombardeamento de partículas para fins de transformação.

A dormência de sementes em muitas espécies cultivadas é devida a inibidores químicos ou à resistência mecânica presente nos tegumentos que recobrem o embrião. A excisão do embrião ainda imaturo e o seu cultivo em meio nutritivo podem quebrar essa dormência.

Os procedimentos experimentais da cultura de embriões imaturos estão bem estabelecidos. Sabe-se que os embriões zigóticos, quando excisados das sementes, são completamente auxotróficos. Desde que se estabeleçam condições para sustentar o seu crescimento *in vitro*, eles são capazes de germinar em meio salino suplementado com uma fonte de carbono. Eventualmente, ocorre germinação precoce, resultando em *seedlings* pouco vigorosos, a qual pode ser evitada por elevação da pressão osmótica, níveis altos de potássio, ou adição de ácido abscísico.

Outras espécies produzem sementes estéreis devido ao desenvolvimento incompleto do embrião, como ocorre em acerola (*Malpighia*) e certas variedades de ameixa (*Prunus*) e a mutações que afetam os tegumentos resultando na morte do embrião em germinação, como em certos tipos de coco. A cultura de embrião favorece a produção de sementes nesses casos.

Os sistemas de incompatibilidade sexual são classificados em pré e pós-zigóticos. As barreiras anteriores à fertilização ocorrem usualmente pela inibição do crescimento do tubo polínico, provocada pelo estigma ou estilete, a qual pode ser superada cortando-se o estigma, ou por técnicas de fertilização *in vitro*. Barreiras pós-zigóticas frequentemente resultam no desenvolvimento incompleto do endosperma, levando à atrofia e aborto do embrião, principalmente, aqueles oriundos de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos, ou levam à produção de toxinas pelo endosperma que elimina o embrião (Sharma, 1995). Em anos recentes, tornou-se imperativo o domínio dos procedimentos de resgate de embrião para várias espécies cultivadas, face às crescentes necessidades de busca de recursos genéticos em plantas selvagens. O resgate, seguido do cultivo dos embriões oriundos de cruzamentos, permite quebrar a barreira de incompatibilidade, possibilitando a obtenção do híbrido sendo, sem dúvida, um dos aspectos de maior sucesso e aplicabilidade das técnicas de cultura *in vitro* no melhoramento vegetal.

Cabe comentar que há diferentes maneiras de obtenção da plântula F_1 via cultura de embrião: *a*) cultivo do embrião após excisão da semente; *b*) cultura de óvulo seguida ou não da cultura de embrião, como tem sido realizado em videira (Yamashita *et al.*, 1998) e em trigo (Kumlehn *et al.*, 1997), respectivamente; *c*) indução de calo e regeneração de plântulas a partir do embrião; *d*) cultivo do embrião mantendo o endosperma; *e*) cultura da espigueta seguida do cultivo do embrião.

Protocolos específicos visando a obtenção de híbridos entre trigo e centeio e entre espécies de *Phaseolus* são apresentadas na literatura publicada por Kaltsikes *et al.* (1986) e Mok *et al.* (1986), respectivamente; no Brasil genes oriundos de espécies silvestres de *Lycopersicon* têm sido incorporados em tomate (Segeren *et al.*, 1993a,b).

6. CULTURA DE ANTERAS E DE OVÁRIOS

Boa parte dos métodos de melhoramento de plantas compreende uma etapa de obtenção de linhagens endogâmicas. Usualmente, são realizadas autofecundações sucessivas, acompanhadas de seleção, para fins de obtenção de homozigotos que contêm, em média, cerca de 96,8 % de seus genes em homozigose, valor esse que varia em função do número de autopolinizações realizadas.

A geração de plantas haplóides *in vitro* é uma das etapas de obtenção rápida de plantas homozigotas, comparativamente aos métodos tradicionais. A técnica mais usual é via cultura de anteras. Em cevada (*Hordeum vulgare*) essa metodologia foi extensivamente otimizada e é rotina em programas de melhoramento da cultura (Jähne & Lörz, 1995). Alternativamente, micrósporos podem ser isolados e cultivados. O aspecto mais crítico da cultura de antera e de micrósporos é o crescimento das plantas doadoras de explantes, o qual deve se dar sob condições controladas em casa de vegetação ou *phytotron*. O vigor da planta-mãe, por sua vez, é influenciado por fotoperíodo, intensidade e fonte da radiação luminosa e temperatura. Em cereais de inverno, a androgênese é favorecida quando as plantas são cultivadas sob 20.000 lux e baixas temperaturas. Estas provocam maior homogeneidade durante a ontogênese, favorecendo a coleta das anteras contendo microsporócitos em estágio adequado ao cultivo *in vitro*, isto é, uninucleado, com núcleo próximo ao poro germinativo. Em cevada, as inflorescências são coletadas e conservadas a 4°C por três a quatro semanas, no escuro. Após a retirada das anteras, estas são cultivadas em meio nutritivo. Melhores resultados têm sido obtidos modificando-se a fonte de C e o suprimento de N, em relação às formulações usuais.

Embora houvesse expectativa, por parte dos melhoristas, de utilização imediata dessa tecnologia na cultura de milho, cujos programas de produção de híbridos implicam na obtenção de linhagens, a maioria dos genótipos comerciais de milho é recalcitrante à androgênese *in vitro*. Por outro lado, no Brasil, se têm informações sobre o domínio dos procedimentos de cultura de anteras nas culturas de trigo (Embrapa Trigo/CNPT) e arroz (Embrapa Arroz e Feijão/CNPAF). Na Ásia, vários países utilizam a cultura de anteras como rotina na tecnologia de produção de arroz, conduzindo também estudos básicos que envolvem espécies silvestres de *Oryza* (Tang *et al.*, 1998).

7. VARIAÇÃO SOMACLONAL

7.1 CONCEITO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A prática do cultivo de células, de tecidos e orgãos vegetais em laboratório compreende um conjunto de etapas desde a introdução do explante *in vitro*, estabelecimento e manutenção das culturas, até a regeneração de brotos. Uma vez definidos os objetivos que se deseja atingir, seja a micropropagação, conservação *in vitro*, seja o estudo das vias de regeneração, a partir de tecidos meristemáticos ou diferenciados, a prática *per se* pode ser considerada estressante às células e tecidos vegetais. Devido ao acúmulo de gases no frasco de cultura, principalmente o etileno, ao tempo de cultivo e às concentrações elevadas de sais, de compostos orgânicos e

fitorreguladores, os tecidos submetidos à cultura *in vitro* sofrem pressões de seleção diversas daquelas a que estão sujeitos antes da sua excisão da planta-mãe.

No frasco de cultura, denomina-se *vitrificação*, o aspecto vítreo que assumem os tecidos, brotos ou plântulas regeneradas em conseqüência de uma série de fatores como condensação excessiva, oxidação e excesso de hormônios os quais por sua vez podem criar condições estressantes às células submetidas ao cultivo em laboratório.

As alterações decorrentes do estresse *in vitro* podem levar ao aparecimento de variantes morfológicos, ou seja, de indivíduos ditos *off-type*. Larkin & Scowcroft (1981) criaram o termo *variação somaclonal* para designar a ocorrência de variantes genéticos derivados da cultura de células *in vitro*. Pode-se ampliar essa definição para qualquer variação de natureza genética, citogenética ou molecular originada em fases iniciais da cultura (indução de calos, por exemplo) ou durante a fase de regeneração de brotos. Portanto, está sempre associada ao processo de regeneração de plantas a partir de procedimentos *in vitro*.

Alguns fatores como tempo de cultivo e número de subculturas, fitorreguladores, fonte e genótipo doador do explante, composição dos meios de cultura, nível de ploidia e a ocorrência de mosaicismo são agentes capazes de induzir o aparecimento da variação somaclonal (Silvarolla, 1992).

A resposta celular a esse estresse vai desde mutações de ponto, amplificação de seqüências, ativação de elementos transponíveis, alterações no DNA citoplasmático e total e no número de cópias de seqüências repetitivas, até alterações na morfologia e número cromossômicos. Evidências de ocorrência de ciclos de quebra-fusão-ponte seguidos de cicatrização e de troca desigual entre cromátides irmãs têm sido relatadas por Santos-Serejo & Aguiar-Perecin (1999) em culturas de calos embriogênicos de milho. Interessante ressaltar que essas alterações são sítios-específicas na medida em que envolvem as regiões heterocromáticas dos knobs.

As causas não-genéticas podem ser de natureza fisiológica ou epigenética como as hipermetilações e hipometilações da molécula de DNA.

A literatura tem relatado alterações no DNA de plantas obtidas por cultura de tecidos diferenciados e também em plantas derivadas da cultura de meristemas. Entre as metodologias usadas para detectar e caracterizar a ocorrência de variação somaclonal estão as abordagens que utilizam marcadores moleculares, principalmente a técnica do RAPD.

7.2 O EXEMPLO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Em cana-de-açúcar, à exemplo de outras culturas, os procedimentos *in vitro* têm sido adotados para micropropagação. Devido à extensão da área plantada, a demanda de mudas é alta, a cada variedade lançada. Utilizando-se dessa técnica, em cerca de seis meses, pode-se obter até 20.000 plantas a partir de um único meristema, garantindo-se a ocupação da área. No Estado de São Paulo, a tecnologia de produção de mudas está bem estabelecida na Copersucar, Piracicaba, havendo cerca de 15 biofábricas que atendem às usinas cooperadas.

Na micropropagação pretende-se a preservação da integridade genética da planta doadora de explante uma vez que o objetivo é obter-se muitos e idênticos clones. Entretanto, níveis altos de instabilidade fenotípica têm sido relatados em

plantas derivadas do cultivo *in vitro*. Em banana (Vuylsteke *et al.*, 1996) e em cana-de-açúcar, certos genótipos apresentam-se instáveis fenotipicamente como é o caso da variedade brasileira, RB83-5486. Zucchi *et al.* (2000), estudando esta variedade de cana-de-açúcar, mostraram que é possível detectar variações na molécula do DNA, via RAPD. Taxas da ordem de 3 a 7% de variação induzida pela cultura de meristemas foram observadas, não necessariamente associadas ao número de subcultivos.

7.3 APLICAÇÕES EM MELHORAMENTO GENÉTICO

A incidência de variação somaclonal é altamente indesejada quando se utiliza a cultura de tecidos na micropropagação, conservação de germoplasma e na obtenção de plantas transgênicas.

Por outro lado, os cientistas têm alertado para o potencial da variabilidade gerada pelo cultivo *in vitro* a ser explorado pelos programas de melhoramento. A literatura documenta muito claramente esse potencial. A geração de variabilidade genética via cultura *in vitro* tem sido buscada em espécies que apresentam erosão genética ou visando gerar resistência à salinidade, patógenos e pragas, submetendo-se, por exemplo, as culturas à presença de toxinas fúngicas, altas concentrações de sais, íons alumínio etc. Este tipo de abordagem é dita seleção *in vitro*.

A avaliação dos segregantes oriundos a partir da geração primária de regenerantes é feita em experimentos controlados na tentativa de elucidar se plantas derivadas do cultivo *in vitro* são similares àquelas obtidas via sementes e se os sistemas usados para obtenção dos regenerantes interferem na sua performance. Na década de 90 há inúmeros relatos, envolvendo diversas culturas, sobre mudanças em caracteres quantitativos e qualitativos geradas pela cultura de tecidos.

Em combinação com as técnicas convencionais de indução de mutação, a geração de novos variantes, seguida de seleção e clonagem, pode resultar em materiais bastante promissores.

Sabe-se que mais de 1700 mutantes envolvendo 154 espécies agrícolas e ornamentais, produzidos via indução de mutação seguida de seleção, foram oficialmente liberados. Excelentes resultados foram obtidos em *Alstroemeria*, begônia, crisântemo, cravo, dália e *Streptocarpus* (Maluszynski *et al.*, 1995).

8. CULTURA E FUSÃO DE PROTOPLASTOS

8.1 A IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES SELVAGENS COMO FONTE DE GENES

Em meados do século XX, a produtividade de várias espécies cultivadas nos EUA duplicou, sendo que o incremento em milho chegou a 320%. Isto se deve, em grande parte, à exploração dos recursos genéticos dessas espécies. A contribuição do germoplasma selvagem foi bastante inferior. Por outro lado, outras grandes culturas, como a cana-de-açúcar, o algodão e o tomate, têm incorporado genes oriundos de espécies silvestres relacionadas. Caracteres do tipo vigor e resistência a doenças, adquiridos de espécies não domesticadas, tiveram um grande impacto na produção da cana-de-açúcar, por exemplo. Outras culturas, como a do tomate, provavelmente não estariam sendo cultivadas em escala extensiva, não fosse a introdução de genes exóticos de resistência a doenças e relacionados à qualidade dos frutos.

O processo de domesticação de cereais, de culturas produtoras de óleo, do tabaco, das olerícolas e muitas frutíferas além das plantas forrageiras e produtoras de fibras, tem incorporado genes oriundos de espécies aparentadas, não domesticadas. A batata, por exemplo, está entre as primeiras culturas que se beneficiaram do germoplasma exótico (Prescott-Allen, 1988).

8.2 ESTRATÉGIAS DE HIBRIDAÇÃO

As estratégias que têm sido aplicadas para expandir a variabilidade genética a partir da exploração do germoplasma de espécies selvagens são a hibridação sexual (interespecífica ou intergenérica), a engenharia genética (através da tecnologia do DNA recombinante e das metodologias de transformação de plantas) e a hibridação somática. A hibridação interespecífica tem sido extensivamente utilizada e o sucesso deste método depende do parentesco entre as espécies envolvidas na hibridação sexual. Esta afinidade vai determinar a fertilidade dos híbridos e conseqüentemente o seu potencial para utilização em programas de melhoramento genético. Muitos são os estudos sobre hibridação envolvendo os gêneros que participaram da história evolutiva do trigo, incluindo-se análises do comportamento meiótico dos híbridos intergenéricos visando o seu aproveitamento em programas de melhoramento da cultura. Da mesma forma, análises das plantas obtidas por retrocruzamentos que se sucedem à produção do F_1, têm sido conduzidas.

Entretanto, esse método é limitado em certas espécies por barreiras de incompatibilidade: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto porém ele é abortivo, o que implica na excisão do embrião imaturo e posterior desenvolvimento *in vitro*. Esse resgate tem facilitado, por exemplo, a incorporação de genes exóticos na cultura da batata.

As demais estratégias incluem procedimentos biotecnológicos e têm tido sucesso quando inseridas em programas de melhoramento. Avanços recentes em pesquisa sobre cultura de tecidos vegetais, especialmente sobre a regeneração de plantas a partir de protoplastos têm possibilitado a expansão da variabilidade genética a partir da fusão de células somáticas. Como resultado dessas pesquisas, um amplo espectro de híbridos com respeito à sua constituição nuclear tem sido produzido por fusão de protoplastos. A hibridação somática oferece também a oportunidade de se combinar citoplasmas diferentes na mesma célula. Essas combinações não podem ser produzidas por hibridação sexual pois o citoplasma materno, é preferencialmente herdado. Além disso, avanços na tecnologia de fusão, incluindo-se a fusão assimétrica de protoplastos, têm contribuído para uma aplicação mais imediata desta tecnologia no melhoramento. Mais precisamente, pode-se afirmar que o uso de métodos clássicos assistidos por biotecnologia oferece novas oportunidades para a introgressão de genes. Através deste esquema, variedades tetraplóides de batata têm sido sintetizadas (Austin *et al.*, 1985a, b).

8.3 ISOLAMENTO E CULTURA DE PROTOPLASTOS VEGETAIS

Protoplastos são células desprovidas da parede celular. A remoção da parede se faz mediante tratamento enzimático que, em geral, reúne uma mistura de enzimas capazes de degradar a celulose, a pectina, a hemicelulose ou outros polissacarídeos componentes da parede celular (Fungaro & Vieira, 1989).

A fonte utilizada para o isolamento de protoplastos é variável e tem influência na sua produção e também no processo de regeneração da parede e de divisões celulares que se sucedem após essa regeneração. Protoplastos podem ser isolados do parênquima clorofiliano do mesofilo, de tecido cotiledonar, hipocotiledonar, de raízes e também de calos e suspensões celulares. A escolha dessa fonte baseia-se na capacidade de regeneração (por embriogênese ou organogênese) desses tecidos, em geral avaliada em experimentos preliminares. A condição fisiológica da planta doadora é também importante.

Antes do isolamento, o tecido vegetal é plasmolizado em solução salina (Power & Chapman, 1985). Esta solução e a mistura enzimática devem ser preparadas contendo o estabilizador osmótico, à base de açúcares como o manitol e a sacarose, que impede o rompimento da membrana plasmática ou, inversamente, a saída excessiva de água da célula. Após o isolamento, procede-se a contagem e a avaliação da viabilidade dos protoplastos.

O cultivo de protoplastos se faz em meio de cultura rico em componentes orgânicos e inorgânicos, suplementado com fitorreguladores e com adequadas concentrações de polissacarídeos pois estes funcionam como estabilizadores osmóticos (Kao & Michayluk, 1975). Este cultivo é feito diretamente em meio líquido ou embebe-se a mistura protoplastos-meio de cultura, em agarose ou outro agente gelificante. A densidade ideal de cultivo, que varia de 5×10^4 até 2×10^5 protoplastos por ml de meio, deve ser definida experimentalmente em cada caso.

Após a regeneração da parede celular, as células derivadas entram em divisão. As primeiras divisões são observadas em freqüências que variam dependendo do genótipo e da espécie que se está trabalhando. As condições de cultivo são igualmente importantes (Dornelas & Vieira, 1993; Pupilli *et al.*, 1989). A osmolaridade da cultura deve ser progressivamente diminuída por adição ou substituição de parte do meio original por um meio de cultivo celular (Gilmour *et al.*, 1989).

Na medida em que se sucedem divisões celulares, pequenas colônias vão se formando. Estas são originárias de uma única célula. A capacidade de sustentar divisões em cultura é medida por um parâmetro chamado *plating efficiency*, que é dado pela relação entre o número de colônias formadas e o número inicial de células que entraram em divisão.

8.4 REGENERAÇÃO DE BROTOS

Geralmente, após 28 dias, as microcolônias podem ser observadas. Nessa estapa, devem ser transferidas para meio sólido onde darão origem a calos. A regeneração ocorre em meio adequado à formação de embriões somáticos ou de parte aérea. As formulações de meio variam muito entre grupos de plantas tais como, mono e dicotiledôneas, gramíneas e leguminosas, e não há como generalizá-las. Uma regeneração abundante de brotos é desejada, o que irá facilitar estudos posteriores ou a aplicação do sistema em experimentos de manipulação genética e de hibridação somática.

8.5 HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA

A obtenção de híbridos somáticos depende fundamentalmente de mecanismos eficientes que promovam a fusão celular. Em plantas, a fusão pode ser mediada por

um agente químico, o polietileno glicol (PEG) ou por choques de corrente elétrica (eletrofusão). Na fusão química, protoplastos de espécies diferentes são colocados em contato na presença de PEG, que é tóxico à célula. A seguir, procede-se ao cultivo dos produtos de fusão.

A fusão elétrica ocorre em duas etapas (Al-Atabee *et al.*, 1990). Primeiramente, as células são submetidas a uma corrente do tipo alternada gerando um campo elétrico de alta força e fazendo com que os protoplastos polarizem-se e se encaminhem para o pólo de maior força, fenômeno conhecido como *dieletroforese*. A proximidade das membranas facilita a fusão que é provocada logo em seguida à aglutinação, por choques de corrente contínua (que variam de 50, 100, 500 ou até mais volts). Estes choques provocam a abertura reversível de poros na membrana plasmática. Os rearranjos das membranas eletroporadas podem eventualmente fundir células adjacentes.

A fusão não é um evento dirigido. Ela pode ocorrer entre protoplastos de uma mesma espécie formando homocários ou entre espécies diferentes dando origem aos heterocários. Alguns procedimentos de seleção de heterocários, anteriores ao cultivo, podem ser adotados: técnicas de micromanipulação ou de citometria de fluxo. Para isso, é necessário utilizar marcadores morfológicos que permitam a identificação dos protoplastos oriundos das espécies envolvidas em fusão. Protoplastos verdes podem ser obtidos a partir de tecidos clorofilados e protoplastos incolores, a partir de suspensões celulares. Este é o marcador mais usado, e que também permite o cálculo das taxas de fusão nos diversos experimentos.

Os produtos de fusão são cultivados até a fase de calo e em seguida colocados em meio de regeneração de brotos. Nos experimentos onde não houve seleção prévia de heterocários, esta pode ser feita na fase de calo ou broto. A natureza híbrida do broto pode ser identificada por análises morfológicas e cromossômicas. Pode-se antecipar essa seleção pela análise de padrões eletroforéticos de proteínas totais, isoenzimas ou de DNA. Nas análises eletroforéticas, o padrão de bandas das espécies parentais é caracterizado, procurando-se identificar bandas típicas. A mistura física das amostras parentais revela um padrão que corresponde à soma das bandas parentais o qual serve como controle para a identificação dos híbridos somáticos verdadeiros. Este é um sistema eficiente para a confirmação da natureza híbrida e que pode ser usado tanto na fase de calo como de planta (Vieira & Dornelas, 1996).

Análises sobre o comportamento vegetativo e reprodutivo, incluindo-se comportamento meiótico, de híbridos somáticos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) vem sendo conduzidas na ESALQ/USP em colaboração com a Embrapa/CNPMF, visando delinear o seu potencial de aproveitamento em programas de melhoramento genético (Vieira & Dornelas, 1996; Barbosa & Vieira, 1997). Uma revisão sobre este assunto foi publicada por Dornelas & Vieira (1996) enfatizando o aproveitamento de híbridos somáticos em programas de melhoramento de *Nicotiana*, *Brassica*, *Citrus* e *Solanum*.

9. TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Embora a apresentação das técnicas de transferência de genes em plantas, via engenharia genética, não seja objeto deste capítulo, cabe ressaltar a importância e a relação dos procedimentos de cultura *in vitro* para a tecnologia de transformação.

Destacam-se como técnicas de transformação: a) aquela mediada por *Agrobacterium*, na qual a bactéria atua como vetor, transferindo parte de seu DNA plasmidial às células vegetais, b) a eletroporação de protoplastos; c) a biobalística.

O sucesso desses três procedimentos depende do conhecimento prévio sobre as condições de regeneração do explante vegetal utilizado. No caso da transformação via *Agrobacterium*, há necessidade de se transformar células que tenham potencial de regeneração. Discos foliares de tabaco, por exemplo, são bastante responsivos à transformação e à regeneração de brotos.

Em geral, as células vegetais atingidas pelo *Agrobacterium* após a sua inoculação ou co-cultivo têm localização superficial. Dependendo do tipo de explante, a formação de gemas adventícias ou pró-embriões somáticos ocorre, igualmente, a partir de camadas celulares localizadas na superfície do explante. Entretanto, essa coincidência nem sempre ocorre. O monitoramento histológico da via de regeneração pode auxiliar ao pesquisador a maximizar os protocolos de obtenção de brotos transgênicos (Alves, 1999).

No caso da eletroporação, cuja eficiência de transformação *per se* é alta, há necessidade de se conhecer as condições de cultivo dos protoplastos recém-eletroporados, de indução e manutenção de mitoses até haver a formação de microcolônias e calos e, por fim, da formação de gemas ou embriões que darão origem a plantas.

Na transformação por biobalística são usadas diversas fontes de explantes: embriões zigóticos; calos organogênicos e embriogênicos; suspensões celulares que têm se mostrado as mais promissoras. É evidente que os procedimentos de cultura devem estar bem estabelecidos de tal sorte a se obter um grande número de transformantes putativos. O *screening* desses brotos, em geral, é feito via PCR, os quais são, igualmente, avaliados quanto à expressão do gene repórter. Um número elevado de transformantes de *Stylosanthes guianensis* foi obtido, recentemente, na ESALQ/USP, após otimização das condições de bombardeamento e eletroporação (Quecini, 1999). Cerca de 3000 brotos foram submetidos à análise de PCR e de expressão do gene *uid-A* (GUS), tendo sido obtidas 48 plantas transgênicas portadoras do gene da albumina 2S, rico em metionina.

Os procedimentos experimentais de obtenção de plantas transgênicas estão bem dominados no Brasil, seja para fins de estudos básicos de biologia celular ou molecular, seja visando o seu cultivo em larga escala. Neste sentido, destacam-se as culturas de soja e algodão resistentes a herbicidas e a insetos, feijão resistente a herbicida, vírus e a insetos, mamão e batata resistente a vírus e banana resistente a fungos, modificadas geneticamente em laboratórios especializados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em Brasília. Esses são alguns exemplos de produtos da biotecnologia vegetal que estarão à disposição do agricultor brasileiro, na medida em que a sua liberação for recomendada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, a CTNBio/MCT.

10. CONCEITO E HISTÓRICO DA BIOTECNOLOGIA

O Homem vem praticando a domesticação de plantas desde o início da sua vida em comunidades, usando os produtos oriundos da prática agrícola para a sua alimentação, confecção de roupas e adornos, utensílios, construção de casas

rudimentares etc. Ao longo de sua história, deu início ao cultivo de várias espécies nos seus locais de origem ou em outras regiões do mundo, face aos seus hábitos nômades e migratórios e à conquista de novos territórios. Aos poucos, embora de forma empírica, passou a selecionar plantas que reuniam características favoráveis, modificando gradativamente a estrutura genética das populações sob cultivo. No século XX, a investigação científica, principalmente do ponto de vista da Genética, permitiu o advento de técnicas e de procedimentos experimentais importantes para o cultivo de plantas em larga escala, com produtividade e qualidades elevadas.

Assim, três níveis de exploração dos recursos vegetais podem ser caracterizados: a princípio, a prática é extrativista, seguindo-se os procedimentos de cultivo doméstico e, finalmente, em anos recentes da nossa história, pratica-se o plantio de monoculturas, que podem conter milhares de plantas.

Essas informações são importantes para que se possa compreender o conceito de *Biotecnologia*, ou seja, uma tecnologia cujos produtos são oriundos de organismos vivos ou cujos processos envolvem a participação desses organismos. Dentro desta ótica, o vinho, a cerveja, o queijo e o pão são produtos de uma biotecnologia secular. Da mesma maneira, o melhoramento genético de plantas, animais e de microrganismos é uma prática biotecnológica porque gera produtos comerciais. Assim, sementes melhoradas de soja e a fermentação alcoólica são exemplos de um produto e de um processo biotecnológico, respectivamente.

10.1 INTERFACES DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE E A NOVA BIOTECNOLOGIA: A INDÚSTRIA DO DNA

Tão logo os primeiros experimentos de clonagem gênica foram descritos em 1973, ficaram evidentes as aplicações desta tecnologia na indústria (Farah, 1997). A Engenharia Genética (EG) abriu perspectivas para aumentar a produção de certos compostos microbianos, como permitiu forçá-los a produzir novas substâncias de interesse principalmente para a indústria farmacêutica e de alimentos.

Essa prática, já adotada desde os anos 40, quando se intensificaram estudos sobre genética e melhoramento microbiano permitiu, por exemplo, que mutantes do gênero *Penicillium* fossem selecionados, aumentando a produção de penicilina. A elucidação das vias metabólicas dos compostos microbianos de interesse e as técnicas de mutagênese e seleção genética permitiram que a indústria ficasse cada vez mais competente na utilização de microrganismos produtores de ácidos orgânicos, de enzimas hidrolíticas, etanol etc. Entretanto, em várias situações, se atingiu um limite máximo de produção. Este limite pôde ser superado com o advento da tecnologia do DNA recombinante.

Em plantas, os níveis de produtividade alcançados pelo melhoramento genético são surpreendentes em culturas como a do milho e a soja. No entanto, é severamente comprometida em função do ataque de pragas e doenças cujo controle químico não é satisfatório. Alternativas para este problema estão sendo propostas pela EG. Plantas transgênicas portadoras de genes de resistência a vírus e a pragas são uma realidade do final do século XX. Esta estratégia é, em muitas situações, mais conveniente do que a hibridação interespecífica uma vez que apenas o gene de resistência é introduzido no genoma da espécie cultivada.

Há várias doenças que afetam o Homem cuja terapêutica implica em administrar compostos protéicos ou hormônios aos pacientes incapazes de produzí-los por algum defeito genético. Neste contexto, os sistemas de expressão mais utilizados são os organismos procariotos. Apesar das inúmeras vantagens que apresentam, há certas limitações relativas à produção de proteínas complexas que exigem processamento em organelas celulares ou mostram uma configuração particular. Neste caso, em um procarioto, ela pode se tornar insolúvel e inativa, ou mesmo se mostrar tóxica à bactéria. Assim, passaram a ser alternativas de produção de compostos, as leveduras e, finalmente, animais e plantas transgênicas, justificando, a necessidade de pesquisas em clonagem de animais e transgenia que funcionem como *fábricas biológicas* de proteínas recombinantes complexas. Da mesma forma, plantas poderão ser utilizadas como vetores de imunização. Outro aspecto importante da biotecnologia diz respeito à produção de vacinas por EG: as vacinas de subunidades, como são chamadas, dependem do isolamento de genes que codificam proteínas virais e de sua expressão em um sistema adequado. Este mesmo princípio tem sido usado para inserir genes de resistência a vírus em plantas.

Concluindo, pode se afirmar que o domínio das técnicas de cultivo *in vitro* tem importância na biotecnologia vegetal, pois estas se constituem em etapas indispensáveis na obtenção de produtos. Da mesma forma, o conhecimento dos aspectos teóricos que fundamentam essas técnicas orienta o pesquisador no planejamento de sua pesquisa, assegurando-lhe maiores chances de sucesso.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à FAFESP pelo auxílio financeiro aos projetos de pesquisa e ao CNPq pela concessão das Bolsas de Produtividade em Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K.Z; MESTERHAZY, A.; BARTOK, T.; SAGI, F. *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum L*) for Fusarium-resistance .2 Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclones. **Euphytica**, v.91, p.341-349, 1996.

AL-ATABEE, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B. Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). **Plant Cell Reports**, v.8, p.517-520, 1990.

ALVES, A. C. Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 109p. Dissertação, Mestrado.

AMMIRATO, P.V. Organizational events during somatic embryogenesis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 3., New York, 1987. **Plant biology**. New York: Alan R. Liss, 1987. p.57-81.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aspectos histológicos e ultra-estruturais da organogênese somática *in vitro* de três espécies de leguminosas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. 74p. Tese, Livre Docência.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S.R. **Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis**. Piracicaba: USP/ESALQ. Depto. de Ciências Biológicas; Botucatu: UNESP. Depto. de Botânica, 2001.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B; VIEIRA, M. L.C.; DORNELAS, M. C. Anatomical aspects of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p.2007-2013, 1999.

ARAI, M.; SAITO, T,; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana tabacum*) internodes cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.523-528, 1997.

ARAÚJO, A.R.B.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B, B.; FRANÇA, S.C. Análises histológicas da organogênese *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (caapeba). In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3., Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas, 1997. p.8.

AUSTIN S.; BAER, M.A.; HEGELSON, J.P. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. **Plant Science**, v.39, p.75-82, 1985a.

AUSTIN, S.; BAER, M.A.; EHLENFELDT, M.; KAZMIERCZAK, P.J.; HEGELSON J.P. Intraspecific fusion in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.172-175, 1985b.

BALL, E. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus*. **American Journal of Botany**, v.33, p.301-318, 1946.

BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis f. flavicarpa Degener + P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v.98, p.121-127, 1997.

BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. **International Review of Cytology**, p.113-144, 1980. Supplement 11A.

BERTIN, P.; BOUHARMONT, J.; KINET, J.M. **Crop Science**, v.37, p.1727-1735, 1997.

BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). **Journal of Experimental Botany**, v.25, p.446-457, 1974.

CANHOTO, J.M.; MESQUITA, J.F.; CRUZ, G.S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (*Myrtaceae*) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.78, p.513-521, 1996.

COLBY, S.M.; JUNCOSA, A.M.; MEREDITH, C.P. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, p.356-361, 1991.

CREEMERS-MOLENAAR, J.; HAKKERT, J.C.; VAN STAVEREN, M.J.; GILLISSEN, L.J.W. Histology of the morphogenic response in thin cell layer explants from vegetative tobacco explants. **Annals of Botany**, v.73, p.547-555, 1994.

DETREZ, C.; TETU, T.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.917-926, 1988.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. **A fusão de protoplastos como um recurso auxiliar ao melhoramento genético vegetal**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. v.3, p.163-193. (Série Monografias)

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**, v.70, p.477-482, 1992.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2.ed. New York: John Wiley, 1977. 550p.

FARAH, S. B. **DNA: segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.

FERNANDO, J.A. Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* L. Merrill). Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 59p. Dissertação, Mestrado.

FERNANDO, J.A.; MELO, M.; SOARES, M.K.M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2000 /No prelo/

FRANSZ, P.F.; SCHEL, H.N. An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.858-865, 1991.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, v.41, p.1151-1159, 1989.

GAUTHERET, R. J. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences/Institut de France**, v.208, p.118-120, 1939.

GILMOUR, D.M.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.29-32, 1989.

GROUT, B. **Genetic preservation of plant cells *in vitro***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 169p.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74-81, 1978.

HANDRO, W.; RAO, P.S.; HARADA, H. A histological study of the development of buds, roots and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. **Annals of Botany**, v.37, p.817-821, 1973.

HARTWECK, L.M.; LAZZERI, P.A.; CUI, D.; COLLINS, G.B.; WILLIAMS, E.G. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology**, v.24, p.821-828, 1988.

ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.16, p.754-757, 1997.

JAN, V.V.; DeMACEDO, C.C.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J. Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar using somaclonal variation, in vitro and hydroponic cultures. **Euphytica**, v.97, p.303-310, 1997.

JÄHNE, A.; LÖRZ, H. Cereal microspore culture. Review article. **Plant Science**, v.109, p.1-12, 1995.

KALTSIKES, P. J.; GUSTAFSON, J.; KALTSIKES, P. I. Triticale: production through embryo culture. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.523-529.

KANEYOSHI, J.; KANOU, T.; KUWATA, Y.; HIRAO, A.; NAKATANI, S.; KOBAYASHI, S. Breeding of triploid citrus cultivars: 1. Production of triploids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) x tetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) crosses. **Journal Japanese of the Society for Horticultural Science**, v.66, p.9-14, 1997.

KAO, K.N.; MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicea hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. **Planta**, v.126, p.105-110, 1975.

KELKAR, S.M.; DEBOO, G.B.; KRISHNAMURTHY, K.V. *In vitro* regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Reports**, v.16, p.215-218, 1996.

KERBAUY, G.B. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root-tips of *Catasetum* (Orchidaceae). **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v.113, p.287-291, 1984.

KLIMASZEWSKA, K.; KELLER, W.A. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.8, p.225-233, 1987.

KUMLEHN, J.; SCHIEDER, O.; LORZ, H. *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. **Plant Cell Reports**, v.16, p.663-667, 1997.

LAPARRA, H.; BURRUS, M.; HUNOLD, R.; DAMM, B.; BRAVO-ANGEL, A. M.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annus* L.): evaluation of three gene transfer methods. **Euphytica**, v.85, p.63-74, 1995.

LARKIN, P.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.197-214, 1981.

LIU, W.; MOORE, P.J.; COLLINS, G.B. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology**, v.28, p.153-160, 1992.

LIU, C.; XU, Z.; CHUA, N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p.621-630, 1993.

MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E.G. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. **Annals of Botany**, v.56, p.619-630, 1985.

MALUSZYNSKI, M.; AHLOOWALIA, B.S.; SIGURBJORNSSON, B. Application of *in-vivo* and *in-vitro* techniques for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.303-315, 1995.

MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T., KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.404-407, 1996.

MEDEIROS, J.D. Embrióides em plantas superiores. **BioTecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.1, p.10-12, 1997.

MOK, D.; MOK, M.; RABAKOARIHANTA, A.; SHII, C. *Phaseolus*, wide hybridization through embryo culture. In: BAJAJ, Y.P.S., (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.309-318.

MOREL, G. La culture *in vitro* du méristème apical de certaines orchidées. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences/Institut de France**, v. 256, p.4955-4957, 1963.

MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p.506-513, 1992.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Action synergique des auxines et du jus de tomate sur la croissance de tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Bulletin de la Societé Botanique de France**, v.102, p.519-532, 1955.

PARROTT, W.A; DURHAM, R.E.; BAILEY, M.A. Somatic embryogenesis in legumes. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.200-227.

PASSOS, I.R.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C. Embryogenic responses of *Vitis* spp.: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis**, v.38, p.47-50, 1999.

PIHAKASHI-MAUNSBACH, K.; NYGAARD, K.B.; JENSEN, K.H.; RASMUSSEN, O. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by ligth and electron microscopy. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.167-176, 1993.

POWER, J.B.; CHAPMAN, J.V. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In: DIXON, R.A. (Ed.) **Plant cell culture**: a practical approach. Washington: IRL Press, 1985. p.37-66.

PRESCOTT-ALLEN, R. **Genes from the wild**. London: Earthscan,1988. 111p.

PUPILLI, F.; DAMIANI, F.; PEZZOTTI, M.; ARCIONI, S. Plant regeneration from callus protoplasts of *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin) **Plant Science**, v.63, p.87-94, 1989.

QUECINI, V.M. Transferência direta de genes para plantas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 172p. Tese, Doutorado.

REMOTTI, P.C.; LOFFLER, H.J.M.; VANVLOTENDOTING, L. Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus* x *grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. **Euphytica**, v.96, p.237-245, 1997.

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoinensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. **Plant Cell Reports**, v.13, p.607-611, 1994.

ROUT, G.R.; DAS, P. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemun*: a critical review. **Scientia Horticulturae**, v.69, p.239-257, 1997.

SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.188, p.439-456, 1992.

SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comportamento meiótico de um cromossomo portador de K7L amplificado em plantas de milho derivadasde calos embriogênicos com 28 meses de cultivo. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.108, 1999. Supplement.

SEGEREN, M.I.; SIQUEIRA, W.J.; SONDAHL, M.R.; LOURENCAO, A.L.; MEDINA FILHO, H.P.; NAGAI, H. Tomato breeding .2. Characterization of F1 and F2 Hybrid progenies of *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* and screening for virus and insect resistance. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.773-783, 1993a.

SEGEREN, M.I.; SONDAHL, M.R.; SIQUEIRA, W.J.; MEDINA FILHO, H.P.; NAGAI, H.; LOURENCAO, A.L. Tomato breeding .1. Embryo rescue of interespecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.367-380, 1993b.

SHARMA, H. How wide can a wide cross be? **Euphytica**, v.82, p.46-64, 1995.

SILVAROLLA, M.B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Ciência e Cultura**, v.44, p.329-335, 1992.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

SUHASINI, K.; SAGARE, A.P.; KRISHNAMURTHY, K.V. Study aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology**, v.32, p.6-10, 1996.

TANG, K.; SUN, X.; HE Y.; ZHANG, Z. Anther culture response of wild *Oryza* species. **Plant Breeding**, v.117, p.443-446, 1998.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.5844-5849, 1999a.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. **Plant Journal**, v.19, p.309-319, 1999b.

VASIL, I.K.; HILDEBRANDT, A.C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures: I. *Cichorium endivia*. **American Journal of Botany**, v.53, p.860-869, 1966.

VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (Passion Fruit). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p.108-119.

VILLALOBOS, V.M.; YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.2172-2176, 1985.

VUYLSTEKE, D.R.; SWENNEN, R.L.; DELANGHE, E.A. Field performance of somaclonal variants of plantain (*Musa* spp, AAB group) **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.42-46, 1996.

WETZSTEIN, H.Y.; BAKER, C.M. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v.92, p.81-89, 1993.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p.585-600, 1934.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

YAMASHITA, H.; SHIGEHARA, I.; HANIUDA, T. Production of triploid grapes by in ovulo embryo culture. **Vitis**, v.37, p.113-117, 1998.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

ZUCCHI, M.I.; ARIZONO, H.; MORAIS, V.A.; VIEIRA, M.L.C. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem culture. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, 2000. /No prelo/

29

BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO MELHORAMENTO

ANETE PEREIRA DE SOUZA

Depto. de Genética e Evolução, IB/CBMEG/UNICAMP, C.P. 6109 - CEP: 13083-970 - Campinas, SP.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas é uma das tecnologias desenvolvidas para emprego na agricultura que apresentou maior sucesso no século XX. A metodologia empregada é eficiente e adaptável a um grande número de espécies, sendo que seu produdo tem elevado valor social. Desta forma, a produtividade de plantas de interesse agronômico tem aumentado continuamente graças ao esforço de agrônomos e melhoristas, os quais têm associado a adequação das condições ambientais ao melhoramento genético das plantas.

Considerando-se o desenvolvimento atual da população mundial, estima-se que ela deverá dobrar em número, ficando próxima dos 10 bilhões em 2050. Assim, apesar dos progressos já alcançados, é necessário a obtenção contínua de cultivares com novas características, adaptadas à condições específicas, que não apenas sejam cada vez mais produtivas, mas também, que satisfaçam mercados e regiões agrícolas particulares. Além disso, a diminuição global das áreas de terras férteis disponíveis à agricultura e, a crescente preocupação com a conservação do ambiente, fazem com que hoje seja extremamente importante a utilização de práticas agrícolas que consumam menor quantidade de energia. Somente através da genética será possível vencer este desafio, desenvolvendo cultivares adaptadas a estas novas exigências.

Basicamente, o melhoramento de plantas envolve a seleção de genótipos considerando-se a variabilidade genética disponível ou produção dela através de cruzamentos entre indivíduos selecionados, de forma a obter-se uma população com genótipos superiores. São necessários vários ciclos de avaliação, seleção e recombinação dos melhores genótipos, para que uma nova cultivar seja produzida. Conseqüentemente, características interessantes são selecionadas ou introduzidas na população nos estágios iniciais deste processo, sendo selecionadas durante anos, até a obtenção da cultivar. Embora a base genética de algumas características de interesse seja conhecida, pode-se dizer que os caracteres de maior importância, freqüentemente, são poligênicos com herança genética complexa e pouco conhecida. Apesar desse desconhecimento, o melhoramento tem proporcionado um aumento contínuo da produtividade das plantas cultivadas. Entretanto, ganhos adicionais exigirão, cada vez mais, um melhor conhecimento da biologia das espécies, bem como, da resposta à seleção ao nível genotípico, ou seja, molecular.

O melhoramento genético, embora efetivo, é relativamente lento por ser baseado em vários ciclos de recombinação, avaliação e seleção. Desta forma, problemas como a correção de defeitos (suscetibilidade a pragas e doenças, arquitetura da planta, etc.) ou a introgressão de genes de interesse em cultivares elites podem demorar alguns anos para serem resolvidos. Da mesma maneira, através do emprego das técnicas convencionais de hibridação, torna-se bastante difícil, senão impossível, a utilização da variabilidade genética presente em espécies que sejam sexualmente incompatíveis com aquela de interesse.

Nos últimos anos a biologia molecular e celular têm possibilitado um conhecimento mais aprofundado da genética e biologia dos organismos, fornecendo ferramentas que possibilitam a manipulação do genótipo dos mesmos. Assim, através da biotecnologia, uma série de metodologias surgiram para auxiliar o melhoramento genético, possibilitando a obtenção do(s) genótipo(s) desejado(s) em menor tempo. Basicamente, estas técnicas correspondem à utilização da cultura de tecidos, transformação genética de plantas com genes vindos de outros organismos e utilização de marcadores moleculares.

A descrição detalhada das técnicas e do emprego da cultura de tecidos e transformação genética no melhoramento de plantas serão abordadas em outros capítulos deste livro. No entanto é oportuno citar aqui que a cultura de tecidos tem tido inúmeras aplicações associadas aos programas de melhoramento, sendo as mais comumente encontradas:

- manutenção de genótipos *in vitro* em bancos de germoplasma;
- multiplicação de genótipos para acelerar etapas do programa de melhoramento;
- eliminação de vírus através da cultura de meristema;
- cultivo *in vitro* de embriões híbridos resultantes de cruzamentos entre espécies não relacionadas;
- obtenção de haplóides a partir de cultura de anteras;
- fusão de protoplastos para a obtenção de híbridos e/ou cíbridos entre espécies sexualmente incompatíveis;
- geração de variabilidade através de variação somaclonal;
- cultivo de tecidos ou células como material de base para a transformação genética com genes estrangeiros.

Os marcadores moleculares surgiram como uma grande contribuição do desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma. Através deles é possível analisar-se cada genótipo de interesse, possibilitando assim a obtenção de informações relativas à variabilidade existente, identificação de genótipos ou genes específicos e associação entre marcadores moleculares e características fenotípicas. A possibilidade de obtenção destas informações resulta em inúmeras aplicações dos marcadores moleculares associadas ao melhoramento de plantas.

2. MARCADORES MOLECULARES

Qualquer forma alélica originada de um genoma pode ser utilizada como um marcador genético, podendo esta ser um dado fenótipo, uma proteína ou um fragmento de DNA que codifica ou não um gene, possuindo uma seqüência repetida ou única no genoma. Muitos genes, e também seqüências de DNA não codificadoras, estão representados em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes entre si, porém correspondentes ao mesmo loco cromossômico: a este fenômeno dá-se o nome de polimorfismo genético. Por convenção, considera-se que um loco é polimórfico quando a freqüência de seu alelo mais comum é inferior a 99%. Isso significa que entre 100 indivíduos, pelo menos um apresentará um alelo diferente daquele presente no mesmo loco nos outros 99 indivíduos.

Os marcadores genéticos podem ser fenotípicos ou moleculares: os primeiros correspondem ao produto de expressão de um ou mais genes, podendo ser influenciados pelo ambiente e/ou pela ação de outros genes. Os marcadores moleculares, também chamados de marcadores genômicos ou genotípicos, detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental ou gênica.

Teoricamente qualquer fragmento de DNA pode ser utilizado como um marcador molecular, desde que ele revele polimorfismo entre indivíduos. Seu número é ilimitado, e como dito anteriormente, são desprovidos de efeito epistático ou pleiotrópico. Quando comparados aos marcadores fenotípicos, apresentam um número maior de alelos por loco. Seguindo-se critérios genéticos eles podem ser classificados basicamente em dois tipos principais: a) marcadores moleculares loco-específicos codominantes; b) marcadores loco não específicos dominantes. Embora esta classificação seja simplificada, ela corresponde aos dois principais tipos de marcadores utilizados.

2.1 MARCADORES MOLECULARES LOCO-ESPECÍFICOS CODOMINANTES

Os marcadores moleculares desta classe mais utilizados em plantas são aqueles denominados de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Eles têm em comum o fato de serem espécie-específicos e codominantes, ou seja, ambos os alelos de um mesmo loco do indivíduo são visualizados ao mesmo tempo.

2.1.1 RFLP

Botstein *et al.* (1980) sugeriram que um grande número de marcadores moleculares poderia ser encontrado estudando-se diferenças na própria molécula de DNA, as quais são reveladas como diferenças no tamanho do fragmento de restrição do DNA (Figura 1). As diferenças ocorrem devido à variação na distribuição dos sítios de restrição de uma dada enzima no DNA. Tal variação pode ser conseqüência de mutações pontuais, que levam à criação ou eliminação do sítio de restrição de uma endonuclease específica. Enzimas de restrição cortam o DNA em seqüências particulares, chamadas de "sítios de restrição". Se dois indivíduos diferem por um único nucleotídeo no sítio de restrição, a enzima cortará o DNA de apenas um dos indivíduos, gerando fragmentos de restrição de diferentes tamanhos. Porém, outras alterações na seqüência de DNA também levam à variação no tamanho do fragmento de restrição, sem que o sítio da enzima tenha sido modificado. Assim, é possível ocorrer inserções e/ou deleções e translocações e/ou inversões no fragmento de restrição sob análise, que resultarão na alteração do seu tamanho (Figura 2). Os fragmentos de tamanho diferente gerados por restrição são visualizados após separação em um gel de agarose, impressão em membrana de *nylon* e hibridização com uma sonda específica marcada radioativamente ou com quimioluminescência (Beckmann & Soller, 1986; Paterson *et al.*, 1991).

Alterações no DNA envolvendo grandes regiões, tais como inversões, deleções, adições, rearranjamentos ou translocações, resultarão numa alteração da distribuição

relativa dos sítios para várias enzimas de restrição simultaneamente. Em todos estes casos, a distribuição de tamanho dos fragmentos de DNA gerados por digestão com uma endonuclease de restrição da região afetada pela mutação será diferente daquela obtida em um indivíduo que não sofreu a mutação, produzindo um polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição. Isto ocorrerá, no caso de mutações pontuais, somente para aquelas enzimas cujos sítios de reconhecimento incluem mutações; enquanto que, nos casos de rearranjamento do DNA, o polimorfismo ocorrerá para vária enzimas cujos sítios de reconhecimento estão incluídos na região mutada.

Em genomas pequenos, como o de vírus e organelas (mitocôndria e cloroplasto), o polimorfismo nos fragmentos de restrição (RFLP) pode ser visualizado diretamente após separação eletroforética dos fragmentos de DNA em gel apropriado. Entretanto, quando se analisa genomas mais complexos, o número de fragmentos de restrição gerados é tão grande que um *smear* contínuo é formado no gel, não sendo possível distinguir-se fragmentos individuais. Assim, é necessário utilizar-se sondas específicas clonadas para visualizar-se um determinado fragmento de DNA do genoma; através da técnica descrita por Southern (1975), o DNA digerido é separado por eletroforese em gel de agarose, desnaturado, transferido para uma membrana sob a forma de fitas simples e hibridizado com uma sonda específica (Figura 2).

Desde a descoberta de RFLPs em vírus (Godzicker *et al.*, 1974), já foi demonstrada sua presença em inúmeras espécies vegetais e animais. O padrão de herança depende do genoma analisado, isto é, RFLPs nucleares segregam como marcadores mendelianos e são codominantes, RFLPs citoplasmáticos são maternalmente herdados. Assim, como no caso de outros marcadores moleculares, pode-se utilizar para a análise de RFLPs o DNA extraído de qualquer tecido, em qualquer estágio de desenvolvimento do organismo.

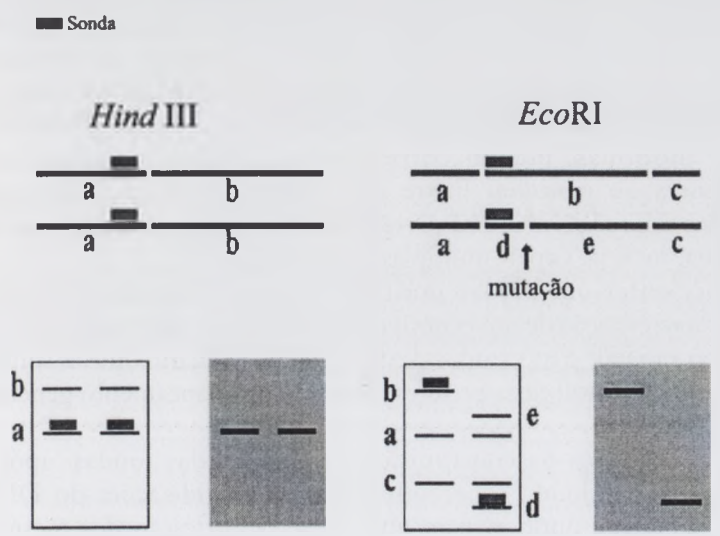


FIGURA 1. Princípio do RFLP: após digestão do DNA com duas enzimas de restrição e hibridização com sonda específica, o polimorfismo para um mesmo loco é revelado pela combinação da sonda com a enzima, no exemplo, somente com a enzima *Eco RI*.

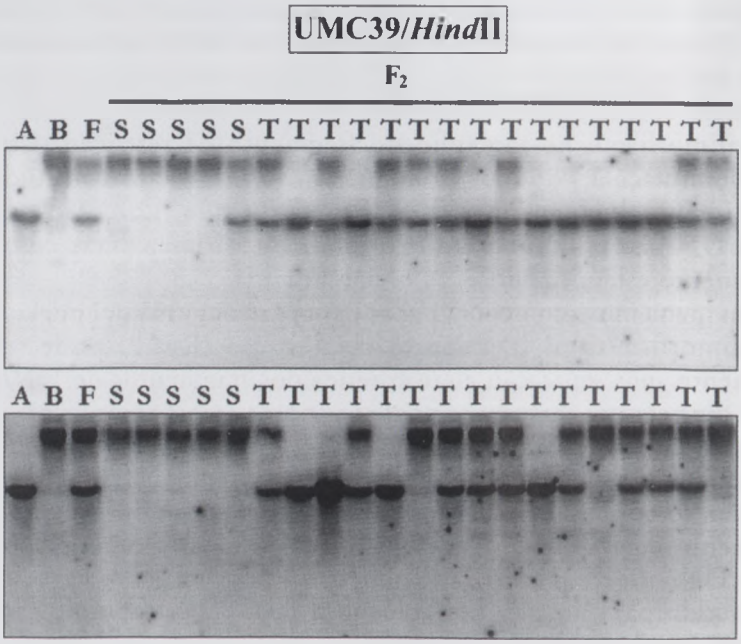


FIGURA 2. Padrão de segregação dos alelos (bandas) obtido pela hibridização da sonda UMC39, com o DNA de indivíduos de uma população F_2 de milho, digeridos com a enzima *Hind*III. A – linhagem Cat-100- 6, B – linhagem S1587-17, F - F_1, S – indivíduos sensíveis ao alumínio, T – indivíduos tolerantes ao alumínio (Sibov *et al.*, 1999).

2.1.1.1 SONDAS

As sondas a serem utilizadas para a detecção de RFLPs, necessitam ser obtidas para a espécie que se deseja estudar. Como existe um certo grau de conservação das seqüências de DNA entre espécies relacionadas, clones obtidos para uma dada espécie podem ser utilizados como sondas heterólogas em outras espécies (Devos *et al.*, 1992; Ahn & Tanksley, 1993; Han *et al.*, 1998). As sondas utilizadas podem ser genômicas ou cDNA: para a obtenção de uma biblioteca genômica de sondas de RFLP o DNA total da espécie de interesse é digerido por uma enzima de restrição (fragmentos de 500 a 2000 pb) e clonado em um plasmídeo; as sondas a partir de cDNA correspondem a genes que necessariamente se expressam e, portanto, são obtidas a partir de um banco de cDNA. O uso de sondas correspondentes a cDNAs limita a análise do polimorfismo às regiões codificadoras, enquanto que, sondas genômicas, também chamadas anônimas, podem corresponder também a regiões não codificadoras presentes no genoma. Entre estas, pode-se obter clones que correspondem à regiões cuja seqüência está presente em cópia única ou em mais de uma região do genoma, ou seja, cópias múltiplas no genoma.

As sondas presentes em cópias múltiplas no genoma são utilizadas principalmente para caracterização de um genótipo através de uma "impressão digital" do DNA (identificação varietal) e/ou estudos de diversidade, enquanto que as sondas presentes em cópia única, são utilizadas preferencialmente no mapeamento genético de características de interesse.

Assim, dada a diferença na constituição e utilização das sondas, após a construção da biblioteca de clones, é necessário efetuar hibridizações do DNA genômico total com os clones obtidos, para obter-se a identificação dos mesmos

como sendo seqüências de cópias únicas ou de cópias múltiplas. Após esta identificação inicial, torna-se necessário um estudo do polimorfismo revelado pelas sondas correspondendo a clones com seqüências de cópias únicas. Este estudo é realizado efetuando-se hibridizações destas sondas com o DNA de poucos indivíduos geneticamente não aparentados, digeridos separadamente por algumas enzimas de restrição. O número de indivíduos e de enzimas de restrição empregados neste teste depende do polimorfismo existente na espécie: em *Lycopersicon esculentum* observou-se que somente de 5% a 10% das sondas revelavam polimorfismo em um conjunto de variedades de tomate, após digestão com três enzimas de restrição, apresentando somente dois alelos por loco (Miller & Tanksley, 1990). Contrariamente, em milho, considerando-se apenas linhagens dentadas européias, 95% das sondas revelaram polimorfismo empregando-se três enzimas de restrição, apresentando mais de seis alelos por loco (Messmer *et al.*, 1992). Assim, para espécies que ainda guardam elevado grau de polimormismo entre os indivíduos, pode-se efetuar a avaliação das sondas empregando-se um número menor de indivíduos e de enzimas de restrição. Um marcador RFLP polimórfico é definido por uma combinação entre uma sonda e uma dada enzima. Muitas vezes, uma mesma sonda detecta polimorfismo com diferentes enzimas, podendo assim revelar um número maior de alelos em um mesmo loco. Estas hibridizações também têm por objetivo identificar os clones que, quando utilizados como sonda, produzem sinal de hibridização intenso e revelam um polimorfismo facilmente distinguível entre os diferentes alelos.

Como dito anteriormente, há ainda a possibilidade de utilização de sondas heterólogas, ou seja, sondas obtidas de uma biblioteca genômica construída com o DNA de outra espécie. Entretanto, o número de sondas heterólogas passíveis de serem utilizadas diminui a medida que as espécies se distanciam evolutivamente, sendo difícil a utilização de sondas de espécies pertencentes a outra família botânica. Neste caso, a utilização de sondas com seqüências de cDNA é mais apropriada. Elas correspondem às regiões codificadoras, as quais evoluem mais lentamente e, portanto, apresentam maior similaridade ao nível de seqüência de bases, produzindo melhores resultados na hibridização. A utilização de sondas heterólogas permite o estudo do polimorfismo em uma ou mais espécies, além daquela cujo DNA foi clonado, sem a necessidade de construir-se outras bibliotecas, possibilitando também a comparação dos mapas genéticos entre elas (Devos *et al.*, 1992).

O número total de sondas a ser obtido depende da finalidade do programa no qual elas serão utilizadas, bem como, do tamanho do genoma da espécie em estudo. Considerando-se uma espécie diplóide com genoma apresentando entre 1000 a 1500cM (centiMorgam: 1 cM = 1% recombinação; dependendo da espécie, 1% de recombinação = $10^6 - 10^7$ pares de bases), para a qual deseja-se obter um mapa genético altamente saturado, isto é, possuindo um marcador a cada 5cM, serão necessários de 320 a 480 marcadores polimórficos (combinação sonda/enzima) distribuídos aleatoriamente no genoma, de forma que, 80% do genoma possa ser avaliado. Deve-se considerar também que, para obter-se 480 marcadores RFLP polimórficos, um número cinco a seis vezes maior de clones é necessário pois, muitos deles corresponderão a seqüências presentes em cópias múltiplas ou apresentarão outra característica que os tornarão inadequados ao uso. Este exemplo simples ilustra o grande trabalho necessário ao desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo RFLP.

2.1.1.2 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO - RFLP

Qualquer tecido pode ser utilizado para extração do DNA a ser analisado. Geralmente são utilizadas folhas jovens congeladas e maceradas ou liofilizadas e moídas, dependendo das condições laboratoriais (disponibilidade de espaço em *freezer* a -70°C para guardar o material congelado). O DNA é então extraído e, uma parcela dele digerido isoladamente por enzimas de restrição. As enzimas preferencialmente utilizadas são aquelas cujos sítios de reconhecimento são constituídos por 6 pares de bases. Se considerarmos um genoma com 10^9 pares de bases, haverá um sítio de reconhecimento desta enzima a cada 4.096 pares de bases (4^6), gerando aproximadamente 250.000 fragmentos de tamanho variado. Após digestão, os fragmentos são separados em gel por eletroforese. Dado o grande número de fragmentos de restrição gerados, é impossível a identificação visual, a partir do gel, de polimorfismo no comprimento de um dado fragmento entre indivíduos diferentes, bem com, a identificação de seus alelos. As sondas moleculares são então empregadas para a identificação deste polimorfismo.

Após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose, eles são desnaturados e transferidos para uma membrana, sendo que sua posição relativa no gel é mantida durante a transferência. A membrana é então colocada em contato com uma solução contendo a sonda também desnaturada e marcada com um isótopo radioativo ou por quimioluminescência. Nestas condições, a sonda vai se hibridizar com a seqüência homóloga correspondente, a qual encontra-se imobilizada na membrana. Após retirado o excesso de sonda, a membrana é colocada em contato com um filme autoradiográfico que, após um período de exposição determinado, apresentará impresso o sinal correspondente ao fragmento que se hibridizou com a sonda utilizada (Figura 3).

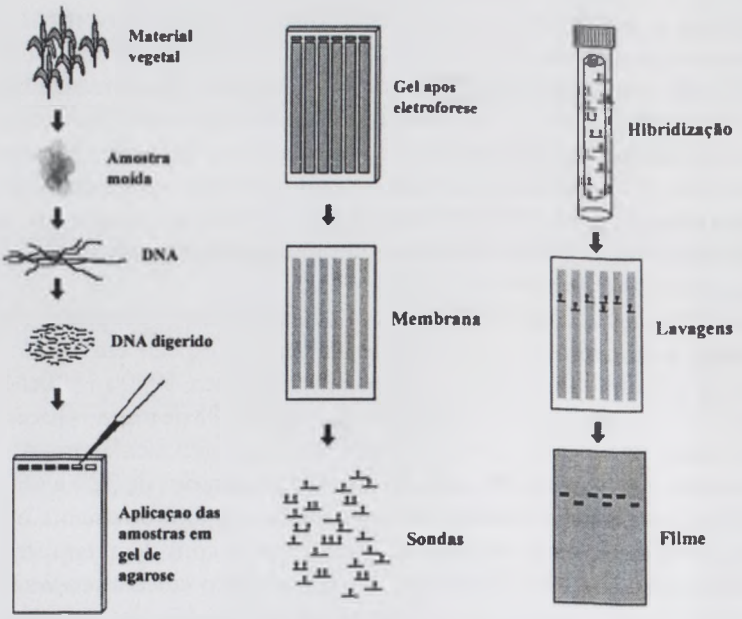


FIGURA 3. Esquema ilustrando a análise e detecção do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição, desde a extração do DNA até a etapa de hibridização com a sonda específica.

A descrição da metodologia empregada para a obtenção das sondas e detecção do polimorfismo de fragmentos de restrição deixa claro que, embora os marcadores RFLP sejam altamente eficientes

e tenham sido muito utilizados no estudo de inúmeras espécies vegetais e animais, eles são dispendiosos em tempo e dinheiro. Atualmente outros tipos de marcadores moleculares têm despertado a atenção dos pesquisadores e melhoristas por serem mais rapidamente obtidos e/ou de fácil utilização. Tais marcadores serão descritos a seguir.

2.1.2 SSR OU MICROSSATÉLITES

Microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) correspondem a seqüências de DNA com poucos pares de bases (2-6) de comprimento repetidas em tandem. Eles foram inicialmente estudados no genoma humano, onde estão presentes em grande número de cópias, dispersas por todo o genoma (Hamada *et al.*, 1992; Litt & Luty, 1989). Posteriormentç, os microssatélites foram identificados nas diferentes espécies estudadas, incluindo o camundongo (Love *et al.*, 1990), rato (Serikawa *et al.*, 1992), porco (Moran, 1993), aves (Cheng & Crittenden, 1994), peixe (Estoup *et al.*, 1993), insetos (Tautz & Ranz, 1984), levedura (Tautz & Ranz, 1984) e várias espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Condit & Hubbell, 1991; Morgante & Olivieri, 1993).

No genoma humano os microssatélites mais comumente encontrados são constituídos por repetições CA. Análise de bancos de seqüências de DNA de plantas indicaram a presença de, preferencialmente, repetições AT (Morgante & Olivieri, 1993). Entretanto, tem-se também observado uma grande quantidade de microssatélites constituídos por repetições GA e GT em diversas espécies de plantas. As repetições CA são bem menos freqüentes em plantas que em animais.

Enquanto o número de repetições em tandem de um microssatélite geralmente varia, a seqüência de bases adjacente ao microssatélite pode ser única no genoma e conservada (no mesmo loco) entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um oligonucleotídeo específico para as seqüências adjacentes a um dado microssatélite, de forma que, através de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Saiki *et al.*, 1985) será possível amplificar este loco em diferentes genótipos. Como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável entre diferentes genótipos, os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo no tamanho do fragmento amplificado (Figura 4).

A explicação exata para a variação encontrada no número de unidades repetidas em tandem nos microssatélites é desconhecida, acredita-se que ela seja causada por falhas durante o processo de replicação ou recombinação do DNA. A importância dos microssatélites como marcadores moleculares reside justamente nesta variação pois, observou-se que para um mesmo microssatélite há varios alelos existentes em uma população, sendo que o nível de heterozigosidade pode ser extremamente elevado. Além disso, este marcadores apresentam herança mendeliana e são codominantes como os RFLPs. Portanto, eles podem ser utilizados como marcadores genotípicos para estudo da diversidade genética, construção de mapas genéticos e caracterização de germoplasma.

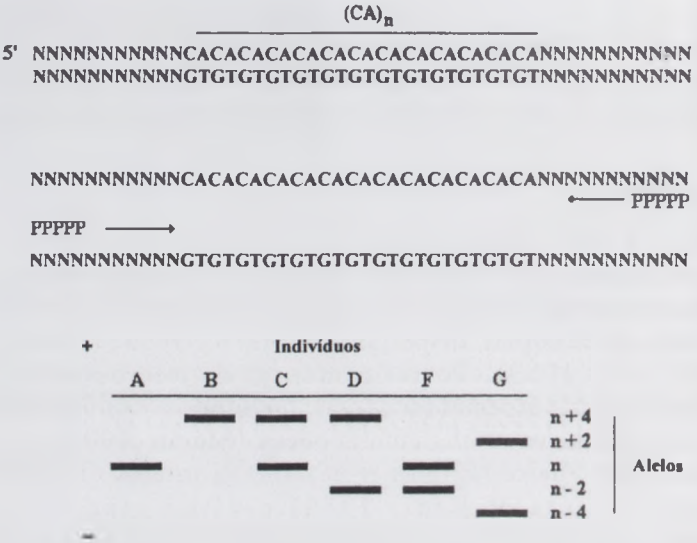


FIGURA 4. Microssatélites: a variação no número de repetições de dinucleotídeos resulta na variação do tamanho dos fragmentos amplificados. Esta variação é visualizada em gel de acrilamida ou de agarose com alto poder de resolução. PPP = oligonucleotídeo adjacente às repetições em tandem, utilizado para amplificação do microssatélite em diferentes indivíduos.

2.1.2.1 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM PLANTAS

O desenvolvimento de microssatélites envolve o conhecimento das seqüências únicas adjacentes à região contendo as repetições em tandem, para que seja possível designar um loco específico. Estas seqüências podem ser obtidas inicialmente, embora em pequeno número e apenas para algumas espécies, através de buscas em bancos de dados de seqüências de bases. Entretanto, a obtenção de um conjunto completo de microssatélites para uma espécie somente é possível através de um programa de desenvolvimento de microssatélites. Para tanto, basicamente, faz-se uma biblioteca genômica utilizando-se fragmentos de pequeno tamanho (200 - 600 pares de bases) os quais sofreram uma seleção prévia quanto à presença neles, de repetições em tandem. Desta forma, a biblioteca resultante estará "enriquecida" em clones que podem gerar microssatélites. Em seguida, os clones são hibridizados em condições de alta estringência com sondas constituídas por oligonucleotídeos apresentando as repetições encontradas nos microssatélites, como por exemplo $(GA)_{15}$, $(GT)_{15}$ ou $(CT)_{15}$. Os clones positivos são inicialmente analisados através de uma amplificação seletiva, para deduzir-se onde está localizada a repetição em relação a ambas as extremidades do fragmento clonado. Esta verificação é importante pois, como é necessário conhecer-se as seqüências únicas presentes adjacentes à repetição, se esta última estiver localizada na extremidade do fragmento clonado, não será possível conhecer a seqüência única adjacente e, conseqüentemente, será impossível desenhar oligonucleotídeos capazes de amplificar o loco em questão (Rafalski *et al.*, 1996).

Uma vez detectados os clones desejados, eles devem ser seqüenciados e a região contendo a seqüência única é utilizada para desenho dos oligonucleotídeos a serem empregados na amplificação deste loco em diferentes genótipos. Visando a facilitação da etapa de detecção do polimorfismo, os oligonucleotídeos são desenhados, sempre que possível, de forma que o produto de amplificação tenha no máximo 250 pb. Em seguida, o par de oligonucleotídeos é utilizado para amplificação do loco, a partir do DNA genômico de diferentes indivíduos. Este procedimento é feito para a

identificação e caracterização dos alelos do microssatélite entre diferentes genótipos.

Esta breve descrição do método empregado para a obtenção de microssatélites é suficiente para demonstrar o grande trabalho necessário ao desenvolvimento de cada novo microssatélite, além de seu elevado custo. Adicionados a estes, temos o fato de que o laboratório deve ser suficientemente equipado e possuir pessoal qualificado para iniciar um programa de desenvolvimento de microssatélites. Para que estes marcadores possam ser utilizados adequadamente como ferramentas tanto no melhoramento genético como na análise e conservação de germoplasma, é necessário que um número grande deles esteja disponível para a espécie em estudo.

Atualmente, muitas espécies já possuem um conjunto de microssatélites disponível para utilização em estudos genéticos. Entre estas estão soja (Akkaya *et al.*, 1992), milho (Senior & Heun, 1993), trigo (Röde *et al.*,1995), arroz (Wu & Tanksley, 1993), melão e pepino (Katzir *et al.*, 1996), melancia (Jarret *et al.*, 1997), maçã (Guilford *et al.*, 1997), cevada (Becker & Heun, 1995) e sorgo (Taramino, *et al.*, 1997). Excetuando-se milho, arroz, soja e trigo, o número de microssatélites desenvolvidos até o momento para as outras espécies é ainda pequeno. Este fato deve-se justamente ao elevado custo do desenvolvimento deles, sendo, no momento, justificável apenas para culturas de grande importância econômica.

2.1.2.2 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO - MICROSSATÉLITES

Considerando-se que os alelos de um loco identificado por um microssatélite podem diferir em apenas dois pares de bases quanto ao comprimento do fragmento amplificado, é necessário empregar-se um sistema de identificação do polimorfismo que seja de alta resolução. Géis desnaturantes de poliacrilamida proporcionam resolução suficiente para detectar-se diferenças de tamanho tão pequeno quanto um único par de bases. Entretanto, para a visualização dos fragmentos amplificados nestes géis, é necessário empregar-se marcação radioativa (ou um sistema baseado em quimioluminescência) do fragmento ou cloração do gel com prata. Ambos os procedimentos adicionam um grande trabalho ao processo necessário à detecção do polimorfismo, encarecendo-o e reduzindo sobremaneira a velocidade de aquisição dos dados.

Um sistema alternativo para a detecção do polimorfismo em gel de poliacrilamida é a marcação dos produtos amplificados com compostos fluorescentes. Sua análise é então efetuada em um seqüenciador automático que detecta fluorescência, o que levará a uma extrema acurácia na determinação do tamanho dos fragmentos. Além disso, este sistema leva a fácil automatização da genotipagem através da eficiente aquisição, análise e armazenamento dos dados.

No entanto, não havendo a disponibilidade de um seqüenciador automático, sempre que o polimorfismo entre os alelos permitir, pode-se utilizar géis preparados com concentrações elevadas (3,0 –3,5%) de agaroses especiais, cujos nomes comerciais são Nusieve, Metaphor (FMC Bioproducts) ou SFR (Amresco), os quais também possuem alto poder de resolução e podem ser corados com brometo de etídeo, sendo que os fragmentos amplificados são facilmente visualizados (Figura 5).

Os microssatélites, como já mencionado, apresentam as mesmas vantagens dos marcadores RFLPs, sendo codominantes e específicos e, portanto, excelentes

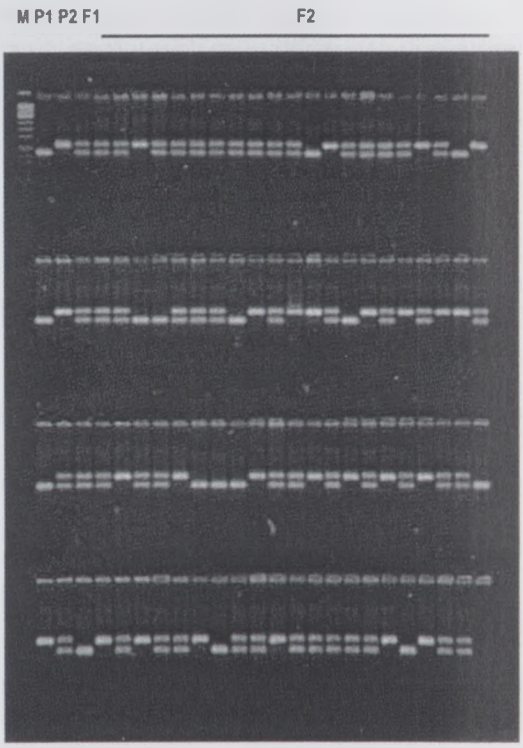


FIGURA 5. Padrão de segregação dos alelos (fragmentos) obtidos por amplificação do microssatélite PHI037 nos genitores (P_1 e P_2), na geração F_1 e na população F_2 correspondente de milho. Visualização dos alelos em gel de agarose:Metaphor 4% (1:1), após coloração com brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta (Sibov, S.T.; Resende, A.; Garcia, AF.; Souza Jr., CL e Souza, A.P.; resultados não publicados). M – marcador de peso molecular (ϕX174/Hinf I).

para a construção de mapas genéticos. Sua grande vantagem em relação aos RFLPs é justamente a possibilidade de automatização e facilidade de detecção do polimorfismo entre indivíduos. Por enquanto, devido ao seu desenvolvimento ser bastante oneroso e ao fato de existir apenas um pequeno número deles disponível para a maioria das espécies vegetais, seu emprego tem sido limitado ao estudo da divergência genética, sempre associado a outros marcadores.

2.2 MARCADORES MOLECULARES MULTILOCO DOMINANTES E NÃO ESPECÍFICOS

Os marcadores desta classe, diferentemente daqueles loco-específicos, não são dirigidos a uma região particular do genoma. Eles revelam o polimorfismo presente em dezenas de locos simultaneamente. Esta propriedade permite que, com relativamente poucas análises, seja possível caracterizar um genótipo sem ambigüidades. Assim, eles são utilizados principalmente com a finalidade de se conhecer a "impressão digital ao nível do DNA" de indivíduos podendo, entretanto, ser utilizados quando se deseja saturar uma região específica do mapa genético com marcadores moleculares. Os dois marcadores mais utilizados desta classe são os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

2.2.1 RAPD

O princípio do RAPD consiste em realizar-se uma reação de PCR utilizando-se o DNA do indivíduo em estudo e um oligonucleotídeo curto, composto por 10 nucleotídeos, de seqüência arbitrária (Willians *et al.*, 1990). Estes oligonucleotídeos, quando sob condições apropriadas de temperatura (38-42°C), vão se "anelar" às seqüências do genoma que lhes são parcial ou totalmente complementares. Quando há no genoma dois sítios complementares ao oligonucleotídeo empregado para a amplificação, localizados em direções opostas e distantes entre si, no máximo, por 3.000 pares de bases, ocorre amplificação da região (Figura 6). Um mesmo

oligonucleotídeo pode ser complementar a diferentes regiões do genoma, as quais serão amplificadas simultaneamente, produzindo vários fragmentos. Geralmente o número de produtos amplificados com um dado oligonucleotídeo não ultrapassa a quinzena, e eles podem ser separados em um gel de agarose ou poliacrilamida, sendo visualizados após coloração com brometo de etídeo ou prata, conforme o tipo de gel.

Aproximadamente na mesma época do surgimento do RAPD, outras técnicas foram propostas, as quais empregam exatamente o mesmo princípio do RAPD, ou seja, a utilização de oligonucleotídeos com seqüências arbitrárias para amplificação de sítios aleatórios do genoma. Entre elas, as mais conhecidas são o AP-PCR (*Arbitraryed Primed Polymerase Chain Reaction* – Welsh & McClelland, 1990) e DAF (*DNA Amplified Fingerprinting* – Caetano-Anólles *et al.*, 1991)

O polimorfismo detectado por marcadores do tipo RAPD é resultante de mutações ou rearranjamentos no sítio ou entre os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos no genoma. Assim, quando um mesmo oligonucleotídeo é empregado para a amplificação de fragmentos a partir do DNA de diferentes indivíduos, o polimorfismo será observado pela presença ou ausência de determinados fragmentos entre os mesmos. O polimorfismo observado é do tipo dominante, ou seja, não é possivel separar através da visualização do produto de amplificação no gel, os indivíduos que são homozigotos para a presença do(s) sítio(s) de anelamento do oligonucleotídeo em um dado loco, daqueles que são heterozigotos para a presença dele(s). Em ambos os casos haverá a amplificação do fragmento. Os indivíduos que são homozigotos para a ausência do(s) sítio(s) de anelamento do oligonucleotídeo não apresentarão amplificação do fragmento (Figura 7).

A característica dominante deste marcador poderá trazer desvantagens na análise de populacões segregantes utilizadas no mapeamento de características de interesse, pois não será possível discriminar os heterozigostos. Porém a facilidade de uso deste marcador, aliada ao baixo custo e ao fato dele não ser espécie-específico, tranformou o RAPD no principal marcador utilizado na análise da diversidade genética ou na construção de mapas genéticos e mapeamento de genes em espécies onde não há marcadores codominantes específicos desenvolvidos (Waugh & Powell, 1992).

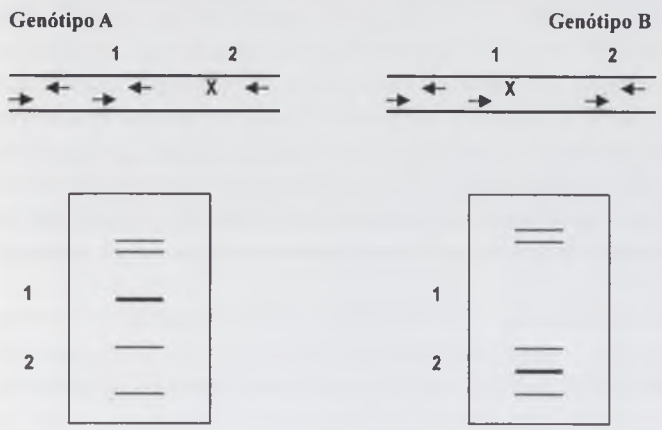


FIGURA 6. RAPD. Amplificação dos genótipos A e B com um oligonucleotídeo. As setas representam a presença dos sítios de anelamento do oligonucleotídeo. A ausência de um sítio de anelamento (indicado por X) levará a não amplificação do fragmento 2 no genótipo A e do fragmento 1 no genótipo B. O perfil de bandas obtido para os genótipos A e B revela este polimorfismo.

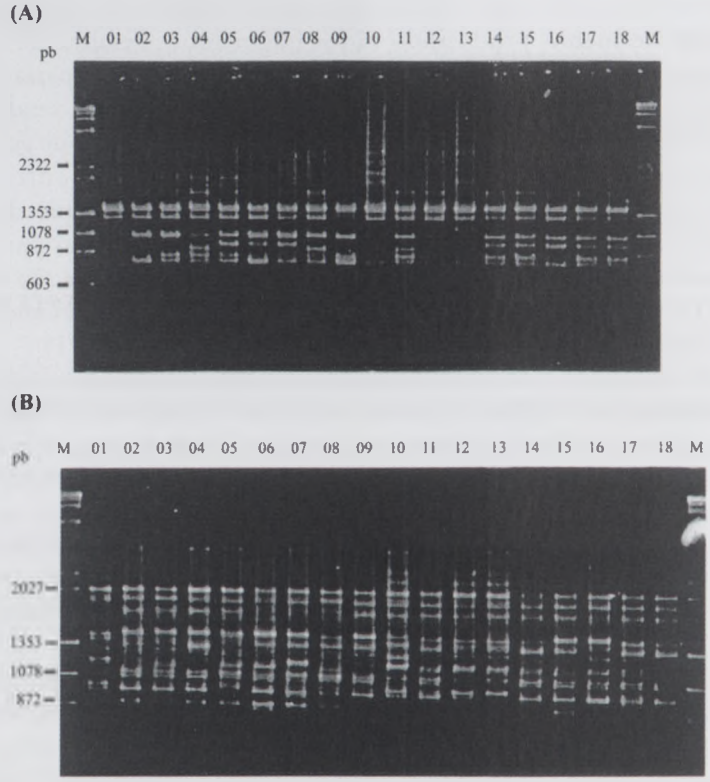


FIGURA 7. Perfil de RAPD obtido com os oligonucleotídeos (A) OPB-12 e (B) OPB-17 em 18 linhagens de milho. (M) marcador de peso molecular l/ *HindIII* e ϕX174/ *HaeIII* (Lanza, 1996).

2.2.1.1 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO - RAPD

Contrariamente aos RFLPs ou microssatélites, os marcadores RAPDs não exigem qualquer sistema especial para detecção do polimorfismo, tais como hibridizações, marcação radioativa ou com compostos quimioluminescentes, nem conhecimento prévio de seqüências de DNA da espécie em estudo. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados é, na maioria das vezes, facilmente visualizado em gel de agarose após coloração com brometo de etídeo. Além disso, são necessários poucos nanogramas de DNA (5-30ng) para as amplificações, o que facilita muito a etapa de extração do DNA, devido à possibilidade do emprego de técnicas simples e rápidas para a obtenção do mesmo. Entretanto, a reprodutibilidade dos experimentos pode ser baixa, sendo necessário tomar-se cuidados especiais tanto com a otimização da técnica para cada espécie, quanto com a condução dos experimentos. A reprodutibilidade é afetada por vários fatores, incluindo a concentração de DNA, velocidade de mudança nas temperaturas durante os ciclos de amplificação, concentração dos íons de magnésio e tipo da polimerase termoestável utilizada (Williams *et al.*, 1993).

Inicialmente, tendo-se escolhido os indivíduos a serem analisados, deve-se fazer um teste para avaliar o polimorfismo gerado por um conjunto de oligonucleotídeos. Este teste levará à seleção, entre os oligonucleotídeos disponíveis, daqueles que produzem o maior número de fragmentos polimórficos entre os

indivíduos. Para tanto, um pequeno número de indivíduos é analisado com um grande número de oligonucleotídeos (geralmente comercializados pela empresa *Operon Technologies* nos EUA ou *University of British Columbia* no Canadá). Após contagem do número de bandas polimórficas entre os indivíduos obtidas para cada oligonucleotídeo pode-se escolher aqueles que revelam o maior número de bandas polimórficas. Estes são então utilizados para a análise de todos os indivíduos da população em estudo.

2.2.2 AFLP

Os marcadores AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são os mais recentemente desenvolvidos e aplicados no estudo genético de plantas e animais. A técnica foi desenvolvida por Zabeu & Vos (1993) e combina os alvos para estudo do polimorfismo pelos marcadores RFLP e RAPD: a distribuição aleatória de sítios de restrição entre genomas e a amplificação aleatória de fragmentos empregando-se oligonucleotídeos com seqüências arbitrárias. Além de combinar as duas estratégias para detectar-se o polimorfismo, a técnica também combina a estabilidade do RFLP, em termos da obtenção de resultados altamente reprodutíveis, com a informatividade e rapidez do RAPD. Ajustando-se a combinação de oligonucleotídeos à espécie em estudo, é possivel obter-se de 100 a 150 fragmentos (locos) amplificados simultaneamente em um único experimento, demonstrando assim, a alta informatividade presente em cada ensaio (Vos *et al.*, 1995).

A técnica é baseada na amplificação seletiva de um subconjunto de fragmentos genômicos gerados após digestão com uma dada enzima de restrição. Assim, o AFLP gera um grande número de marcadores simultaneamente, semelhante aos marcadores do tipo RAPD. Por suas características, o AFLP é considerado uma técnica de *DNA fingerprinting*. Por esta razão, ele tem sido utilizado principalmente no estudo da diversidade genética entre indivíduos de diferentes espécies (Hill *et al.*, 1996; Maughan *et al.*, 1996; Hongtrakul *et al.*, 1997; Perera *et al.*,1998; Cervera *et al.*, 1998; entre outros).

A técnica é constituída das seguintes etapas (Figura 8): o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição e, às extremidades dos fragmentos de DNA obtidos, liga-se um "adaptador" dupla fita, ou seja, um pequeno segmento de DNA constituído por uma seqüência arbitrária e o sítio de restrição da enzima utilizada na digestão do DNA. Desta forma, após a ligação do adaptador, todos os fragmentos obtidos na digestão possuirão exatamente as mesmas seqüências de bases nas extremidades, sendo extremamente fácil amplificá-los utilizando oligonucleotídeos complementares à estas seqüências. A amplificação deles será altamente específica, contrariamente ao que ocorre no RAPD. Por esta razão o AFLP é muito mais estável e reprodutível.

Entretanto, o número de fragmentos gerados na digestão de um genoma vegetal, de tamanho médio 4,5 $x10^9$ pares de bases, é muito grande o que torna muito complexa a avaliação do polimorfismo. Assim, é necessário efetuar-se a seleção de um subconjunto de fragmentos a serem amplificados. Desta maneira, o oligonucleotídeo a ser utilizado na primeira amplificação é constituído pela seqüência de bases complementares ao adaptador, adicionada de um nucleotídeo seletivo (que pode conter qualquer uma das 4 bases: A, C, G ou T) em sua extremidade 3'.

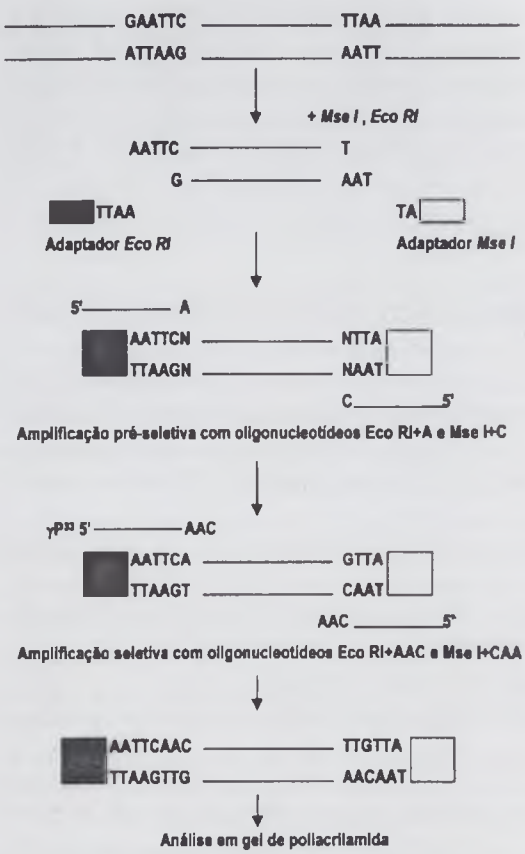


FIGURA 8. AFLP: ilustração das etapas de digestão com Eco RI e Mse I, ligação do adaptador, pré-amplificação e amplificação seletiva com os oligonucleotídeos escolhidos (adaptação da figura em AFLP™ Analysis System, Gibco-BRL).

A utilização deste oligonucleotídeo na amplificação por PCR, em condições de anelamento específico, resultará na amplificação apenas dos fragmentos que possuem tal nucleotídeo adjacente ao sítio de restrição. Esta é a primeira seleção efetuada na amplificação, portanto, é denominada de "amplificação pré-seletiva". Geralmente ela é efetuada apenas no estudo de genomas grandes (por exemplo, as espécies vegetais), onde o número de fragmentos gerados por digestão é muito elevado.

O próximo passo corresponde à "amplificação seletiva", onde nova amplificação por PCR é efetuada, utilizando-se oligonucleotídeos constituídos pela seqüência do adaptador adicionada de três nucleotídeos aleatórios em sua porção 3'. Obviamente, o primeiro destes três nucleotídeos deverá ser igual àquele utilizado na pré-amplificação, para os casos onde ela foi efetuada. Assim, promove-se uma segunda seleção dos fragmentos que serão amplificados. O subconjunto de fragmentos amplificados é analisado em gel desnaturante de poliacrilamida.

Quando compara-se o perfil dos fragmentos de DNA obtidos para cada genótipo, observa-se bandas comuns, bem como, bandas presentes em alguns e ausentes em outros genótipos. As diferenças correspondem ao polimorfismo detectado de forma dominante pelo AFLP. Estas diferenças podem ser resultantes de modificações dos sítios de restrição devido à mutação, deleção ou adição de novas bases, bem como inserções, deleções ou inversões de seqüências entre os dois sítios de restrição. Assim, o polimorfismo revelado pelo AFLP é, da mesma forma que para o RFLP, resultante de alterações envolvendo o sítio de restrição da enzima. Porém, adicionalmente, o AFLP também avalia o polimorfismo na seqüência de bases imediatamente adjacente ao sítio de restrição, através da pré-amplificação e/ou amplificação seletiva.

O polimorfismo gerado pode ser codominante, devido à diferença no tamanho do fragmento de restrição entre dois alelos, ou dominante, devido à presença ou

ausência de um dado sítio de restrição entre dois genótipos. Ambos os tipos de polimorfismos são detectáveis; entretanto, as relações alélicas entre polimorfismo codominante e dominante são extremamente difíceis de serem determinadas e certamente este é o maior problema do AFLP. Embora existam estratégias mais ou menos complexas para se identificar o polimorfismo dominante e codominante, possíveis de serem utilizadas em estudos de mapeamento, a análise do polimorfismo observado tem sido efetuada principalmente considerando-o como sendo ele do tipo dominante. Apesar disso, devido a outras vantagens associadas aos marcadores AFLP, eles têm sido utilizados na construção de mapas genéticos e mapeamento de genes de interesse em diferentes espécies (Wang *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Nandi *et al.*, 1997; Virk *et al.*, 1998).

2.2.2.1 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO - AFLP

A detecção do polimorfismo gerado por AFLPs é de certa forma, mais trabalhosa que as outras técnicas anteriormente mencionadas. Embora esta técnica seja altamente eficiente no estudo genético das plantas, tanto ao nível de diversidade quanto identificação varietal e mapeamento, é necessário alguma familiaridade do laboratório com técnicas moleculares.

O DNA a ser utilizado necessita ser altamente puro, para eliminar a presença de compostos que poderiam gerar digestão parcial dele. O sucesso da técnica depende da digestão completa do DNA. Este DNA é então digerido por duas enzimas de restrição, preferindo-se a utilização de uma que reconheça sítio com 6 bases e a outra sítio com 4 bases. Esta escolha leva à produção de grande número de fragmentos de pequeno tamanho que serão facilmente amplificados e estão na faixa de tamanho dos fragmentos que podem ser resolvidos em gel de acrilamida. Em seguida, ligam-se dois adaptadores diferentes aos fragmentos de DNA: cada um complementar ao sítio de restrição de uma das enzimas utilizadas na digestão. Estudos do tamanho dos fragmentos gerados em relação ao polimorfismo revelado indicaram que a amplificação dos fragmentos tendo uma enzima com sítio de corte de seis bases em uma extremidade e outra com sítio de corte de quatro bases na extremidade oposta produziram melhores resultados (Rafalski *et al.*, 1996). Portanto, a pré-amplificação e a amplificação seletiva são efetuadas com dois oligonucleotídeos diferentes, cada um deles contendo nucleotídeos adjacentes ao sítio de restrição de uma das enzimas utilizadas na digestão.

Os fragmentos amplificados são separados em gel desnaturante de acrilamida. Eles podem ser visualizados após coloração com prata. Alternativamente, um dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação seletiva é marcado radioativamente e sua detecção é feita após a secagem do gel e sua exposição à um filme autoradiográfico (Figura 9). Recentemente, têm-se utilizado oligonucleotídeos marcados com compostos fluorescentes e, os fragmentos amplificados são analisados em um sequenciador automático. Assim, é possivel utilizar-se compostos fluorescentes diferentes para a marcação dos oligonucleotídeos e efetuar a avaliação de até quatro reações diferentes em uma mesma pista do gel de seqüenciamento. Esta variação apresenta a vantagem da automatização e aquisição rápida de uma grande quantidade de dados.

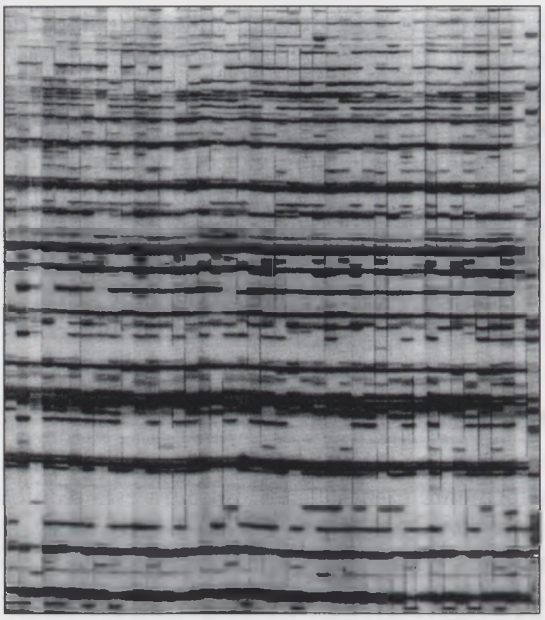


FIGURA 9. Perfil de bandas AFLP obtido para 42 clones de cana-de-açúcar. O polimorfismo dos fragmentos AFLP é indicado pela presença e ausência de bandas de mesmo tamanho entre os clones (Lima *et al.*,

2.3 DIFERENTES TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

Os quatro tipos de marcadores citados anteriormente (RFLP, SSR, RAPD e AFLP) são os mais utilizados atualmente no estudo do genoma de plantas e animais. Entretanto, na literatura existem outros que, muitas vezes, apresentam apenas uma pequena modificação em relação a algum desses mencionados. Desta forma, com a finalidade de informar sobre os tipos de marcadores existentes, a seguir há uma breve descrição de vários marcadores e a nomenclatura encontrada na literatura:

AP-PCR (*Arbitrary Primer PCR*) – PCR com oligonucleotídeos aleatórios: semelhante ao RAPD, constitui-se por amplificações ao acaso utilizando oligonucleotídeos com 20 bases, empregando-se temperaturas de anelamento inferiores à Tm exigida pelo oligonucleotídeo. Desta forma, ele se anelará à diferentes seqüências no genoma, amplificando vários fragmentos simultaneamente (Welsh & McClelland, 1990).

CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) – Seqüência polimórfica amplificada e clivada: constitui-se da digestão com enzimas de restrição de fragmentos polimórficos amplificados. Um fragmento de DNA genômico amplificado com oligonucleotídeos específicos é digerido por enzimas de restrição para que seja revelado o polimorfismo nos sítios de restrição presentes no fragmento. O polimorfismo é detectado após migração em gel de agarose ou poliacrilamida. Este marcador tem a vantagem de ser codominante (Konieczny & Ausubel, 1993).

DAF (*DNA Amplified Fingerprinting*) – "Impressão digital" a partir do DNA amplificado: mesmo princípio que o RAPD, utilizando oligonucleotídeos mais curtos (com 5 a 10 bases). Os perfis eletroforéticos dos produtos amplificados são extremamente complexos, apresentando um grande número de bandas. Devido a isto, ele é comparado a uma "impressão digital" a partir dos fragmentos amplificados com um dado oligonucleotídeo (Caetano-Anólles *et al.*, 1991).

DGGE (*Differential Gradient Gel Electrophoresis*) – Eletroforese em gel com gradiente diferencial: corresponde ao polimorfismo visualizado em um fragmento amplificado após migração dele em um gel de acrilamida contendo um gradiente do produto desnaturante (uréia ou formamida). Sob estas condições de migração, o fragmento inicialmente dupla fita, será parcialmente desnaturado em uma região específica do gel, dependendo de sua constituição em bases. Desta forma, será formanda uma estrutura "ramificada", que lembra a letra Y, devido à desnaturação de apenas uma das extremidades do fragmento de DNA. A formação desta estrutura leva a uma modificação na mobilidade eletroforética do fragmento possibilitando assim, a detecção de fragmentos com polimorfismo na seqüência de bases. Conforme já mencionado, a seqüência de bases do fragmento vai determinar a zona do gradiente onde ele será desnaturado (Myers *et al.*, 1987).

IMA (*Inter Microsatellite Amplification*) – Amplificação inter-microssatélites: amplificação do DNA genômico com oligonucleotídeos cuja seqüência de bases é constituída de um motivo repetido (geralmente dinucleotídeo) seguido ou precedido (respectivamente, em 3' ou em 5' da repetição) de 2 a 6 bases definidas ao acaso. Este oligonucleotídeo amplificará fragmentos do genoma situados entre os locos microssatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Este tipo de marcador também é conhecido por inter-SSR PCR, ISA (*Inter Sequence Amplification*), IRA (*Inter Repeat Amplification*) etc.

SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) – Região amplificada com seqüência conhecida: fragmento de DNA genômico amplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos (14 a 20 bases). Estes oligonucleotídeos são definidos após conhecimento da seqüência de bases do fragmento. Esta técnica originou-se a partir do isolamento seguido de seqüenciamento de fragmentos amplificados por RAPD (Paran & Michelmore, 1993).

SSCP (*Single Strand Conformation Profile*) – Perfil (ou polimorfismo) de conformação da fita simples: análise da conformação de fragmentos especificamente amplificados, desnaturados e migrados em gel de acrilamida. As fitas simples assumirão uma conformação estrutural diferente conforme a seqüência de bases que elas apresentam, a qual modificará a mobilidade eletroforética da mesma. Assim, através da comparação da migração das fitas simples de um mesmo fragmento amplificado em diferentes indivíduos, é possível determinar aqueles que apresentam polimorfismo na seqüência de bases (Orita *et al.*, 1989).

STS (*Site Tagged Sequence*) – Seqüência sítio específica: corresponde a toda e qualquer seqüência genômica amplificada com oligonucleotídeos específicos. Muitas vezes faz-se referência a este tipo de marcador quando efetua-se a conversão de uma sonda RFLP em uma amplificação PCR-específica, ou seja, uma sonda utilizada para o RFLP é seqüenciada e desenha-se oligonucleotídeos específicos para a amplificação deste loco a partir do DNA genômico (Olso *et al.*, 1989).

3. APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Desde a sugestão feita por Boltstein *et al.* (1980) para utilização de RFLPs no mapeamento, inúmeras outras aplicações surgiram (revisto por Lee, 1995),

principalmente com o advento de novos sistemas de marcadores moleculares, baseados na amplificação do DNA por PCR (Saiki *et al.*, 1985). As aplicações dos marcadores moleculares serão abordadas em detalhes em programas específicos, em outros capítulos deste livro. A seguir, serão descritas as possibilidades de aplicação dos marcadores moleculares em diferentes etapas do melhoramento genético, desde a coleta e conservação do material até a caracterização varietal.

As diferentes aplicações de marcadores moleculares no melhoramento podem ser agrupadas em três grandes grupos:

- Análise da diversidade genética entre indivíduos;
- Construção de mapas genéticos e mapeamento de características de interesse (qualitativas e/ou quantitativas);
- Seleção assistida por marcadores moleculares.

3.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS

Geralmente estuda-se a diversidade entre indivíduos tendo-se por objetivo, a identificação de genótipos de interesse específico, a gestão de recursos genéticos e/ou a divisão dos genótipos em grupos heteróticos.

O fato da lei que promove a proteção da propriedade intelectual ser aplicada às cultivares desenvolvidas pelos melhoristas, levou à necessidade de caracterização detalhada do material resultante dos programas de melhoramento. Atualmente esta caracterização é feita considerando-se principalmente as características morfológicas da cultivar, entretanto, os marcadores moleculares são uma excelente ferramenta para promover esta caracterização ao nível molecular. As duas grandes vantagens dela são: a possibilidade de efetuar estas análises no laboratório e, a independência dos fatores ambientais que podem interagir com o genótipo, produzindo fenótipos diferentes do esperado. Ainda nesta linha de caracterização varietal, os marcadores moleculares têm grande aplicação na verificação da pureza varietal de lotes de sementes. Através do emprego de marcadores moleculares que produzem um perfil de bandas característico à cada genótipo, é possível identificar facilmente contaminações em lotes de sementes de cultivares constituídas por linhas puras ou híbridos a partir de linhagens conhecidas.

Como os marcadores moleculares possibilitam a quantificação da similaridade genética entre genótipos e, conseqüentemente, a estruturação da divergência genética, através do seu emprego é possível organizar grupos de indivíduos de acordo com a similaridade entre eles. Assim, eles são utilizados na análise de bancos de germoplasma, onde são empregados na avaliação da diversidade existente entre os acessos e na construção de coleções nucleares.

Ainda no estudo dos recursos genéticos, eles podem ser empregados para a análise genética de populações presentes na natureza, em particular, daquelas espécies ameaçadas de extinção, cuja coleta e conservação necessitam ser bem definidas e efetuadas a partir do conhecimento da diversidade genética existente.

O conhecimento da diversidade entre os indíviduos é útil no melhoramento genético para o gerenciamento da variabilidade genética disponível, através da escolha dos genitores a serem utilizados nos cruzamentos, podendo-se assim maximizar a

diversidade entre eles. Neste sentido, os marcadores moleculares podem ser utilizados para conferência da genealogia histórica do conjunto de genitores, validando-a ou corrigindo as falhas existentes. Além disso, o estudo da diversidade entre linhagens possibilita o arrajamento delas em grupos que, quando intercruzados dão melhores resultados. Vários estudos de diversidade realizados com linhagens de milho temperadas (Messmer *et al.*, 1991; 1992; Melchinger *et al.* 1991; Livini *et al.*, 1992; Mumm & Dudley, 1994) mostraram que empregando-se as distâncias obtidas através dos marcadores moleculares é possivel separá-las corretamente segundo o grupo heterótico de origem. Esta aplicação tem inestimável valor para o estudo do germoplasma tropical de milho, cuja divisão em grupos heteróticos não é tão bem definida como para o material temperado.

Da mesma forma, têm-se investigado as relações entre distância genética x heterose e distância genética x capacidade específica de combinação em diversas espécies, destacando-se os estudos em milho (Lee *et al.*, 1989; Godshalk *et al.*, 1990; Melchinger *et al.*, 1990; Lanza *et al.*, 1997; Anjmone Marsan *et al.*, 1998; Benchimol *et al.*, 2000). De maneira geral, em milho, não se tem observado uma forte correlação entre elas quando são considerados genótipos originados de grupos heteróticos diferentes. Isto significa que, embora a distância genética obtida entre marcadores moleculares seja uma boa medida para se determinar os grupos heteróticos aos quais pertencem as linhagens, ela não tem fornecido boas predições da heterose em cruzamentos entre estas linhagens. Entretanto, o fato da distância genética servir para colocar as linhagens em grupos heteróticos diferentes possibilita a organização dos cruzamentos, principalmente considerando-se o germoplasma para o qual não há conhecimento prévio quanto à sua alocação em um grupo bem definido.

3.2 CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS E MAPEAMENTO DE CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE (QUALITATIVAS E/OU QUANTITATIVAS)

Os mapas genéticos são estabelecidos através do estudo da transmissão de caracteres estudados dois a dois, sendo que o *crossing-over* é a base da noção de ligação. Para se estabelecer um mapa genético é portanto necessário que os genitores apresentem polimorfismo entre si para as características a serem mapeadas e que, a partir deles, seja obtida uma população segregante numerosa.

Os primeiros mapas genéticos foram obtidos a partir de caracteres morfológicos polimórficos entre os genitores. Assim, o primeiro mapa genético foi desenvolvido para o cromossomo sexual em Drosophila por Sturtevant (1913).

O desenvolvimento de mapas genéticos baseados em características morfológicas é demorado e sofre do fato das mesmas serem em número finito. Assim, o surgimento dos marcadores moleculares representou uma revolução para o mapeamento de plantas pois, devido às suas características, foi possível mapear em curto espaço de tempo (10 anos aproximadamente) mais de quarenta espécies vegetais cultivadas, incluindo espécies perenes e anuais. Entre as espécies economicamente mais importantes mapeadas ainda na década de 80, ou seja, menos de 10 anos após a proposição do uso de marcadores moleculares do tipo RFLP no mapeamento (Botstein *et al.*, 1980), encontram-se o milho (Helentjaris *et al.*, 1986), arroz (McCouch *et al.*, 1988) trigo (Chao *et al.*, 1989) e batata (Gebhardt *et al.*, 1989).

O rápido desenvolvimento de mapas genéticos para espécies vegetais foi resultante principalmente do polimorfismo elevado presente em diversas espécies e da facilidade de obtenção de um grande número de indivíduos na população segregante. O princípio para o estabelecimento de mapas genéticos empregando-se marcadores moleculares é o mesmo utilizado para o mapeamento de características morfológicas: utiliza-se uma população segregante descendente de genitores polimórficos para os marcadores a serem mapeados. Quando vários marcadores não segregam de maneira independente, ou seja, a taxa de recombinção é inferior a 50%, eles formam um grupo de ligação. Utilizando-se um número de marcadores suficientemente grande, ao final do mapeamento consegue-se atribuir cada grupo de ligação a um cromossomo. Obviamente, a quantidade de dados gerada para a construção de um mapa genético com marcadores moleculares exige a utilização de um programa computacional. Entre os programas desenvolvidos especificamente para populações segregantes do tipo F_2, haplóides duplicados, retrocruzamento ou linhagens recombinantes têm-se o Mapmaker (Lander *et al.*, 1987), G Mendel (Liu & Knapp, 1992), JoinMap (Stam, 1993) e Qgene (Nelson, 1997) entre outros. O mapa é construído em duas etapas: inicialmente há a elaboração dos grupos de ligação e, porteriormente, o ordenamento dos marcadores em cada grupo de ligação.

O tamanho da populacão utilizada depende da precisão desejada e, como será visto adiante, do tipo de característica a ser mapeada: geralmente 50 a 100 indivíduos constituem a população para construção do mapa genético de uma espécie. Outro fator importante é o tipo de população segregante e as características do marcador: os melhores resultados são obtidos com populações F_2 e marcadores codominantes (RFLPs ou microssatélites) devido ao menor grau de distorção da freqüência dos alelos associado ao conhecimento completo do genótipo (distinção entre heterozigoto e homozigoto) dos indivíduos em cada loco.

A partir da existência do mapa genético para uma espécie e, conseqüentemente, da disponibilidade de marcadores moleculares, é possível mapear-se genes de interesse, sejam estes de herança qualitativa ou quantitativa (QTL – *Quantitative Trait Locus* – Lander & Botstein, 1989). Em ambos os casos é necessário efetuar-se um cruzamento entre genitores contrastantes para as características a serem mapeadas. Em seguida, os indivíduos da população segregante são genotipados com um número suficiente de sondas que promova uma boa representação do genoma e também, "fenotipados", ou seja, anota-se o fenótipo para a característica em estudo, de cada indivído. Finalmente, de posse dos dados fenotípicos e genotípicos, busca-se uma correlação entre a presença de um ou mais marcadores e a expressão do caráter, empregando-se testes estatísticos apropriados. Se o valor encontrato é significativo, há ligação entre o marcador e o loco envolvido na expressão da característica em estudo.

Atualmente existem inúmeras características qualitativas e quantitativas mapeadas em diferentes espécies. Apenas como exemplo, pode-se citar para milho, as seguintes características: dias para o florescimento e altura da planta (Koester, *et al.*, 1993), produtividade (Schön *et al.*, 1994), florescimento feminino (Rebaï *et al.*, 1997) entre outras.

3.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

A seleção baseada em características fenotípicas vem sendo aplicada durante anos no melhoramento das espécies cultivadas e produziu resultados algumas vezes espetaculares. Considerando-se que os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente, pode-se supor que sua utilização na seleção poderia eliminar certos aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, melhorando a eficiência do processo seletivo. Por exemplo, a utilização de marcadores moleculares como alvos seletivos, ligados a características fenotípicas de herdabilidade baixa, poderia significar uma redução do tempo e custos do programa. Assim, a seleção assistida por marcadores moleculares passou a ter grande interesse no melhoramento genético.

Entre as aplicações da seleção assistida no melhoramento, talvez a de maior impacto seja o chamado "retrocruzamento acelerado". O princípio deste método está na utilização da ligação existente entre um marcador molecular e o gene que confere uma característica desejável (como exemplo, um gene de resistência a uma doença) para transferi-lo a diferentes genótipos.

Muitas vezes é desejável introduzir-se uma característica, geralmente monogênica, em um material geneticamente superior para a correção de um defeito. Neste caso, o método escolhido é o retrocruzamento onde, após o cruzamento inicial com o genótipo doador da característica, seguem-se vários ciclos de retrocruzamento com o genitor recorrente, acompanhados de seleção para a característica desejada. A cada geração de retrocruzamento o genoma do genitor doador é reduzido em média, pela metade. Assim, após seis gerações de retrocruzamento, a recuperação esperada é de 99%. Uma vez que existe uma variação em torno da média de recuperação do genótipo do genitor recorrente, pode-se reduzir o número de gerações de retrocruzamento necessária. Para tanto é necessário identificar as plantas que, além da característica desejada, receberam também uma maior porcentagem do genótipo do genitor recorrente. Esta identificação pode ser feita utilizando-se marcadores moleculares. Quando a seleção dos indivíduos da população de retrocruzamentos é feita utilizando-se marcadores moleculares, espera-se que sejam necessárias apenas duas ou três gerações de retrocruzamento para a introgressão da característica e recuperação do genótipo do genitor recorrente (Hospital *et al.*, 1992).

Um problema persistente em retrocruzamentos é a ligação dos genes de interesse aos genes indesejáveis. Após 20 retrocruzamentos, espera-se encontrar ainda uma porção considerável (10 cM) do cromossomo doador ligada à característica selecionada (Stam & Zeven, 1981). Esta porção é suficiente para conter dezenas de genes, de forma que, o retrocruzamento, além de transferir o gene de interesse, transfere outros que podem ter efeitos indesejáveis. O fenômeno de transferência dos genes adicionais, conhecido por *linkage drag*, pode ser grandemente reduzido ou eliminado se houver a indentificação dos recombinantes que possuem as menores porções do cromossomo doador associadas ao gene de interesse. Assim, a seleção dos genótipos com marcadores moleculares em programas de retrocruzamento, além de reduzir o tempo, leva à identificação dos indivíduos com menores efeitos do *linkage drag*.

Finalmente, a seleção assistida por marcadores moleculares pode ser também utilizada para a construção de um ideotipo, ou seja, de um genótipo reunindo características escolhidas presentes inicialmente em diferentes indivíduos.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM), CBMEG/UNICAMP, pela contribuição com figuras e resultados aqui apresentados.

À FAI-UFSCar e Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo apoio através do financiamento de projetos de pesquisa (FAPESP 94/01684-8, FAPESP 98/01689-0), e bolsas de estudos aos alunos trabalhando com marcadores moleculares aplicados ao melhoramento de plantas no LAGM, CBMEG/UNICAMP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, S.; TANKSLEY, S.D. comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.7980-7984, 1993.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.

ANJMONE MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.219-227, 1998.

BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellite: allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.835-845, 1995.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species. **Euphytica**, v.35, p.111-124, 1986.

BENCHIMOL, L.L; SOUZA Jr., C.L.; GARCIA. A.A.F.; KONO, P.M.S.; MANGOLIN, C.C.; BARBOSA, A.M.M.; COELHO, A.S.G.; SOUZA, A.P. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. **Plant Breeding**, v.119, p.491-496, 2000.

BOTSTEIN D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using RFLP. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

CAETANO-ANÓLLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOF, P.M.; High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/technology**, v.9, p.553-557, 1991.

CERVERA, M.-T.; CABEZAS, J.A.; SANCHA, J.C.; MARTINEZ DE TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Applications of AFLP to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.51-59, 1998.

CHAO, S.; SHARP, P.J.; WORLAND, E.J.; KOEBNER, R.M.D.; GALE, M.D. RFLP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.495-504, 1989.

CHENG, H.H.; CRITTENDEN, L.B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. **Poultry Science**, v.73, p.539-546, 1994.

CONDIT, R.; HUBBEL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical trees genomes. **Genome**, v.34, p.66-71, 1991.

DEVOS, K.M.; ATKINSON, M.D.; CHINOY, C.N.; LIU, C.J.; GALE, M.D. RFLP-based genetic map of the homeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.931-939, 1992.

ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D.; GUYOMARD, R. (CT)-n and (GT)-n microsatellites: A new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, v.71, p.488-496, 1993.

GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H.; SALAMINI, F. RFLP analysis and linkage mapping in solanum – tuberosum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.65-75, 1989.

GODSHALK, E.B.; LEE, M.; LAMKEY, K.R. relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.273-280, 1990.

GODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, v.39, p.439-446, 1974.

GUILFORD, P.; PRAKASH, S.; ZHU, J.M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSET, H.; FORSTER, R. Microsatellite in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.249-254, 1997.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA forming poptential is widely found in evolutionarily diverse eukariotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HAN, F.; KLEINHOFS, A.; ULLRICH, S.E.; KILIAN, A.; YANO, M.; SASAKI, T. Synteny with rice: analysis of barley malting quality QTLs and *rpg4* chromosome regions. **Genome**, v.41, p.373-380, 1998.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J.; Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorfisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.761-769, 1986.

HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEU, M.; VOS, P.; KESSELI, R.; MILCHELMORE, R. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationship in *Lactuca* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1202-1210, 1996.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphism as a tool fro DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.400-407, 1997.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, v.132, p.1199-1210, 1992.

JARRET, R.L.; MERRIC, L.C.; HOLMS, T.; EVANS, J.; ARADHYA, M.K. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). **Genome**, v.40, p.433-441, 1997.

KATZIR, N.; DANIM-POLEG, Y.; TZURY, G.; KARCHI, Z.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1282-1290, 1996.

KOESTER, R.P.; SISCO, P.H.; STUBER, C.W. Identification of quantitative trait loci controling days of flowring and plant height in two near isogenic lines of maize. **Crop Science**, v.33, p.172-175, 1993.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping Arabdopisis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant Journal**, v.4, p.403-410, 1993.

LANDER, E.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L.;. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimentalk and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.

LANDER, E.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelina factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.

LANZA, L.L.B. Distâncias genéticas entre linhagens endogâmicas de milho (*Zea mays* L.) e predição de híbridos simples através de marcadores do tipo RADP. Campinas: UNICAMP, 1996. 141p. Dissertação, Mestrado.

LANZA, L.L.B.; DE SOUZA JR., C.L.; OTTOBONI, L.M.M., VIEIRA, M.L.C.; DE SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.1023-1030, 1997.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Agronomy Journal**, v.55, p.265-344, 1995.

LEE, M.; GODSHALK, E.B.; LAMKEY, K.R.; WOODMAN, W.L. Association of restriction fragment polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. **Crop Science**, v.29, p.1067-1071, 1989.

LIMA, M.L.A; GARCIA, A.A.F; OLIVEIRA, K.M; MATSUOKA, S.; SOUZA Jr., C.L.; SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and applied Genetics**, 2001. /In Press/

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

LIU, B.-H.; KNAPP, S.J.G Mendel: a program for mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, v.81, p.407-407, 1992.

LIVINI, C.; AJMONE MARSAN, P.; MELCHINGER, A.E.; MESSMER, M.M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.17-25, 1992.

LOVE, J.M.; KNIGHT, A.M.; MCALLER, M.A.; TODD, J.A. Toward construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.4123-4130, 1990.

LU, Z.-X.; SOSINSKI, B.; REIGHARD, G.L.; BAIRD, W.V.; ABBOTT, A.G. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. **Genome**, v.41, p.199-207, 1998.

MAUGHAN, P.J.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; BUSS, G.R.; HUESTIS, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.392-401, 1996.

McCOUCH, S.R.; KOCHERT, G.; YU, Z.H.; WANG, Z.Y.; KHUSH, G.S.; COFFMAN, W.R.; TANKSLEY, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.815-829, 1988.

MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; LAMKEY, K.R.; HALLAUER, A.R.; WOODMAN, W.L. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.488-496, 1990.

MELCHINGER, A.E.; MESSMER, M.M.; LEE, M.; WOODMAN, W.L.; LAMKEY, K.R. Diversity and relationships among U.S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. **Crop Science**, v.31, p.669-678, 1991.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; WOODMAN, W.L.; LEE, E.A.; LAMKEY, K.R. Genetic diversity among progenitors and elite lines from Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS) maize population: comparison of allozyme and RFLP data. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.97-107, 1991.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; BOPPENMAIER, J.; BRUNKLAUS-JUNG, E.; HERRMAN, R.G. Relationshipamong early European maize inbreds: I. Genetic diversity among flint and dent lines revealed by RFLPs. **Crop Science**, v.32, p.1301-1309, 1992.

MILLER, J.C.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.437-448, 1990.

MORAN, C. Microsatellite repeats in pig sus- domestica and chicken gallus-domestica genomes. **Journal of Heredity**, v.84, p.274-280, 1993.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellitesas markers in plant genetics. **Plant Journal**, v.1, p.175-182, 1993.

MUMM, R.H.; DUDLEY, J.W. A classification of 148 U.S. maize inbreds: I. Cluster analysis based on RFLPs. **Crop Science**, v.34, p.842-851, 1994.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v.155, p.501-527, 1987.

NANDI, S.; SUBUDHI, P.K.; SENADHIRA, D.; MANIGBAS, N.L.; SEM-MANDI, S.; HUANG, N. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. **Molecular and General Genetics**, v.255, p.1-5, 1997.

NELSON, J.C. QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. **Molecular Breeding**, v.3, p.239-245, 1997

OLSO, M.; HOOD, L.; CANTOR, C.; DOSTSTEIN, D. A coomon language for physical mapping of the human genome. **Science**, v.254, p.1434-1435, 1989.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.2766-2770, 1989.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistent genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.985-993, 1993.

PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORREL, M.E. DNA marker in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v.44, p.39-90, 1991.

PERERA, L.; RUSSEL, J.R.; PROVAN, J.; McNICOL, J.W.; POWELL, W. Evaluating genetic relationship between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, 545-550, 1998.

RAFALSKY, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; TINGEY, S.V. Generating new DNA marker in plants. In: BIRREN B.; LAI E. (Ed.) **Analysis of non mammalian genomes**: a practical guide. Orlando: Academic Press, 1996. p.75-134.

REBAÏ, A.; BLANCHARD, P.; PERRET, D.; VINCOURT, P. Mapping quantitative trait loci controlling silking date in a diallel cross among four lines of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.451-459, 1997.

RÖDE, M.S.; PLASKE, J.; KÖNING, S.U.; BÖLNER, A.; SORRELS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.K. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**, v.246, p.327-333, 1995.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of –globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SCHÖN, C.C.; MELCHINGER, A.E.; BOPPENMAIER, J.; BRUNKLAUS-JUNG, E.; HERRMAN, R.G.; SEITZER, J.F. RFLP mapping in maize quantitative trait loci affecting testcross performance of elite european flint lines. **Crop Science**, v.34, p.378-388, 1994.

SENIOR, L.; HEUN, M. Mapping maize microssatelites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome**, v.36, p.884-889, 1993.

SERIKAWA, T.; KURAMOTO, T.; HILBERT, P.; MORI, M.; YAMADA, J.; DUBAY, C.J.; LINDPAINTER, K.; GATEN, D.; GUENET, J.; LATHROP, G.M.; BECKMANN, J.S. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. **Genetics**, v.131, p.701-722, 1992.

SIBOV, S.T. Mapeamento do caráter tolerância ao alumínio em milho (*Zea mays* L.) através de marcadores moleculares. Campinas: UNICAMP, 1997. 144p. Dissertação, Mestrado.

SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; SILVA, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, v.42, p.475-482, 1999,

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal**, v.3, p.739-744, 1993.

STAM, P.; ZEVEN, A.C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. **Euphytica**, v.30, p.227-238, 1981.

STURTEVANT, A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology**, v.14, p.43-59, 1913.

TARAMINO, G.; TARCHINI, R.; FERRARIO, S.; LEE, M.; PE. M.E. characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.66-72, 1997.

TAUTZ, D.; RANZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.4127-4138, 1984.

VIRK, P.S.; FORD-LLOYD, B.; NEWBURY, H.J. mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of Oryza sativa (rice) and na investigation of segregation distortion. **Heredity**, v.81, p.613-620, 1998.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

WANG, Y.-H.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.791-798, 1997.

WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech**, v.10, p.186-191, 1992.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology**, v.218, p.704-740, 1993.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular and General Genetics**, v.241, p.225-235, 1993.

ZABEU, M; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application n° 0534-858 A1, 1993.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

30

MARCADORES MOLECULARES EM ESPÉCIES FLORESTAIS: *Eucalyptus* COMO MODELO

DARIO GRATTAPLAGIA[1,2]

[1]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.
[2]Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B, CEP: 70790-160 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

Plantios intensivos de florestas de espécies de rápido crescimento suprem, de modo racional e eficaz, a demanda por biomassa lenhosa de alta qualidade que de outro modo viria de florestas tropicais nativas. Nas décadas por vir, a expansão destas "fazendas de fibras" provavelmente será limitada pelo crescimento do plantio de culturas agrícolas e pela pressão da opinião pública. Produtividades florestais crescentes e refinamentos na qualidade dos produtos de madeira por meio de melhoramento genético, tornar-se-ão cada vez mais estratégicos para a indústria florestal. Ferramentas moleculares baseadas na identificação direta de variações úteis no DNA fornecerão novas oportunidades para a manipulação genética do crescimento, forma e propriedades da madeira de árvores cultivadas.

Quase dez anos se passaram desde que os primeiros experimentos de melhoramento genético molecular (*molecular breeding*) de espécies florestais iniciaram. O desenvolvimento de mapas de ligação e informação de QTL (*Quantitative Trait Loci*), locos controladores de características quantitativas em árvores foi significativamente acelerado pelo advento de tecnologias de marcadores de DNA mais acessíveis baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), novos conceitos em mapeamento genético e estratégias inovadoras de melhoramento florestal em gerações avançadas (O'Malley *et al.*, 1996). Desde o princípio foram geradas muitas expectativas a respeito do desenvolvimento de métodos rápidos e acurados de seleção precoce baseada em marcadores. Progresso significativo tem sido feito e o conhecimento reunido levou a oportunidades reais a curto prazo para a incorporação da análise genômica na genética e melhoramento florestal. Entretanto, também se tornou claro que diversos desafios ainda estão pela frente antes que aplicações mais refinadas e de maior impacto possam ser implementadas.

Neste capítulo é apresentada uma revisão, que não pretende ser exaustiva, da situação atual do melhoramento genético molecular de espécies florestais utilizando *Eucalyptus* como modelo. Plantações de *Eucalyptus* constituem a maior parte das florestas plantadas de *hardwoods* no mundo, ocupando entre 10 a 15 milhões de hectares, sendo 40% desta área plantados no Brasil (Eldrige *et al.*, 1994). Taxas de crescimento rápido, propriedades da madeira flexíveis para a produção de carvão, celulose e papel e uma ampla variação na capacidade de adaptação contribuíram para o grande interesse que as espécies de *Eucalyptus* recebem em muitos países fora da sua zona de ocorrência natural. Além disso, as estratégias de melhoramento e plantio operacional de espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam peculiaridades que favorecem a utilização de técnicas de marcadores moleculares. Ênfase particular é dada às aplicações atuais em programas de melhoramento operacional e os desafios técnicos existentes. O termo melhoramento genético molecular, do inglês *molecular breeding*, é usado aqui em *latu sensu*, i.e., não somente seleção assistida por marcadores (SAM) para alelos favoráveis através de dados de mapeamento de QTL,

mas também abrangendo todas as práticas que envolvem o uso de informação genética derivada da análise direta de polimorfismos de seqüência no DNA.

2. TECNOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM *Eucalyptus*

Um marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo específico na seqüência de DNA, conhecido ou anônimo, que pode corresponder ou não a um gene expresso. Estes polimorfismos são tipicamente detectados por clivagem do DNA com enzimas de restrição seguida por hibridização do DNA com sondas específicas gerando marcadores RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) ou por amplificação do DNA via PCR direcionado por *primers* (ou iniciadores) específicos ou arbitrários. Os marcadores úteis seguem as regras mendelianas de segregação genética e podem exibir herança dominante ou codominante.

Diversas tecnologias para a detecção de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos, particularmente após a descoberta da PCR no final dos anos 80. Quando inventadas, cada uma destas tecnologias recebeu um acrônimo que descrevia as suas principais características e tentava ser atraente para o melhorista genético molecular. Como resultado, uma gama desconcertante de tipos de marcadores, tais como RFLP, RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), SSR (Seqüências Simples Repetitivas, também chamados de microssatélites), e muitos outros se encontram disponíveis hoje para análise genética em organismos vivos (veja revisão por Caetano-Anolles, 1996). Cada sistema de marcadores é caracterizado por uma série de vantagens e limitações que fogem ao escopo desta discussão, mas podem ser encontradas na literatura (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Rafalski *et al.*, 1996). A questão principal é que a escolha de uma ou outra tecnologia deve ser direcionada principalmente pela questão particular que se pretende resolver, levando-se em conta ainda os aspectos de capacitação técnica e instalações necessárias, custo e limitações quanto ao acesso a reagentes específicos e patentes, assim como *royalties* que necessitem ser pagos para a aplicação comercial destas tecnologias.

Marcadores RAPD têm contribuído significativamente para o desenvolvimento rápido de mapas genômicos e análise de variabilidade e *fingerprinting* (ou "impressão digital" do DNA) em *Eucalyptus* e em árvores em geral (Grattapaglia *et al.*, 1992; O'Malley *et al.*, 1996). Marcadores RAPD dispensaram a necessidade de desenvolvimento de sondas específicas, empregando reagentes universais "de bancada" e forneceram uma entrada rápida e tecnicamente simples à análise de segregação, ligação genética, construção de mapas e *fingerprinting* de indivíduos. Embora preocupações tenham sido levantadas quanto à confiabilidade do ensaio RAPD, tem-se demonstrado claramente, que quando se tomam os devidos cuidados, podem ser obtidos mapas e genotipagens de alta qualidade. A principal limitação dos marcadores RAPD é o seu baixo conteúdo informativo por loco, uma vez que estes marcadores tipicamente exibem uma herança dominante e tecnicamente detectam apenas um alelo por loco, sendo que todos os outros alelos são agrupados em uma única classe caracterizada pela ausência de amplificação de banda.

Marcadores AFLP compartilham a maioria das vantagens e limitações técnicas do RAPD. Eles também empregam reagentes universais e também são dominantes. Embora sejam tecnicamente mais trabalhosos do que os marcadores RAPD, tanto em capacitação técnica quanto em instalações necessárias, eles apresentam uma vantagem que os distingue. Marcadores AFLP apresentam uma razão multiplex mais elevada, i.e., o número de locos genéticos que podem ser analisados simultaneamente em cada ensaio, tipicamente uma pista de corrida em eletroforese em gel, é freqüentemente de 5 a 10 vezes maior (Figura 1). Enquanto o ensaio RAPD em *Eucalyptus* tipicamente amostra entre 5 e 10 locos, dos quais entre 2 e 6 são polimórficos, um ensaio AFLP pesquisa entre 100 e 200 locos genéticos, dos quais 10 a 40 são polimórficos e claramente interpretáveis, dependendo da estrutura genealógica e divergência genética do material em estudo (Gaiotto *et al.*, 1997a,b; Marques *et al.*, 1998a).

SSR (Seqüências Simples Repetitivas) ou marcadores microssatélites são os marcadores atualmente disponíveis com maior conteúdo informativo. O que distingue os microssatélites é a sua natureza multialélica, herança codominante, abundância e ampla distribuição no genoma e possibilidade de detectar variações de seqüência por meio de um ensaio simples de PCR, tal como RAPD e AFLP. Adicionalmente, marcadores SSR em geral são altamente transferíveis de genoma para genoma dentro de uma espécie e, freqüentemente, entre espécies geneticamente relacionadas. Afora o método PCR, nenhum licenciamento específico para patente é necessário para seu uso em plantas e o uso compartilhado de seqüências de *primers* entre laboratórios facilita muito o fluxo de informação, colaborações e estudos comparativos. A principal desvantagem dos marcadores baseados em microssatélites é o custo inicial relativamente alto e a necessidade de conhecimento e infra-estrutura de biologia molecular para o desenvolvimento de seqüências específicas de *primers*. Os métodos atuais para o descobrimento de marcadores baseados em SSR tipicamente requerem a construção de uma biblioteca genômica, triagem de uma biblioteca para elementos repetitivos, seqüenciamento do DNA de clones positivos, desenho dos *primers*, seleção dos locos informativos e caracterização da variação alélica.

Nos últimos anos o desenvolvimento de marcadores baseados em SSR tem se tornado cada vez mais acessível principalmente devido a estratégias inovadoras de enriquecimento de bibliotecas genômicas e a tecnologias rápidas de seqüenciamento automático baseadas em fluorescência (Rafalski *et al.*, 1996). Embora o custo do desenvolvimento ainda seja elevado, este custo é facilmente compensado pela ampla gama de potencialidades de pesquisa e desenvolvimento que se abrem ao se possuir tal tecnologia para uma determinada espécie. Particularmente para a análise genética de alta resolução e mapeamento de espécies altamente heterozigotas de *Eucalyptus*, a disponibilidade de marcadores multialélicos codominantes baseados em PCR se tornou absolutamente fundamental. Brodani *et al.* (1998) iniciaram um esforço sistemático e bem sucedido rumo ao desenvolvimento e mapeamento de grandes baterias de marcadores baseados em microssatélites altamente informativos para análise genética em *Eucalyptus*. Todas as seqüências de *primers* foram disponibilizadas da mesma forma que tem ocorrido com a comunidade científica envolvida no mapeamento do genoma humano, com o objetivo de facilitar o mapeamento comparativo e colaborativo, bem como experimentos de *fingerprinting*.

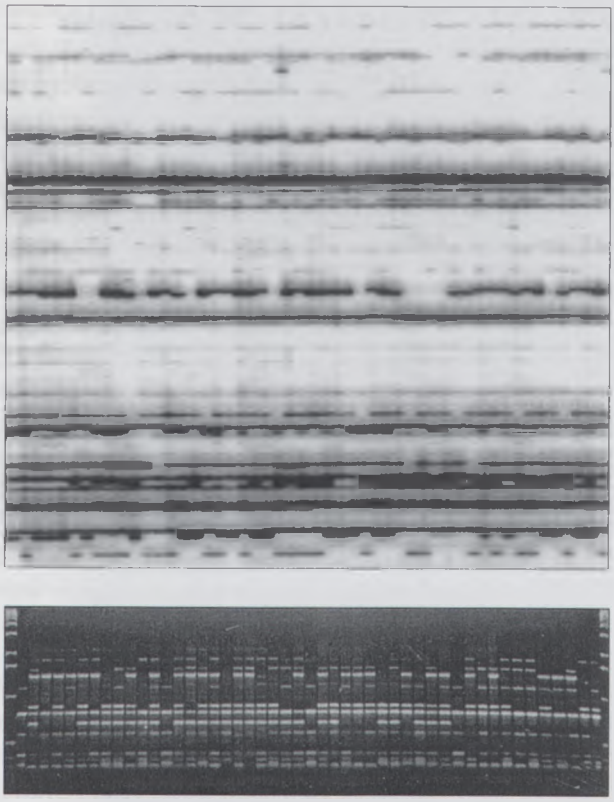


FIGURA 1. Marcadores dominantes segregando em uma configuração pseudocruzamento teste *(pseudotestcross)* em uma família F_1 de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Uma razão multiplex quatro vezes maior foi obtida com a tecnologia AFLP (20 marcadores AFLP informativos segregando por corrida de gel - Painel A) quando comparada à tecnologia RAPD (5 marcadores RAPD informativos segregando por corrida de gel - Painel B).

A disponibilidade de informações de seqüências parciais ou completas de um grande número de genes permitirá o desenvolvimento crescente de marcadores gênicos baseados em PCR para estudos genômicos funcionais e para a construção de mapas transcricionais. Dezenas de milhares de EST (*Expressed Sequence Tags,* ou Etiquetas de Seqüências Expressas) já foram seqüenciadas para *Eucalyptus* na Nova Zelândia, mas permanecem sob domínio privado (Sederoff, R. – Comunicação pessoal). O conhecimento da função destes genes mapeados viria da sua seqüência esperada de aminoácidos e comparação com seqüências conhecidas de espécies modelo, tal como *Arabidopsis* e outras para as quais além de existirem grande números de EST's depositados em bases de dados, o genoma completo está também sendo rapidamente seqüenciado. Em teoria, o uso de genes como marcadores ao invés de marcadores anônimos de DNA tais como RAPD, AFLP ou SSR pareceria ser a melhor escolha, uma vez que isto facilitaria o estabelecimento de relações putativas entre genes candidatos e QTL específicos mapeados em sua vizinhança, i.e., o uso da abordagem do gene candidato (Lander, 1996). Na prática, no entanto, seqüências de cDNA são muito mais conservadas e, portanto, a detecção de polimorfismo de seqüência e variação alélica de indivíduo para indivíduo se torna uma tarefa relativamente árdua com a tecnologia atual, tornando difícil o uso destes marcadores para o desenvolvimento rápido de informação de ligação genética e mapeamento. Abordagens alternativas baseadas na detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos estão sendo rapidamente desenvolvidas e poderão se tornar extremamente eficientes para a detecção de polimorfismos dentro de genes.

3. MAPAS DE LIGAÇÃO DE *Eucalyptus*

Uma série de relatos na literatura demonstraram que marcadores moleculares podem ser usados de modo eficiente para a construção de mapas de ligação de alta cobertura genômica de árvores individuais em diversas espécies de *Eucalyptus*. Estes mapas de ligação têm sido construídos por meio de análise de marcadores RAPD dominantes (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Verhaegen & Plomion, 1996), marcadores AFLP dominantes (Gaiotto *et al.*, 1997a; Marques *et al.*, 1998a) segregando em uma configuração pseudocruzamento teste em famílias F_1, ou uma combinação de marcadores RFLP e RAPD segregando em diversas configurações em um cruzamento F_2 não endogâmico (Byrne *et al.*, 1995).

Para todos os mapas de *Eucalyptus* construídos até hoje, independentemente do tipo de marcador molecular e do *pedigree* utilizado, o número de grupos de ligação determinado sempre foi equivalente ou próximo do número haplóide de cromossomos (n=11) de *Eucalyptus*. A distância de mapa em unidades de recombinação foi sempre obtida em valores próximos à distância total estimada de mapa, sugerindo que uma cobertura do genoma acima de 95% foi alcançada. O comprimento total do mapa tem sido estimado entre 1156 cM para *Eucalyptus urophylla* a 1620 cM para *E. grandis* (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Dada uma distância média do mapa total de 1300 cM e um genoma de tamanho médio em torno de 650 Mbp/1C, o equivalente físico médio de 1cM corresponderia a algo em torno de 500 pares de kilobases. Esta distância física relativamente pequena por unidade de recombinação, quando comparada à da maioria das outras espécies de plantas e à maioria das árvores, facilitaria o mapeamento físico e a abordagem de clonagem posicional (Grattapaglia & Bradshaw, 1994).

A construção de mapas em *Eucalyptus* tem utilizado *pedigrees* disponíveis extraídos de programas operacionais de melhoramento. Estes *pedigrees* geralmente envolvem somente os dois genitores altamente heterozigotos e sua progenie F_1. Este fato, juntamente com a disponibilidade de polimorfismo abundante entre os genitores foi a razão pela qual o mapeamento de ligação em *Eucalyptus* tem sido realizado principalmente por meio da estratégia de pseudocruzamento teste. Quando combinada a marcadores dominantes baseados em PCR de alto desempenho, esta estratégia é muito poderosa para a geração rápida de informação de ligação para ambos os genitores do cruzamento. Esta estratégia se baseia, entretanto, na seleção de polimorfismos de DNA em dose única presentes em um dos genitores e ausentes no outro, de modo que os mapas são indivíduo-específico e não podem ser alinhados ou integrados como tais, a não ser que também sejam usados outros marcadores comuns a ambos os mapas (Grattapaglia, 1997).

Homologias preliminares foram estabelecidas para 3 e 4 grupos de ligações respectivamente em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* com base em pares de marcadores RAPD mapeados em diferentes árvores e diferentes laboratórios. Isto foi facilitado pelo uso de um conjunto comum de *primers* RAPD e de nomenclatura para os marcadores gerados (Verhaegen & Plomion, 1996). Um levantamento de 60 marcadores RAPD mapeados em 10 famílias de irmãos completos de *Eucalyptus urophylla* indicou que uma média de 64% dos marcadores RAPD poderiam ser prontamente transferíveis e informativos entre mapas de ligação para árvores distintas

de uma mesma população (Brondani & Grattapaglia, 1997; Brondani *et al.*, 1997). Entretanto, a transferabilidade de marcadores informativos entre árvores dentro de uma mesma espécie rapidamente declina para abaixo de 15% se as árvores forem oriundas de populações geograficamente distantes (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Para integrar mapas de ligação construídos pela estratégia pseudocruzamento teste, marcadores codominantes multialélicos com alelos segregando em ambos os genitores seriam mais eficientes, fornecendo um conjunto de locos comuns que poderiam ser usados como locos-ponte (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Um mapa de ligação baseado em marcadores RFLP codominantes e marcadores RAPD dominantes foi gerado usando um *pedigree* F_2 não endogâmico de três gerações (Byrne *et al.*, 1995). Marcadores RFLP segregando de modo totalmente informativo, i.e., com 3 ou 4 alelos diferentes segregando na família F_1, permitiu a integração de marcadores dominantes em um único mapa. Entretanto, a despeito do fato de que um amplo cruzamento interpopulacional de *E. nitens* foi utilizado, somente 22% dos marcadores RFLP foram totalmente informativos. Além do baixo desempenho da tecnologia de marcadores RFLP na geração de dados, com uma proporção tão baixa de marcadores totalmente informativos, o suporte estatístico para a ligação e o ordenamento linear dos locos em um mapa integrado têm baixa consistência e, mais provavelmente, complica posteriormente a precisão do mapeamento de QTL (Liu, 1998).

Em suma, embora diversos mapas de ligação de *Eucalyptus* tenham sido construídos, o uso da informação de ligação tende a permanecer restrito ao *pedigree* utilizado para o mapeamento, limitando o compartilhamento interexperimental de dados de QTL. Além disso, um detalhamento preciso dos efeitos individuais dos alelos aos QTL em *pedigrees* não endogâmicos não é possível (veja item 4). Portanto, de modo semelhante à genética humana na era pré-microssatélite, um obstáculo chave à construção de mapas de ligação e análise de QTL de maior resolução em *Eucalyptus* tem sido a natureza não endogâmica dos cruzamentos utilizados e o conteúdo limitado de informação genética das classes de marcadores moleculares mapeados até o momento.

4. MAPEAMENTO DE QTL EM *Eucalyptus*

Dando seguimento à construção de mapas de ligação, diversos grupos relataram a identificação de regiões genômicas que têm efeito significativo na expressão de características economicamente importantes em *Eucalyptus*. QTL para características juvenis, tais como a altura de plântulas, área foliar e tolerância da muda à geada foram mapeados (Vaillancourt *et al.*, 1995a; Byrne *et al.*, 1997a,b). Características relacionadas à habilidade de propagação vegetativa, tais como enraizamento adventício, brotamento de toco e multiplicação de plântulas *in vitro* também foram detectados (Grattapaglia *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 1998b). Finalmente, QTL importantes também foram encontrados para características em idade de rotação, tais como crescimento volumétrico, densidade básica da madeira, espessura da casca e forma do caule (Grattapaglia *et al.*, 1996; Verhaegen *et al.*, 1997; Squilassi & Grattapaglia, 1997) (Figura 2). QTL para resistência a insetos e características responsáveis pela produção de óleos essenciais foram mapeados (Shepherd *et al.*, 1995) e, recentemente, um QTL de maior efeito para resistência à

ferrugem de *Puccinia psidii* com herança mendeliana simples foi encontrado e mapeado em *E. grandis* (Junghans *et al.*, 1998). Diversas classes de marcadores moleculares e tipos de *pedigrees* diferentes têm sido utilizados nestes experimentos. QTL têm sido detectados em F_1, F_2 parcialmente endogâmicas ou não e famílias de meios-irmãos com ou sem replicação clonal.

Todos os estudos de mapeamento de características quantitativas em *Eucalyptus* têm demonstrado, com sucesso, abordagens experimentais para a localização de QTL. Estes experimentos forneceram evidências quanto aos números e magnitude de efeitos de QTL controlando características quantitativas em espécies comercialmente importantes deste gênero. Da mesma forma que tem sido observado para diversas características em várias espécies de plantas cultivadas, em *Eucalyptus* também foram detectados poucos locos de maior efeito controlando uma proporção relativamente grande (entre 10% e 40%) da variação fenotípica total de uma ampla variedade de características herdadas quantitativamente, desde crescimento volumétrico e densidade básica da madeira até enraizamento adventício de estacas e tolerância à geada. Entretanto, devido ao tamanho relativamente pequeno das progênies empregadas, a precisão limitada na avaliação do fenótipo, o número reduzido de *backgrounds* genéticos testados (i.e. número de cruzamentos) e as limitações inerentes aos tipos de marcadores moleculares e *pedigrees* utilizados, os números reais, a posição precisa e particularmente a magnitude do efeito dos QTL detectados para todas as características ainda são insuficientemente compreendidos.

O mapeamento de QTL em *Eucalyptus* bem como na maioria de espécies florestais tem sido conduzido principalmente através da configuração de pseudocruzamento teste. Conforme descrito anteriormente (Grattapaglia *et al.*, 1995;

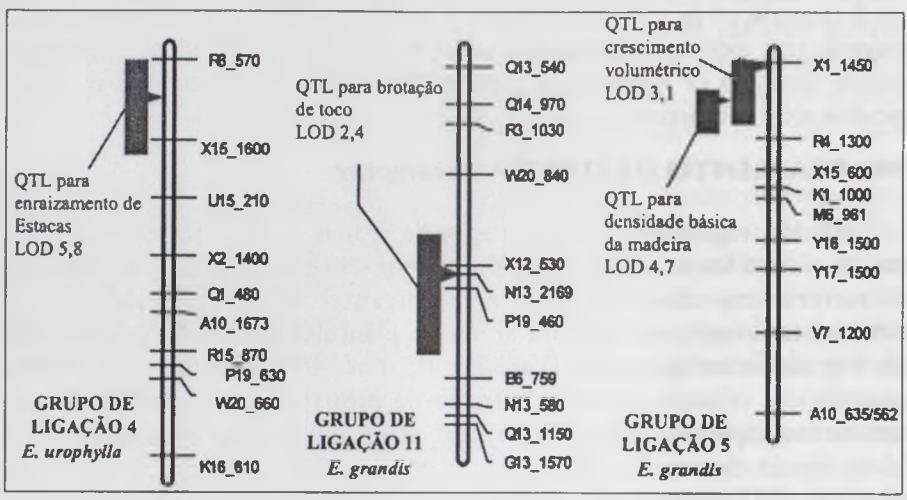


FIGURA 2. Mapas de QTL de maior efeito em *Eucalyptus*. Mapas de ligação de marcadores RAPD foram construídos usando MAPMAKER e os marcadores foram ordenados com suporte de verossimilhança > 1000:1. O comprimento da barra na esquerda dos grupos de ligação corresponde ao intervalo de suporte de 1,0 LOD para a localização do QTL. As setas nas barras indicam a posição mais provável estimada com MAPMAKER-QTL. A detecção de QTL foi declarada com um LOD (*Likelihood of Odds*) maior ou igual a 2,0 (extraído de Grattapaglia *et al.*, 1995; 1996).

Grattapaglia, 1997) esta estratégia possui duas limitações. Primeiro, devido à natureza não domesticada das espécies para as quais esta tecnologia é interessante, não é disponível qualquer informação genética prévia sobre o genótipo dos genitores e não é possível portanto a "construção" planejada de genótipos aos QTL para maximizar a segregação fenotípica para as características de interesse quando estes genótipos contrastantes construídos forem cruzados. Portanto, os únicos QTL que podem ser potencialmente detectados são aqueles que, por acaso, encontram-se em heterozigose nos genitores do cruzamento e onde o efeito diferencial entre alelos alternativos aos QTL é relativamente grande para permitir detecção estatística com o tamanho amostral (i.e. número de descendentes) disponível. Em segundo lugar, devido à provável heterozigosidade em quaisquer dos locos QTL em ambos os genitores, e o fato de que polimorfismos de dose única e herança dominante são usados, o valor quantitativo de genótipos alternativos de marcadores é medido como o efeito de uma substituição alélica (presença ou ausência de uma banda RAPD ou AFLP) tirada como a média dos dois alelos alternativos potenciais ao QTL herdados do outro genitor (ambos vistos igualmente como ausência de uma banda). Se o genótipo de um genitor no loco QTL é Q1/Q2, e para o outro genitor é Q3/Q4, a análise QTL testa essencialmente a diferença entre o valor médio da característica (Q1/Q3 + Q1/Q4) versus (Q2/Q3 + Q2/Q4) no primeiro genitor e (Q3/Q1 + Q3/Q2) versus (Q4/Q1 + Q4/Q2) no segundo genitor. Nenhuma interação intraloco específica que possa ocorrer e afetar o fenótipo final pode ser levada em consideração nesta análise e nenhuma classificação (*ranking*) de alelos por magnitude do efeito de substituição pode ser realizada. Esta situação de informação genética incompleta pode resultar em erros do Tipo I e II na detecção de QTL e estimativa imprecisa da magnitude do efeito do QTL. Claramente, como a maioria dos QTL em *Eucalyptus* e em outras árvores florestais geneticamente heterogêneas provavelmente são multialélicos (Groover *et al.*, 1994), somente marcadores multialélicos codominantes permitirão o rastreio, compreensão e manipulação adequada de toda a variabilidade alélica que segrega aos QTL em trabalhos experimentais e aplicados.

Abordagens alternativas para o mapeamento de QTL têm sido testadas com sucesso em *Eucalyptus*. Grattapaglia *et al.* (1996) demonstrou que o desequilíbrio de ligação em uma família de meios-irmãos permite a identificação de regiões genômicas com efeitos significativos sobre características quantitativas relevantes para a produtividade florestal de *Eucalyptus*. Famílias de meios-irmãos amostram mais da variabilidade genética da população uma vez que o efeito dos alelos segregando ao QTL no genitor maternal comum é medido frente à toda a população de melhoramento. Em outras palavras, comparam-se os efeitos dos dois alelos maternais, efeitos estes computados como a média com uma amostra muito maior de alelos ao mesmo QTL que são contribuídos pelo *pool* de pólen. QTL identificados em famílias de meios-irmãos podem, em princípio, ser diretamente relacionados ao valor de melhoramento, variação genética aditiva e, portanto, com a teoria e prática do melhoramento florestal baseado em populações (O'Malley & McKeand, 1994). Entretanto, tem sido demonstrado que com amostras de mesmo tamanho, o poder de detecção de QTL em famílias de meios-irmãos é sempre menor do que em uma família de irmãos germanos (Muranty, 1996).

Uma segunda abordagem alternativa muito promissora tem sido a utilização do desequilíbrio de ligação em delineamentos genéticos de acasalamento fatorial. Nestes casos têm sido demonstrado que o uso de uma única família grande de irmãos germanos para a detecção de QTL em espécies alógamas é freqüentemente menos potente do que o uso de várias progênies menores oriundas de acasalamentos de um maior número de genitores. Como os genitores para experimentos de QTL em árvores são muitas vezes escolhidos ao acaso entre bons genitores, o uso de múltiplos genitores em acasalamentos fatoriais aumenta o poder de detecção de QTL, uma vez que é amostrado um maior número de alelos aos QTL o que aumenta a probabilidade de se observar segregação aos mesmos (Muranty, 1996). Verhaegen (1996) detectou correlações significativas entre as freqüências de marcadores RAPD específicos e a média aditiva interespecífica para crescimento volumétrico em um delineamento multifatorial 13 x 13 compreendendo cerca de 87 famílias de irmãos germanos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Em um experimento semelhante, Squilassi & Grattapaglia (1997) mapearam um QTL de maior efeito para crescimento volumétrico em *E. urophylla* utilizando o desequilíbrio de ligação que existe em um pequeno grupo elite de melhoramento com uma origem comum na Austrália. A freqüência de marcadores selecionados presentes nos genitores masculinos e ausentes no genitor feminino (configuração pseudocruzamento teste) foi determinada em cada uma das 12 famílias de irmãos germanos, e uma correlação entre esta freqüência e o crescimento volumétrico medido como CAP (Circunferência à altura do peito) médio da família foi estimada. Marcadores foram considerados como associados a um QTL quando a correlação era significativa ($p < 0,01$). A detecção de QTL foi validada por mapeamento de intervalo e estimativa de máxima verossimilhança com LOD = 6,37.

Atualmente, experimentos de mapeamento de QTL em *Eucalyptus* estão sendo aperfeiçoados e expandidos em alguns laboratórios pelo mundo (Verhaegen & Marques[1]) incluindo o nosso. Estes experimentos são baseados em maiores tamanhos amostrais de descendentes e famílias, quando possível replicação clonal para melhorar a avaliação de fenótipos, tecnologias de marcadores geneticamente mais informativos e delineamentos experimentais envolvendo múltiplos genitores em acasalamentos fatoriais para aumentar o poder de detecção de QTL e melhorar as estimativas de magnitude de efeitos dos alelos aos QTL. Uma tendência semelhante está acontecendo com álamo e coníferas (Bradshaw *et al.*[2])com o objetivo comum de elucidar os vários aspectos da arquitetura genética de características quantitativas importantes em árvores e gerar fundamentos mais sólidos para o estabelecimento de procedimentos de seleção assistida por marcadores.

5. ESTABILIDADE DE EXPRESSÃO DE QTL EM *Eucalyptus*

Muito poucos estudos têm sido realizados em plantas em geral com o objetivo de avaliar aspectos da interação QTL x *background* genético e QTL x idade. Isto se deve principalmente ao fato de que a maioria dos experimentos de mapeamento de QTL têm sido conduzidos em espécie anuais com uma base genética muito estreita e origem do germoplasma conhecido. Nestas espécies, são usados *backgrounds* genéticos muito bem definidos para gerar o estoque de plantio e características alvo para melhoramento molecular são herdadas, na maioria dos casos, de forma simples,

[1]Verhaegen, D.; Marques, C. (CIRAD; Grupo Raiz). Comunicação pessoal, 1998.

[2]Bradshaw, T.; Neale, D.; O'Malley, D. (University of Washington; USDA Forest Service; North Carolina State University). Comunicação pessoal, 1998.

envolvendo alelos dominantes de grande efeito fenotípico, tais como de resistências a doenças. Nestas condições, a interação QTL x *background* genético não é uma questão relevante e considerações sobre a interação QTL x idade simplesmente não existem tendo em vista o ciclo curto da cultura. Entretanto em milho, por exemplo, Beavis *et al.* (1991) relataram que poucos QTL para altura da planta eram comuns entre diferentes populações F_2 derivadas de linhagens diferentes. A detecção e expressão de QTL que controlam características quantitativas, tais como altura da planta ou produtividade em *backgrounds* genéticos distintos parece, portanto, ser uma consideração importante para espécies anuais e deve ser ainda maior para espécies florestais geneticamente heterogêneas como o *Eucalyptus*. Uma vez que árvores são geneticamente heterogêneas, é razoável esperar-se que a expressão de um determinado alelo de QTL contribuído por uma das árvores genitoras à progênie possa variar de acordo com o *background* genético existente, i.e. a outra árvore com a qual foi cruzada. Interações QTL x idade e QTL x ambiente também seriam esperadas considerando-se que correlações juvenil x adulto em árvores tipicamente são baixas e uma interação genótipo x ambiente significativa é a regra na maioria dos programas de melhoramento genético florestal que atendem a grandes áreas de plantio.

Uma maior estabilidade da expressão de QTL em diferentes idades foi observada por Verhaegen *et al.* (1997) em um mapeamento experimental de *E. grandis* x *E. urophylla*. Aproximadamente 70% dos QTL detectados para crescimento volumétrico e densidade da madeira eram estáveis entre as idades de 12 e 38 meses. Diversos QTL, entretanto, foram detectados em uma única idade. Verhaegen (1996) também relatou a detecção de alguns QTL cruzamento-específico e QTL gerais quando comparou os QTL detectados por análise de co-segregação em uma família de irmãos completos, com aqueles detectados em um cruzamento fatorial.

Campinhos *et al.* (1997) estudaram a estabilidade da expressão de alelos a QTL no controle do crescimento de *Eucalyptus grandis* em diferentes *backgrounds* genéticos e idades. A análise da estabilidade da expressão de QTL foi conduzida analisando-se alelos de quatro QTL não ligados (em cromossomos diferentes) que controlam crescimento volumétrico. Estes QTL, previamente mapeados na árvore *E. grandis* em idade de rotação, foram analisados em cinco famílias de irmãos completos aos 12 meses. Todos os quatro QTL foram detectados na idade de 12 meses, indicando não ter havido nenhuma interação significativa QTL x idade. Porém, foi observado um efeito significativo do *background* genético na possibilidade de se detectar um QTL. Somente um dos 4 QTL pôde ser detectado em todas as cinco famílias de irmãos completos. A explicação mais provável para isto é que nestas famílias onde um determinado QTL não foi detectado, o QTL não estava segregando, i.e. que os genitores eram efetivamente ou funcionalmente homozigotos ao QTL de forma que nenhuma diferença estatística entre os alelos poderia ser detectada. Além da hipótese óbvia de multialelismo ao QTL, outras explicações possíveis para estes resultados são a expressão dependente do genoma (epistasia) e efeito amostral.

Embora progressos significativos na construção de mapas de ligação e detecção de QTL em *Eucalyptus* tenham sido feitos nos últimos 6 anos, ainda há várias perguntas a serem respondidas quanto à variabilidade alélica existente e o comportamento interativo de QTL específicos, antes que dados moleculares possam ser usados

operacionalmente na prática do melhoramento genético. Os resultados destes estudos apontam para o fato de que no eucalipto tropical a interação QTL x idade pode não ser uma limitação importante para a implementação de SAM precoce. Porém um alelo a um QTL, detectado em um determinado cruzamento pode não ser o melhor alelo que existe na população de melhoramento e outros alelos de efeito igual ou até melhor muito provavelmente existem. Isto fundamentalmente é um reflexo do fato que o processo de domesticação de populações de *Eucalyptus* é extremamente recente quando comparado ao de plantas agrícolas anuais, o que faz com que uma grande variabilidade alélica ainda existe para ser explorada e utilizada. A SAM em *Eucalyptus* e em árvores em geral dependerá portanto da capacidade de se descobrir, mapear e medir a magnitude do efeito dos alelos existentes a QTL de maior efeito em populações de melhoramento. Somente através da alteração das freqüências dos alelos de grande efeito aos QTL mais relevantes é que a SAM suplantará a seleção fenotípica convencional e será de fato útil para o melhoramento genético.

6. RUMO A UM MAPA DE LIGAÇÃO "REFERÊNCIA" PARA *Eucalyptus* BASEADO EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

A construção de um mapa de ligação abrangente baseado em microssatélites para espécies comerciais de *Eucalyptus* se encontra em fase de finalização em nosso laboratório. O desenvolvimento, caracterização genética e mapeamento de ligação de uma bateria de locos microssatélites em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* foi relatado por Brondani *et al.* (1998). Este estudo revelou a abundância de microssatélites em *Eucalyptus* e o alto conteúdo informativo destes marcadores para mapeamento e identificação individual. Seqüências de *primers* para um conjunto de locos EMBRA (*Eucalyptus Microsatellites from Brazil)* altamente informativos foram publicadas juntamente com a sua posição no mapa e estimativas de heterozigosidade esperada e variação do tamanho do alelo. Transportabilidade absoluta entre as duas espécies e níveis bastante elevados de variabilidade alélica e heterozigosidade esperada (He) foram observados em todos os locos microssatélites desenvolvidos. O número de alelos por loco variou de 9 a 26 com uma média de 16,3±4,8. A He média de 15 locos foi 0,86±0,04 e 0,83±0,08 respectivamente para *E. urophylla* e *E. grandis*. Na análise de mapeamento, 16 de 20 locos marcadores, i.e. 80%, segregaram em uma configuração totalmente informativa (Figura 3), permitindo a determinação imediata da sintenia de 6 dos 11 grupos de ligação homólogos entre mapas de marcadores RAPD existentes para os dois genitores.

A similaridade morfológica e compatibilidade genética de cruzamentos sexuais entre espécie de *Eucalyptus*, particularmente no mesmo subgênero, sugere, a princípio, uma alta homologia do genoma que deveria traduzir-se em conservação das seqüências de DNA que flanqueiam as regiões de microssatélites. A conservação de 4 locos SSR entre as espécies dentro de subgênero *Symphyomyrtus* foi descrita por Byrne *et al.* (1996) entre *E. nitens* e três outras espécies, incluindo *E. grandis*. Em outro estudo, uma centena de pares de *primers* para microssatélites que amplificam produtos na espécie doadora (*E. grandis*) foram testados quanto à transferabilidade para quatro espécies de *Eucalyptus* pertencentes a subgêneros diferentes (Kirst *et al.*, 1997). Setenta e oito por cento dos locos amplificaram produtos *em E. dunnii* pertencentes ao mesmo

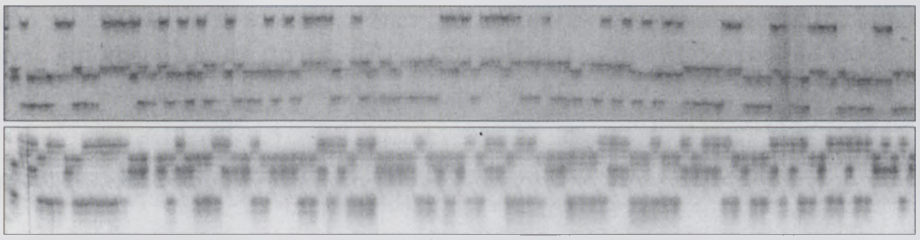


FIGURA 3. Padrões de segregação de dois locos microssatélites (painel superior e inferior) totalmente informativos em uma população de mapeamento de *E. grandis* x *E. urophylla*. A primeira pista na esquerda corresponde ao DNA padrão de fragmentos de tamanho conhecido. As pistas 2 e 3 são os dois genitores, ambos heterozigotos. Quatro genótipos distintos segregam na progênie F_1 (cortesia R. Brondani).

subgênero, mas de uma seção diferente. Entre 25% e 59% dos locos foram transferíveis entre espécies de subgêneros diferentes sendo que a transferabilidade diminuiu, a medida que foram analisadas espécies filogeneticamente mais distantes. Estes resultados indicam claramente que a perspectiva de transferência de informação de mapeamento gerada com marcadores microssatélites entre espécies de *Eucalyptus* é excelente, particularmente dentro de um subgênero, mas também em uma menor taxa entre subgêneros distantes.

A disponibilidade de locos SSR transportáveis, codominantes, multialélicos, baseados em PCR representa uma melhoria dramática na habilidade de conduzir mapeamento de ligação e análise de QTL em *Eucalyptus*. Esta taxa elevada de conservação de locos microssatélites entre as espécies mais importantes de *Eucalyptus* no mundo é um privilégio. Com isso, a perspectiva de um mapa "referência" útil para a maioria das espécies comercialmente importantes de *Eucalyptus* é real. Isto permitirá a rápida disseminação do uso destes marcadores em análises genéticas de *Eucalyptus*, facilitando a troca e comparação de informação entre laboratórios, particularmente quanto ao mapeamento de QTL e procedimentos de seleção assistida por marcadores. Dada a ampla base genética da maioria dos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus*, e heterozigosidade na faixa de 0,7 a 0,9 para os locos SSR, é possível prever que essencialmente toda família que segregar fenotipicamente para a característica de interesse deverá fornecer informação de ligação genética entre marcador e QTL. Isto permitirá a integração dos dados de mapeamento de QTL provenientes de experimentos totalmente independentes. Finalmente, a transportabilidade de locos SSR entre cruzamentos não apenas dentro da mesma espécie, mas também entre espécies do mesmo subgênero deverá permitir a determinação da sintenia de QTL interespecíficos e deverá facilitar uma busca dirigida de novas variações alélicas a um QTL conhecido dentro e entre espécies, expandindo as oportunidades para introgressão e seleção assistida por marcadores no melhoramento por hibridização.

Até o momento mais de 150 locos microssatélites foram mapeados e todos os 11 grupos de ligação esperados identificados. Baseado em estimativas de heterozigosidade esperada, a proporção esperada de marcadores totalmente informativos seria de aproximadamente 0,8 x 0,8, i.e. 64%, ligeiramente menor do que os 80% observados para o primeiro conjunto de 20 marcadores, mas ainda

bastante alto, três vezes maior do que as estimativas obtidas com RFLP. Um mapa "referência" de marcadores microssatélites com 95% de cobertura do genoma deverá ser completado em meados do ano 2000 e disponibilizado à comunidade científica no mesmo ano (Brondani[3]).

7. SELEÇÃO ASSISTIDA DE MARCADORES (SAM) EM *Eucalyptus*

Atualmente, exemplos operacionais de seleção assistida por marcadores em plantas são essencialmente um sinônimo de retrocruzamento assistido por marcadores. É a aplicação mais direta desta tecnologia e está se tornando comum em programas de melhoramento genético de plantas anuais por todo o mundo (veja Lee, 1995). Marcadores moleculares fortemente ligados a alelos favoráveis a serem introgredidos a partir de um genitor selvagem para uma linhagem comercial ou de uma linhagem para outra, são usados para monitorar a sua herança em gerações de retrocruzamento. Ao mesmo tempo, seleção também é realizada para marcadores do genitor recorrente com o objetivo de recuperar o mais rápido possível a maior proporção do genoma recorrente. Este esquema acelera significativamente o lançamento de novas variedades ou híbridos. Em *Eucalyptus*, nenhuma característica de herança simples e grande impacto no melhoramento foi identificada até o momento que justificaria esta abordagem de melhoramento genético.

O desafio para a aplicação de SAM em espécies florestais é, em princípio, mais complexo do que em plantas anuais uma vez que pressupõe: a) a manipulação de características poligênicas com herdabilidade variável em populações de melhoramento com uma base genética heterogênea e provavelmente em equilíbrio de ligação; b) sua incorporação em esquemas de melhoramento genético que envolvem a alteração de freqüências de alelos favoráveis através de seleção recorrente em grandes populações; c) lidar com correlações idade x idade e ambientes variáveis. No contexto do melhoramento de *Eucalyptus* as perspectivas, no entanto, são positivas. O melhoramento genético em esquemas de pequenos grupos reprodutivos de indivíduos altamente selecionados para desempenho como genitores de híbridos, em combinação com a propagação clonal de indivíduos selecionados, está sendo cada vez mais utilizado. Níveis elevados de desequilíbrio de ligação são gerados por hibridização e quantidades substanciais de variação genética não-aditiva podem ser capturadas através de propagação vegetativa. Estas são condições favoráveis para SAM (Strauss *et al.*, 1992). Alelos favoráveis poderiam ser identificados e "rankeados" em árvores que compõem populações de melhoramento de modo eficaz analisando suas descendências seja de meios-irmãos ou irmãos completos. A seleção dentro de famílias para indivíduos superiores em gerações de melhoramento avançado poderia ser aperfeiçoada significativamente através da incorporação de informação de marcadores.

Seja a teoria da genética quantitativa assim como o bom senso sugerem que a seleção assistida por marcadores em espécies florestais deveria ser útil particularmente em situações onde a herdabilidade da característica é baixa e a seleção ocorre ao nível de árvore individual. Porém, a implementação de SAM para tais características é uma tarefa desafiadora. É necessária uma informação extremamente precisa sobre a posição e efeito do QTL que somente pode ser derivada de experimentos com progênies extremamente grandes (da ordem de centenas ou milhares de indivíduos),

[3]Brondani, R. (UnB; Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia). Comunicação pessoal. 1998.

replicação clonal e em *backgrounds* genéticos e ambientes representativos. Até o momento, todos os QTL mapeados para características de herança realmente complexa não se enquadram nesta descrição. Na maioria dos experimentos até o momento, foram mapeados QTL para características que exibem herdabilidade intermediária à alta e, provavelmente, não foram identificados os melhores alelos que existem nas populações base, uma vez que somente uma amostra muito limitada de cruzamentos foi contemplada.

Experimentos de seleção assistida por marcadores em árvores têm visado principalmente crescimento volumétrico. Trata-se de uma característica de interesse universal, fácil de mensurar e tipicamente de baixa herdabilidade. Provavelmente em nossas condições tropicais, entretanto, esta não será uma característica alvo de primeira linha para SAM. A herdabilidade para características de crescimento é relativamente alta em eucaliptos tropicais, de forma que ganhos significativos podem ser facilmente alcançados adotando-se abordagens biométricas convencionais, uma vez que quantidades adequadas de variabilidade genética são geralmente disponíveis em populações de melhoramento. Estes ganhos podem ser impulsionados significativamente se for usada propagação clonal no plantio. Além disto se puderem ser utilizados clones no processo seletivo, a herdabilidade em sentido amplo ao nível de média de clone é freqüentemente da ordem de 0,8 a 0,9 permitindo um ordenamento quase perfeito e seleção de clones em uma idade muito precoce (1 a 2 anos) em condições tropicais (Rezende *et al.*, 1994). Marcadores moleculares para crescimento volumétrico nestas condições dificilmente trarão uma contribuição significativa para o aumento dos ganhos genéticos por unidade de tempo.

O custo envolvido para uma análise de marcadores moleculares implica que a aplicação mais provável de SAM em *Eucalyptus* será para características de qualidade. Há uma melhor justificativa do custo de SAM para características que resultem em um valor agregado significativo ao produto final, tais como hábito de ramificação (para madeira sólida), características químicas da madeira para rendimento ou qualidade de celulose e/ou papel, ou que permitam desenvolvimento clonal, tal como enraizamento adventício ou resposta à embriogênese somática. Considerando-se todas as possíveis características de qualidade, a opção seria feita para aquelas que demonstram maior herdabi-lidade, mas onde a avaliação de fenótipo é difícil ou cara. Características de qualidade da madeira tipicamente exigem que a árvore atinja a maturidade, envolvem amostragens destrutivas e procedimentos muitas vezes longos para a avaliação fenotípica em laboratório. Além da densidade básica da madeira, existem diversas características de qualidade da madeira que exibem tal comportamento e tem forte impacto nas propriedades finais da polpa de celulose e papel. Por exemplo, a herdabilidade em sentido amplo para o conteúdo de pentosanas, conteúdo de lignina e composição e espessuras da parede fibrosa são acima de 0,7 em *Eucalyptus* tropical no Brasil (Demuner & Bertolucci, 1992). Estes tipos de características representam excelentes alvos para SAM em *Eucalyptus*. Uma alta herdabilidade deveria a princípio refletir um número pequeno de locos controlando a variação da característica. Isto permite uma estimativa mais precisa da localização e magnitude de efeito dos principais QTL e uma manipulação mais rápida em gerações de melhoramento.

Estudos de simulação sobre a eficiência esperada de SAM em plantas abundam na literatura (por exemplo Lande & Thompson, 1990). Muito pouco, no entanto, é relatado sobre resultados experimentais, mesmo em plantas anuais. Em árvores, resultados de um estudo em andamento visando avaliar a eficiência de SAM precoce em testes de progênie de *Eucalyptus* foram relatados por Squilassi & Grattapaglia (1997). SAM foi conduzida com base em marcadores RAPD flanqueando 4 alelos de QTL previamente mapeados para crescimento volumétrico aos 6,5 anos para uma árvore elite de *Eucalyptus grandis*. Foi conduzida uma análise da coincidência entre quais indivíduos seriam selecionados com base em medidas de crescimento nas idades 12, 24 e 36 meses e quais seriam selecionados com base somente na presença dos alelos favoráveis aos QTL maternos (valor genotípico). Nas condições experimentais empregadas, somente 40% dos indivíduos selecionados, com base no fenótipo aos 36 meses, possuíam uma composição genotípica superior aos 4 QTL. Quando a eficiência da SAM foi avaliada levando-se em conta a contribuição dos QTL tanto a partir do genitor feminino como dos masculinos, esta continuou baixa para seleção de árvores individuais, mas foi respectivamente 100% e 83% nas idades de 24 e 36 meses para seleção de famílias de irmãos completos, i.e. 100% de coincidência entre famílias selecionadas com base no crescimento médio e valor genotípico médio da família. Os resultados indicaram que a SAM foi muito eficiente para seleção precoce ao nível de média de família, mas não ao nível de cada árvore individual. Considerando que as correlações juvenil x adulto em árvores são tipicamente baixas, é possível que a coincidência de seleção fenotípica e SAM ao nível individual melhore à medida que a idade de rotação se aproxime (6,5 anos). Este experimento deve ser visto portanto como em andamento.

Independentemente da característica, espera-se que um impacto significativo da SAM possa ser realizado na seleção precoce. Isto poderia se concretizar tanto no contexto de seleção recorrente em populações elite pequenas, bem como para a seleção de indivíduos para propagação vegetativa. Na seleção recorrente, indivíduos selecionados poderiam ser mais rapidamente recombinados para produzir a próxima geração, potencialmente aumentando o ganho genético por unidade de tempo. Na seleção de genótipos a serem usados como clones, a possibilidade de se praticar uma intensa seleção preliminar em um estágio bastante juvenil, evitaria o problema comum de perda de capacidade de regeneração ou de enraizamento adventício com a mudança da fase fisiológica. A pré-seleção de genótipos candidatos seria conduzida com base na composição de alelos favoráveis a QTL específicos antes que eles entrassem na fase de teste clonal, o que potencialmente reduziria a dimensão e custos destes testes. Para espécies com problemas de enraizamento, indivíduos selecionados poderiam então ser micropropagados ou poderiam ser mantidos em fase juvenil. Em uma primeira fase deste procedimento, resultados de testes clonais em campo seriam necessários para corroborar a seleção preliminar. Em estágios posteriores do programa, uma vez que a validação e experimentos preditivos tenham sido realizados, uma seleção rígida aos QTL poderia ser implementada e indivíduos selecionados poderiam ser encaminhados de forma imediata para jardins clonais visando à multiplicação operacional de clones.

A seleção assistida por marcadores para características múltiplas enfrentará muitas das mesmas dificuldades encontradas pela seleção convencional de

características múltiplas. Progênies de tamanhos muito grandes teriam que ser geradas para se obter uma probabilidade razoável de recuperar os genótipos com combinações favoráveis de alelos na maioria dos QTL de interesse. Ao se empregar a SAM , deverão ser estabelecidas prioridades, não somente para as características, mas também para os QTL específicos de cada característica. Isto vai demandar uma compreensão muito profunda da magnitude relativa de cada QTL e dos alelos segregando a estes locos, bem como de potenciais interações entre QTL e *backgrounds* genéticos e efeitos pleiotrópicos dos QTL. Entretanto, o mapeamento de ligação permitirá ao melhorista compreender as bases de correlações negativas entre características e potencialmente romper estas ligações indesejadas por meio da seleção de genótipos recombinantes específicos.

Uma estratégia realista para a implementação de SAM em *Eucalyptus* poderia ser a busca de somente alguns dos principais QTL para uma característica de qualidade que confere um valor agregado significativo. Teoricamente, quando a proporção total da variância genética aditiva explicada pelo locos marcadores excede a herdabilidade da característica, a seleção de marcadores *per se* é mais eficiente do que a seleção de um fenótipo individual. É possível que para uma característica específica, com apenas alguns alelos aos QTL de grande efeito, tal meta seja alcançada. Por outro lado, caso nenhum gene de maior efeito seja detectado em um experimento de tamanho razoável, talvez seja mais sábio descartar o uso da SAM para aquela característica. Embora estimativas de herdabilidade de uma característica sejam específicas para materiais genéticos e ambientes distintos, estes valores podem ser úteis para fornecer uma pista inicial. Intuitivamente, a probabilidade da existência de genes de maior efeito para características de baixa herdabilidade é menor do que para características de herdabilidade alta. Porém isto não pode ser usado como um parâmetro para descartar possíveis experimentos de mapeamento de QTL. Mesmo com baixa herdabilidade, as características ainda poderiam exibir QTL de maior efeito, e particularmente nestes casos SAM teria o maior impacto.

Com o advento de marcadores moleculares mais eficientes para a análise genômica, o mapeamento contínuo de QTL de maior efeito, a identificação dos genes responsáveis por estes QTL em espécies modelo, e o aprimoramento das estratégias de melhoramento para melhor explorarar a variação dentro de famílias, as perspectivas de se usar SAM em gerações avançadas de melhoramento genético de eucaliptos são promissoras. Entretanto, a opção por seleção assistida por marcadores deve ser feita caso-a-caso e as expectativas não devem ser superestimadas até que dados experimentais sólidos sejam acumulados sobre os ganhos realizados com base na incorporação de seleção assistida por marcadores em comparação àqueles realizados exclusivamente com a seleção fenotípica convencional.

8. GERENCIAMENTO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

Enquanto que o uso de mapas genéticos para a seleção de genótipos superiores ainda representa um desafio que depende de pesquisa adicional, marcadores moleculares podem ser usados de modo imediato para resolver várias questões relacionadas ao gerenciamento e estruturação da variabilidade genética e identificação

individual em populações de melhoramento e produção. Estas aplicações podem ser particularmente úteis em espécies de *Eucalyptus* para as quais vários programas de melhoramento genético ainda estão em fase iniciais de estabelecimento.

Embora marcadores isoenzimáticos tenham sido tradicionalmente utilizados para estes propósitos (Moran & Bell, 1983), polimorfismos de DNA fornecem um outro nível de resolução e variabilidade tanto ao nível de loco individual com valores de heterozigosidade muito maiores, quanto ao nível de genoma com maior cobertura. Tecnologias de marcadores moleculares de alto desempenho permitem uma amostragem muito eficiente do genoma e uma estimativa precisa de divergência genética, variabilidade e discriminação entre genótipos. Algumas aplicações operacionais dos marcadores moleculares para o gerenciamento da variabilidade genética em *Eucalyptus* são apresentadas a seguir.

8.1 DISCRIMINAÇÃO E VERIFICAÇÃO DE CLONES ELITE

Marcadores de DNA são muito potentes para a resolução de questões de identidade clonal. A identificação correta de clones tem implicações importantes em diversos procedimentos de melhoramento genético, gerenciamento e controle de qualidade de pomares de sementes e plantios operacionais. Em um estudo de discriminação e verificação de genótipos de *Eucalyptus*, a similaridade baseada em marcadores RAPD foi relativamente alta. Porém, todos os indivíduos analisados puderam ser distinguidos entre si. Perfis RAPD únicos permitiram a detecção de casos onde clones de eucalipto haviam sido identificados incorretamente. Um exemplo envolveu a confirmação de que um único clone era de fato uma mistura de dois clones diferentes (Keil & Griffin, 1994). Estudos deste tipo são hoje muito comuns e rotineiramente utilizados por um número crescente de empresas florestais em todo o mundo.

Embora marcadores RAPD forneçam um poder de discriminação razoável para a identificação clonal, em situações não raras de existência de parentesco entre clones ou em investigações mais refinadas de relacionamento genético entre clones, ou ainda para o estabelecimento de um *fingerprint* genético robusto para fins de registro de cultivares ou disputa legal torna-se absolutamente necessário o uso de marcadores moleculares mais específicos e com maior conteúdo informativo tais como marcadores baseados em microssatélites.

O alto grau de multialelismo e a herança mendeliana codominante simples e clara dos microssatélites fornecem um sistema extremamente potente para a identificação única de indivíduos de *Eucalyptus* principalmente quando existe a possibilidade de existir ascendentes em comum entre os indivíduos. Kirst *et al.* (1998) demonstraram o alto poder de resolução desta classe de marcadores em *Eucalyptus*. Uma população de melhoramento de 192 indivíduos de *E. grandis* foi genotipada com um conjunto de seis microssatélites altamente polimórficos (Figura 4). O número de alelos detectados variou de 6 a 33 com uma média de 19,8±9,2. A heterozigosidade esperada foi em média 0,86±0,11. Ao se utilizarem 3 locos, todos os 192 indivíduos puderam ser prontamente discriminados. A probabilidade combinada de identidade (i.e. a probabilidade de dois indivíduos terem o mesmo genótipo multiloco devido simplesmente ao acaso) considerando-se todos os 6 locos conjuntamente era inferior

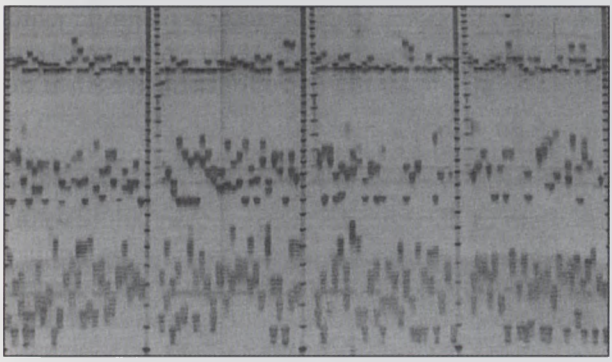


FIGURA 4. Perfis genéticos de 96 indivíduos elite de *E. urophylla* obtidos com um sistema *multiplex* de três locos microssatélites com detecção em nitrato de prata. Os genótipos multiloco altamente heterozigotos observados permitiram a discriminação imediata de todos os 96 indivíduos. Conjuntos de 24 indivíduos são separados por padrões de tamanho (escada alélica de 10 bp - Gibco) (Kirst *et al.*, 1998).

a 1 em 2 bilhões. Estimativas de coeficientes de similaridade calculadas a partir de dados de microssatélites foram bem menores do que aquelas normalmente obtidas em estudos semelhantes com marcadores RAPD e AFLP. A análise de locos microssatélites em sistemas *multiplex* (i.e. vários locos analisados simultaneamente) com múltiplas fluorescências e genotipagem em seqüenciador automático tem sido aperfeiçoada para a detecção simultânea de até seis locos (Kirst *et al.*, 1998; Kirst, 1999).

8.2 CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO

Populações de melhoramento podem ser caracterizadas pela quantificação dos níveis e organização de variabilidade genética dentro e entre subpopulações, grupos de reprodução e progênies. Estes dados podem ser utilizados para melhorar a estrutura das populações de melhoramento, para infundir material novo em populações e decidir sobre a seleção, enriquecimento ou eliminação de acessos de germoplasma em bancos. A redução de variabilidade genética em populações de melhoramento é essencialmente o resultado da seleção direcional aliada ao incremento da endogamia devido a cruzamentos aparentados e processos de deriva genética. A restrição da contribuição genética de uma mesma família para a população selecionada, i.e. número de indivíduos selecionados por família, promove a manutenção da variabilidade, mas por outro lado tipicamente reduz o ganho genético potencial. A restrição do número de famílias pode aumentar o ganho mas reduz a variabilidade genética. Em sistemas de *pedigree* incompletos, freqüentemente usados na forma de famílias de meios-irmãos para avançar gerações de melhoramento de *Eucalyptus*, um sistema de monitoramento genético baseado em marcadores para acompanhar os níveis de variabilidade genética ao longo dos diferentes ciclos de um programa de melhoramento poderia ser particularmente útil, uma vez que permitiria uma flexibilidade muito maior durante o processo de seleção e auxiliaria no controle da taxa de incremento da endogamia.

Gaiotto & Grattapaglia (1997) estimaram a distribuição da variabilidade genética dentro e entre famílias de polinização aberta de uma população de melhoramento a longo prazo de *E. urophylla* empregando marcadores AFLP. Uma análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que uma proporção significati-vamente mais elevada da variação genética foi mantida dentro das famílias (69%) em comparação à variação encontrada entre famílias (31%). Uma análise da similaridade genética indicou que

as 121 famílias de polinização aberta que compuseram a população de melhoramento exibiram uma distribuição uniforme de similaridade genética sem agrupamentos significativos das famílias. A diversidade genética total entre indivíduos dentro de famílias foi calculada e as famílias foram ordenadas ("rankeadas") de acordo com as estimativas de diversidade genética da mais para a menos geneticamente diversa. Com base nesta análise, foi proposta uma estratégia de seleção intra e interfamiliar baseada na incorporação das estimativas de diversidade genética. Esta abordagem, aplicada de forma complementar à seleção fenotípica com base no *ranking* das famílias para características de importância econômica, permite a maximização do ganho genético simultaneamente à maximização da diversidade genética mantida na nova população selecionada.

Um protocolo para isto envolveria os seguinte passos: a) com base em testes de progênie, famílias de polinização aberta poderiam ser ordenadas pelo valor fenotípico de acordo com um índice de seleção; b) uma amostra de 12 a 16 indivíduos de cada família classificada fenotipicamente como sendo de ponta, seriam genotipados com uma combinação de AFLP ou RAPD e microssatélites, fornecendo uma ampla cobertura da variabilidade seja ao nível de locos como de genoma. Cerca de duas vezes o número de famílias a serem selecionadas seria genotipado. Isto permitiria flexibilidade de escolha no momento da utilização da informação de diversidade genética intrafamiliar; c) os dados de marcadores seriam usados para calcular a diversidade genética existente dentro de cada família; as famílias seriam ordenadas conforme a diversidade genética; d) no momento da seleção inter e intrafamiliar, seria incorporada a informação sobre diversidade genética para cada família. Por exemplo, em casos onde famílias forem equivalentes para o valor fenotípico, a seleção seria baseada na diversidade genética, i.e. a família com maior diversidade seria selecionada. Além disso, nestas famílias um número maior de indivíduos poderia ser selecionado para a próxima geração.

8.3 ESTIMATIVA DE SIMILARIDADE GENÉTICA PARA O DELINEAMENTO DE CRUZAMENTOS E PLANTIOS OPERACIONAIS

Em programas de melhoramento florestal, independentemente da espécie, cruzamentos controlados são geralmente caros, levam tempo e demandam pessoal treinado. Em função da dificuldade de realizar todos os possíveis cruzamentos entre indivíduos selecionados, escolhas sempre têm que ser feitas sobre quais árvores elite devem ser acasaladas. Alguma seleção, baseada no desempenho de cada indivíduo seja como árvore *per se* ou como genitor, ou ainda em informações de origem, deve ser feita antes de incluir um indivíduo em um esquema de cruzamento. Apesar dos recentes desenvolvimentos de novas metodologias mais rápidas e baratas para a realização de cruzamentos controlados em *Eucalyptus* (de Assis, T.F. – Comunicação pessoal), a realização de um grande número de cruzamentos controlados ainda é um fator limitante em vários programas de melhoramento. Qualquer método que permita predizer o desempenho de uma árvore como genitor merece atenção. Um dos "cálices sagrados" dos melhoristas moleculares tem sido a possibilidade de predizer com precisão o desempenho da progênie baseando-se em estimativas de distância genética entre os genitores obtidas a partir de dados de marcadores moleculares. Vaillancourt *et al.* (1995b) utilizaram distâncias genéticas baseadas em marcadores RAPD para

predizer a heterose em progênies de *E. globulus*. A capacidade da distância genética em predizer heterose foi significativa, mas explicou somente 5% da variação na capacidade específica de combinação. Baril *et al.* (1997) utilizaram a estrutura da diversidade genética estimada com marcadores RAPD dentro e entre *E. grandis* e *E. urophylla* para determinar equações de predição para crescimento volumétrico de híbridos com 38 meses. Este estudo surpreendentemente mostrou que a distância genética baseada em marcadores RAPD com freqüências semelhantes nas duas espécies previu com sucesso o valor de um cruzamento. Por este modelo, a distância genética estimada entre indivíduos das duas espécies explicou a capacidade geral de combinação e a capacidade específica de combinação para crescimento volumétrico com um coeficiente global de determinação de 81,6%.

Marcadores RAPD foram usados para recomendar cruzamentos entre indivíduos geneticamente mais divergentes em um programa de seleção recorrente recíproca entre *E. grandis* e *E. urophylla* para melhoramento híbrido no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1997). O conjunto dos 20 cruzamentos mais divergentes e os 20 menos divergentes entre as duas espécies que constituem as duas populações, foi recomendado. A perspectiva deste estudo é que cruzamentos entre os indivíduos mais divergentes irão potencialmente maximizar a segregação nas progênies resultantes e que segregantes transgressivos sejam recuperados e clonados. Cruzamentos entre indivíduos menos divergentes também foram recomendados com o objetivo de fornecer um controle experimental e potencialmente com a finalidade de recuperar progênies híbridas mais uniformes. Estas hipóteses serão testadas quando as progênies F_1 derivadas dos cruzamentos divergentes e próximos alcançarem a idade de avaliação. Dependendo dos resultados deste experimento em andamento, serão feitas recomendações futuras sobre a possibilidade de utilizar dados de marcadores moleculares nestas populações. Se estas hipóteses forem confirmadas, uma economia significativa de tempo e recursos poderá advir, uma vez que a realização de todos os cruzamentos controlados possíveis entre os indivíduos selecionados de cada população na fase recíproca não seria uma meta atingível.

Dados de marcadores RAPD foram usados para quantificar a similaridade genética entre clones elite de *Eucalyptus* para fins de plantio operacional de talhões clonais. Como a história do melhoramento genético seletivo em *Eucalyptus* é muito recente, informações sobre a origem de muitos destes clones são precárias. Plantações clonais de *Eucalyptus* geralmente envolvem apenas alguns genótipos superiores de origem desconhecida. Costa e Silva & Grattapaglia (1997) utilizaram marcadores RAPD para quantificar a similaridade genética em um grupo de 15 clones elite. Análises comparativas de similaridade genética mostraram que existia maior variabilidade genômica no grupo de clones do que dentro e entre famílias de meios-irmãos de polinização aberta. Dados de similaridade genética entre clones também foram usados para propor uma estratégia de plantio em "mosaico" genético, i.e. evitando o plantio de clones geneticamente mais próximos em talhões contíguos de floresta. Esta estratégia proposta se baseou na premissa de que clones geneticamente relacionados compartilham uma origem e ancestralidade comuns, tendo estado sob pressões seletivas semelhantes e portanto compartilham com maior probabilidade os mesmos alelos de suscetibilidade ou tolerância a pragas e patógenos.

8.4 SISTEMA DE CRUZAMENTO E DETERMINAÇÃO DE PATERNIDADE EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO

A prática do melhoramento florestal com controle de ambos os sexos é difícil e demorado em espécies de *Eucalyptus*. A polinização controlada requer a emasculação e o número de sementes obtidas por cápsula é normalmente pequeno. A condução das populações de melhoramento via polinização aberta e controle exclusivo do genitor materno com testes de progênies de meios-irmãos é prática comum na maioria dos programas de melhoramento genético de espécies do gênero. É uma opção de baixo custo que permite boa estimativa do valor de melhoramento dos genitores maternos. Entretanto, a maior parte da variabilidade genética é encontrada dentro das famílias e a intensidade de seleção dentro de famílias normalmente é limitada pelo número de indivíduos plantados em um teste de progênie (geralmente menos do que 50 por família). O conhecimento de taxas de fecundação cruzada *versus* autofecundação é essencial para a manutenção de níveis adequados de variabilidade genética para ganhos contínuos. A taxa de fecundação cruzada em uma população de melhoramento de *Eucalyptus urophylla* conduzida por polinização aberta foi estimada usando-se dois tipos de marcadores dominantes baseados em PCR, RAPD e AFLP. As estimativas de taxas de fecundação cruzada indicaram a predominância de fecundação cruzada (≈90%) sugerindo que estava ocorrendo uma manutenção adequada de variabilidade genética dentro de famílias (Gaiotto *et al.*, 1997b).

Finalmente, grandes plantios operacionais de famílias de polinização aberta oriundos de pomares de semente estão se tornando prática comum em diversas empresas florestais. Ribeiro *et al.* (1998) empregaram marcadores microssatélites para o controle de qualidade das sementes provenientes do pomar e para a determinação de paternidade de indivíduos superiores selecionados em florestas operacionais deste tipo. A análise resultou na identificação de dois genitores masculinos específicos que geraram a maior parte dos indivíduos selecionados. Esta informação permitiu o desbaste do pomar existente e o estabelecimento de um pomar de semente triclonal para a produção de sementes de alta qualidade. Este estudo, além de demonstrar o poder de resolução da análise de marcadores moleculares para o controle de qualidade de contaminação de semente e pólen em descendências geradas de pomares de semente, estabeleceu uma nova metodologia com grande potencial de utilização no melhoramento de *Eucalyptus*, bem como de outras espécies florestais alógamas nas quais a realização de grande número de cruzamentos controlados é difícil e demorada. A utilização de baterias de marcadores moleculares microssatélites altamente hipervariáveis permitiu a determinação precisa de paternidade de descendentes superiores o que possibilitou a detecção de combinações específicas de genitores para a geração de descendências de maior crescimento volumétrico. Embora neste trabalho foam estudadas progênies de meios-irmãos e portanto em princípio não havia questionamento quanto à maternidade, o poder de resolução dos marcadores moleculares permitiria da mesma forma a determinação simultânea de maternidade e paternidade caso isso fosse necessário. No caso específico de *Eucalyptus*, esta metodologia representa uma ferramenta interessante para seleção retrospectiva, ou seja um desbaste seletivo de árvores em pomares de semente sejam eles pomares clonais ou por mudas.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tecnologias de análise genômica com marcadores moleculares estão em constante e rápida evolução, sendo um dos desafios a caracterização da variação de seqüência de DNA entre indivíduos em grande número de amostras com ampla cobertura genômica. Atualmente, diversas tecnologias que dispensam o uso de eletroforese baseadando-se sim na hibridização de DNA em lâminas de algumas dezenas de milímetros quadrados contendo moléculas de DNA muito específicas imobilizadas em arranjos sistemáticos (os chamados *microarrays* ou *DNA chips*) estão se tornando disponíveis, principalmente para seres humanos e organismos modelo (por exemplo Chee *et al.*, 1996). Esta tecnologia está acelerando enormemente a análise de expressão gênica de milhares de genes "em paralelo" (i.e. simultaneamente) e espera-se que venha a revolucionar os procedimentos de genotipagem individual, geração de perfis de expressão e mapeamento de ligação em organismos vivos. Esta tecnologia está permitindo ainda a exploração de uma das classes mais abundantes de polimorfismos de DNA em genomas de eucariotos, os SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ou polimorfismos de nucleotídeos únicos. Estas mutações em pares de bases individuais ocorrem em média uma vez a cada 1000 pares de base no genoma humano (Kruglyak, 1997) e requerem um ensaio binário do tipo +/- e não uma separação molecular por tamanho ou carga. Em seres humanos, a disponibilidade de grandes números de marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) ou seja sítios identificados (etiquetados) por seqüências levou ao desenvolvimento de um grande número de marcadores bi-alélicos baseados em SNP. Um mapa genético do genoma humano com 2227 SNPs foi construído, e protótipos de *chips* de DNA para genotipagem foram desenvolvidos para permitir a genotipagem simultânea de 500 SNPs (Wang *et al.*, 1998). O desenvolvimento destas tecnologias depende essencialmente da disponibilidade de seqüenciamento genômico em larga escala. Esta informação está rapidamente sendo gerada para seres humanos e organismos modelo incluindo *Arabidopsis* como o principal representante das plantas. Embora homologias de seqüência existam para genes expressos, potencialmente permitindo rápidos avanços em estudos de expressão gênica, a homologia para seqüências não codificantes, nas quais a maioria dos SNPs é encontrada cai rapidamente entre organismos taxonomicamente distantes. Sendo assim, algum tempo será necessário com a tecnologia disponível hoje para que a genotipagem de alto desempenho seja factível em espécies florestais e da mesma forma para a maioria das plantas cultivadas.

Os avanços nas tecnologias de análise genômica estão sendo acompanhados pelo estabelecimento de um número crescente de laboratórios privados de prestação de serviço especializado de genotipagem a custos competitivos. O desafio para o melhorista genético não será gerar informação de marcadores, mas sim ser rápido e criativo ao saber exatamente qual informação gerar e especialmente como utilizá-la. A este respeito, inovações nas táticas de melhoramento genético florestal terão que ser consideradas pelos melhoristas nas décadas por vir. Pequenos grupos de reprodução, testes de grandes famílias e seleção dentro de famílias com alta intensidade de seleção serão algumas delas. Novas e melhores ferramentas de análise estatística para dados discretos de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos e elas

estão se tornando cada vez mais refinadas, permitindo a análise e acomodação de diversos tipos de delineamentos para o mapeamento QTL e a construção de mapas genéticos, bem como a simulação de esquemas de seleção assistida por mrcadores (Liu, 1998).

Cientes do tipo de informação que marcadores moleculares podem fornecer, e os custos envolvidos, a pergunta que resta é se há oportunidades reais no momento para a incorporação de tecnologias de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de espécies florestais. Claramente, os marcadores podem ser usados como umaferramenta para gerenciar a variabilidade genética de forma inteligente. Esta é uma tecnologia pronta-para-uso e aplicável em diversos procedimentos operacionais tanto em programas de melhoramento iniciais quanto avançados. Embora útil, isto poderia não ser uma prioridade para programas ainda em fase de concepção, conduzidos com orçamentos muito limitados e onde ganhos genéticos significativos podem ser alcançados implementando-se procedimentos convencionais de seleção juntamente à propagação clonal. Em programas de melhoramento genético avançado, os marcadores poderiam ser úteis para seguir a herança e introgressão de alelos favoráveis. Nesta fase, quando alelos favoráveis de freqüência intermediária e alta tiverem sido explorados, a variação se torna limitante e o progresso genético dependerá da sintonia fina de combinações genotípicas por meio da alteração das freqüências de alelos raros com grande magnitude de efeito aos principais QTL. SAM seria aplicada mais provavelmente no melhoramento genético de populações elite múltiplas desenvolvidas especificamente para características de qualidade. Este esforço deverá contemplar os indivíduos geneticamente mais valiosos em uma população de melhoramento, e, provavelmente, iniciando com apenas uma característica em um grupo de reprodução específico ou em uma população elite específica para SAM. A SAM dificilmente seria justificável para o avanço da população base do programa da qual são extraídos os grupos de reprodução, seja devido ao grande número de indivíduos envolvidos quanto tendo em vista os objetivos gerais de seleção para adaptabilidade tipicamente utilizados nesta fase.

A incorporação efetiva de SAM no melhoramento genético de *Eucalyptus* claramente requer um esforço experimental adicional significativo. Para este fim, é essencial que experimentos de localização e caracterização de QTL sejam estabelecidos com grandes tamanhos amostrais, replicação clonal (sempre que possível), em diversos locais e *backgrounds* genéticos. Uma vez que os genitores utilizados nos experimentos de mapeamento de QTL em árvores são escolhidos ao acaso a partir das melhores árvores da população de melhoramento, o uso de múltiplos genitores em delineamentos fatoriais deve ser considerado, a fim de aumentar o poder de detecção de QTL e ordenamento dos efeitos alélicos a estes locos. O desafio para o melhorista molecular não será o mapeamento dos QTL, mas sim o descobrimento e ordenamento por magnitude de efeito da diversidade alélica existente aos QTL conhecidos. Para conduzir tal classificação, um mapa de ligação "referência" de marcadores microssatélites multialélicos transportáveis será fundamental. Somente através da localização de alelos de grande efeito, a SAM irá efetivamente superar a eficiência da seleção fenotípica e contribuirá para o avanço mais rápido de programas de melhoramento genético. Embora uma série de experimentos de mapeamento de QTL estejam em andamento em todo o mundo, eles certamente não são suficientes para

fornecer as respostas definitivas e rápidas para todos os principais desafios que existem para a implementação de SAM em espécies florestais. Uma vez que a SAM deve ser considerada caso-a-caso tanto em termos de características alvo quanto de material genético disponível, qualquer empresa florestal que deseje efetivamente adotar o melhoramento molecular, deve planejar um esforço significativo interno em pesquisa e desenvolvimento ou através de cooperativas de pesquisa pré-competitiva a fim de avaliar concretamente o potencial desta tecnologia no melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a todos os meus orientados de iniciação científica, mestrado e doutorado no Laboratório de Genética de Plantas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas suas valiosas contribuições nos trabalhos discutidos. Agradeço à ARACRUZ Celulose S.A e seu corpo técnico pela colaboração contínua na condução de experimentos. Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia através de um projeto competitivo apoiado pelo PADCT/FINEP, bem como uma bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARIL, C.P.; VERHAEGEN, D.; VIGNERON, PH.; BOUVET, J.M.; KREMER, A. Structure of the specific combining ability between two species of *Eucalyptus*: I. RAPD data. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.796-803, 1997.

BEAVIS W.D.; GRANT D.; ALBERTSEN M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci, **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.141-145, 1991.

BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Comparative mapping in *Eucalyptus* reveals significant RAPD locus linkage and order conservation between trees and greater meiotic recombination in females. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.24-29.

BRONDANI, R.P.V.; CAMPINHOS, E.; GRATTAPAGLIA, D. Mapped RAPD markers are transferable among *Eucalyptus* trees from the same population. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.111-115.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development and mapping of microsatellite based markers in *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.816-829, 1998.

BYRNE, M.; MURRELL, J.C.; ALLEN, B.; MORAN, G.F. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers, **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.869-875, 1995.

BYRNE M.; MARQUES-GARCIA M.I.; UREN T.; SMITH D.S.; MORAN G.F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v.44, p.331-341, 1996.

BYRNE M.; MURRELL J.C.; OWEN J.V.; KRIEDEMANN P.; WILLIAMS E.R.; MORAN, G.F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*, **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.674-681, 1997a.

BYRNE M.; MURRELL J.C.; OWEN J.V.; WILLIAMS E.R.; MORAN, G.F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.975-979, 1997b.

CAETANO-ANOLLES, G. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1668-1674, 1996.

CAMPINHOS, E.N.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; ALFENAS, A. Stability of expression of QTL alleles controlling growth across variable genetic backgrounds in *Eucalyptus grandis*, In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador,1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.186-191.

CHEE M.; YANG, R.; HUBBEL, E.; BERNO, A.; HUANG, X.; STERN, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D.; MORRIS, M.; FODOR, S. Accessing genetic information with high-density DNA arrays, **Science**, v.74, p.610-614, 1996.

COSTA E SILVA, C.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD relatedness of elite clones, applications in breeding and operational clonal forestry. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.161-166.

DEMUNER, B. J.; BERTOLUCCI, F.L.G.Tree breeding, a new approach through evaluation of genetic and phenotypic parameters of eucalypt wood and pulp. In: CONGRESS OF THE BRAZILIAN PULP AND PAPER INDUSTRIES, 26., São Paulo, 1992. **Proceedings**. São Paulo, 1992. p.411-423.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, D.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of genetic variability in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.46-52.

GAIOTTO, F.A., CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. AFLP in *Eucalyptus*: fast construction of linkage maps and estimation of mating system and genetic variation in a breeding population. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 5., San Diego, 1997. **Abstracts**. San Diego, 1997a. p.276.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* s.t. Blake with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849, 1997b.

GRATTAPAGLIA, D. Pseudo-testcross mapping strategy using RAPD markers. In: MICHELI, M.R.; BOVA, R. (Ed.) **Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR**. Berlin: Springer Verlag, 1997. p.201-218.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H.D. JR. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, v.24, p.1074-1078, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF R.R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.1121-1137, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.933-947, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI F.L.; PENCHEL R.; SEDEROFF R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics**, v.144, p.1205-1214, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.X.; WILCOX, P.; MCCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; MCKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R.R. Mapping in woody plants with RAPD markers, application to breeding in forestry and horticulture. In: CSA/AAHS SYMPOSIUM "APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING", Minneapolis, 1992. **Proceedings**. Minneapolis,1992. p.37-40.

GROOVER, A.; DEVEY, M.; FIDDLER, T.; LEE, J.; MEGRAW, R.; MITCHELL-OLDS, T.; SHERMAN, B.; VUJCIC, S.; WILLIAMS, C.; NEALE, D.B. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. **Genetics**, v.138, p.1293-1300, 1994.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; VALLE, L.A.C.; CHEAVEGATTI, A.; ODA, S.; MELLO, E.J. Inheritance of the rust (*Puccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus grandis*. **Genetics and Molecular Biolology**, v.21, p.185,1998.

KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics** v. 89, 442-450, 1994.

KIRST, M. Desenvolvimento e aplicação de sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizados, baseados em marcadores microssatélites, para espécies do gênero *Eucalyptus*. Viçosa: UFV, 1999. 149p. Dissertação, Mestrado.

KIRST M., BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Screening of designed primer pairs for recovery of microsatellite markers and their transferability among species of *Eucalyptus*. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.167-171.

KIRST, M.; BRONDANI, R.P.V.; CIAMPI, A.Y.; GAIOTTO, F.A.; GOMES, M.; GRATTAPAGLIA, D. Fingerprinting *Eucalyptus* genotypes with highly informative microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biolology**, v.21, p.185, 1998.

KRUGLYAK, L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. **Nature Genetics**, v.17, p.21-24, 1997.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v.124, p.743-756, 1990.

LANDER, E.S. The new genomics, global views of biology. **Science**, v.274, p.536-539, 1996.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p.265-344, 1995.

LIU, B.H. **Statistical genomics**. Boca Raton: CRC Press, 1998.

MARQUES, C.M.; ARAUJO, J.A.; FERREIRA, J.G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics** v.96, p.727-737, 1998a.

MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.J.; FERREIRA, J.G.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF R.R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**,1998b. /Sumetido/

MORAN, G.F.; BELL, J.C. Eucalyptus. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.) **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.423-441.

MURANTY, H. Power of tests for quantitative trait loci detection using full-sib families in different schemes. **Heredity**, v.76, p.156-165, 1996.

O'MALLEY, D.M.; GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.X.; WILCOX, P.L.; AMERSON, H.V.; LIU B.H.; WHETTEN, R.; MCKEAND, S.; KUHLMAN, E.G.; MCCORD, S.; CRANE, B.; SEDEROFF R.R. Molecular markers, forest genetics and tree breeding. In: GUSTAFSON, J.P.; FLAVELL, R.B. (Ed.) **Genomes of plants and animals**. New York: Plenum Press, 1996. p.87-102.

O'MALLEY, D.M.; MCKEAND, S.E. Marker assisted selection for breeding value in forest trees. **Forest Genetics**, v.1, p. 231-242, 1994.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, E.; LAI, E. (Ed.) **Nonmammalian genomic analysis**: a practical guide. London: Academic Press, 1996. p. 75-134.

REZENDE, G.D.S.P.; BERTOLUCCI, F.L.G.; RAMALHO, M.A.P. Eficiência da seleção precoce na recomendação de clones de eucalipto avaliados no norte do Espírito Santo e sul da Bahia. **Cerne**, v.1, p.45-50, 1994.

RIBEIRO, V.J.; BERTOLUCCI, F.L.G.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD marker-guided matings in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE ON EUCALYPTUS GENETICS AND SILVICULTURE, Salvador, 1997. **Proceedings**. Salvador, 1997. v.2, p.156-160.

RIBEIRO, V.J.; BRONDANI, R.P.V.; CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. Paternity determination of superior open pollinated progenies of *Eucalyptus* based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.212, 1998.

SHEPHERD, M.; CHAPARRO, J.; DALE, G.; JEFFERSON, L.; DUONG, H.; VOGEL, H.; WALSH, J.; GIBBINGS, M.; TEASDALE, R. Mapping insect resistance and essential oil traits in a tropical *Eucalyptus* hybrid. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. **Proceedings**. Hobart, 1995. p.420-423.

SQUILASSI, M.G.; GRATTAPAGLIA, D. Mapping QTL using linkage disequilibrium and efficiency of early marker assisted selection in *Eucalyptus*. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 5., San Diego, 1997. **Abstracts**. San Diego, 1997. p.296.

STRAUSS, S.H.; LANDE, R.; NAMKOONG, G. Limitations of molecular-marker aided selection in forest tree breeding. **Canadian Journal of Forest Research**, v.22, p.1050-1061, 1992.

VAILLANCOURT, R.E., POTTS, B.M., MANSON, A., ELDRIDGE, T. AND REID J.B. Using RAPD's to detect QTL in an interspecific F2 hybrid of *Eucalyptus*. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. **Proceedings**. Hobart, 1995a. p.430-433.

VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; WATSON, M.; VOLKER, P.W.; HODGE, G.R.; REID J.B.; WEST, A.K. Prediction of heterosis using RAPD generated distances between *Eucalyptus globulus* trees. In: CRC/IUFRO CONFERENCE - EUCALYPT PLANTATIONS, IMPROVING FIBRE YIELD AND QUALITY, Hobart, 1995. **Proceedings**. Hobart, 1995b. p.455-456.

VERHAEGEN, D. Prediction des valeurs genetiques, cartographie genetique et recherche de QTL dans un criosement interspecifique *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Paris: Universite de Paris-Sud, 1996. 138p. These, Docteur.

VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers, **Genome**, v.39, p.1051-1061,1996.

VERHAEGEN D.; PLOMION, C.; GION, J.M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.597-608, 1997.

WANG, D.G.; FAN, J.B.; SIAO, C.J.; BERNO, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.; MITTMANN, M.; MORRIS, M.S.; SHEN, N.; KILBURN, D.; RIOUX, J.; NUSBAUM, C.; ROZEN, S.; HUDSON, T.J.; LIPSHUTZ, R.; CHEE, M.; LANDER, E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of Single-Nucletiode Polymorphisms in the human genome. **Science**, v.280, p.1077-1082, 1998.

31

MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - USP/ESALQ, C.P. 9 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.

1. INTRODUÇÃO

O mapeamento de genes de resistência por meio de marcadores moleculares tem contribuído decisivamente para um melhor entendimento sobre as bases genéticas da resistência de plantas a fitopatógenos. No início, a justificativa para a utilização de marcadores pautava-se na idéia de que estes seriam amplamente utilizados em programas de seleção. Agora, passados mais de dez anos da publicação do primeiro artigo relativo ao mapeamento de um gene de resistência, está claro que, embora marcadores venham sendo utilizados com sucesso em tais programas, sua maior contribuição revelou-se em outro plano, na fase do "pré-melhoramento". Nesta fase, o objetivo é caracterizar fenotipicamente os diversos genes de resistência que podem estar segregando em um dado cruzamento e utilizar esta informação para escolher, dentre os vários, quais possuem efeitos fenotípicos desejáveis e que, portanto, são bons candidatos a serem selecionados.

Por "caracterização fenotípica" entende-se, primeiro, conhecer quantos são os genes envolvidos em determinada resistência e quais suas localizações cromossômicas. Em segundo lugar, determinar quais os efeitos fenotípicos de cada um e as magnitudes destes efeitos. Em terceiro lugar, estabelecer quão estáveis são os efeitos fenotípicos destes genes face a variações ambientais e a mudanças genéticas nas populações do patógeno. Além disto, devemos levar em consideração uma outra importante contribuição dos marcadores moleculares nesta área, qual seja a de orientar o processo de clonagem gênica. A clonagem de genes de resistência, por sua vez, possibilitou, recentemente, o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores, os chamados "marcadores homólogos a genes de resistência" ou, do termo em inglês, *resistance gene-like marker*. O desenvolvimento desta classe de marcadores vale-se de conhecimentos obtidos nas áreas de genômica e de mapeamento comparativo e vem sendo utilizada com sucesso no mapeamento de genes de resistência.

Neste capítulo, serão discutidos exemplos de cada uma das aplicações citadas acima, enfatizando os avanços no conhecimento da resistência de plantas a doenças proporcionadas pelo uso de marcadores moleculares. Como o leitor perceberá, discussões sobre metodologias de marcadores moleculares foram omitidas, recomendando-se para esta finalidade a leitura de Ferreira & Grattapaglia (1996).

2. RESISTÊNCIA MONOGÊNICA

Há resistências governadas por um único gene e outras por mais de um. Esta diferença se reflete no fenótipo, uma vez que resistências ditas monogênicas segregam qualitativamente, de maneira mendeliana, e resistências poligênicas o fazem de maneira quantitativa, não discreta. Fica óbvio perceber que, no primeiro caso, a seleção do gene de resistência é grandemente facilitada, pois o gene é seu próprio marcador. Seu efeito fenotípico é tamanho que torna-se impossível, mesmo aos leigos, não perceber sua presença em uma planta. Assim, qual a necessidade de identificar marcadores

ligados a ele? Do ponto de vista do melhoramento esta pergunta é pertinente e uma resposta precipitada diria que não há necessidade de o melhorista trabalhar com marcadores neste caso. Mas esta é uma resposta que não leva em consideração o fato de alguns patossistemas serem difíceis de serem trabalhados, quer seja devido a dificuldade de manutenção, isolamento e inoculação do patógeno ou avaliação da doença. Tome como exemplo a avaliação de resistência a nematóides, que exige manutenção de uma população em plantas hospedeiras e uniformidade na composição do inóculo, sem contar que o resultado da inoculação é de difícil avaliação, geralmente efetuada por contagem do número de galhas, um processo tedioso e demorado. As viroses seguem o mesmo exemplo, ainda mais se considerarmos que alguns vírus, que em sua totalidade não são cultiváveis, não são passíveis de serem inoculados mecanicamente, exigindo disponibilidade de insetos vetores. Um caso típico é o vírus do mosaico dourado do feijoeiro, cuja inoculação só é possível através da mosca branca, o que exige que programas de melhoramento sejam conduzidos sob condições de campo. Outros casos ainda requerem condições especiais de inoculação, como câmara úmida, temperatura controlada etc. Assim, voltando a nossa pergunta inicial, percebemos que existem alguns casos de seleção para resistência monogênica onde os marcadores podem eliminar ou aliviar a necessidade de toda esta parafernália fitopatológica através da identificação de indivíduos de uma população segregante portadores do marcador ligado ao alelo favorável sob seleção, resultando numa substancial economia de tempo e recursos.

Um outro aspecto importante em relação ao uso de marcadores moleculares aplicados a casos de resistência monogênica diz respeito a uma estratégia de utilização destes genes conhecida como "piramidamento de genes", onde o objetivo é incorporar, em um único genótipo, o maior número possível de genes de resistência. Para esta finalidade, geralmente adota-se o retrocruzamento convencional ou conversão por retrocruzamento como métodos de transferência. Como o programa trabalha com vários genes ao mesmo tempo, é interessante que marcadores sejam desenvolvidos para cada gene, de modo a monitorar a transferência dos mesmos durante o processo de obtenção de pirâmides. Um caso interessante acontece no caso da resistência do feijoeiro a ferrugem, onde vários genes de resistência raça-específicos foram identificados ligados entre si em acoplamento formando um bloco gênico. A identificação de marcadores que flanqueiam este bloco é de fundamental importância para que este possa ser identificado em gerações sucessivas de retrocruzamentos, evitando que genes sejam perdidos ao longo do processo (Haley *et al.*, 1993). Além disto, o uso dos marcadores alivia a necessidade de testar as plantas com os vários isolados do patógeno, necessários para identificar cada um dos genes componentes do bloco.

A técnica de mais fácil emprego quando se trata de mapear genes de resistência monogênica é utilizar linhagens quase-isogênicas (LQIs) e vários exemplos podem ser encontrados na literatura. Ogliari (1999), por exemplo, identificou um novo gene de resistência a *Exserohilum turcicum* em milho utilizando este tipo de material e marcadores microssatélites. O uso de pirâmides neste patossistema é preconizado como uma das formas de controle do patógeno, uma vez que existem vários monogenes de resistência descritos. Dessa forma, a procura de marcadores ligados a estes genes é

de suma importância (Simcox & Bennetzen, 1993). As LQIs usadas por Ogliari foram desenvolvidas por meio de retrocruzamento, onde a cada ciclo plantas RC_nF_1 foram inoculadas com um isolado de *E. turcicum* coletado no Brasil cujo espectro de virulência é desconhecido. Plantas resistentes (heterozigotas) foram selecionadas a cada ciclo e retrocruzadas com o parental suscetível por seis gerações. Ao final da sexta geração, plantas RC_6F_1 resistentes foram autofecundadas, gerando uma população segregante RC_6F_2. Estas plantas foram, então, submetidas a um cruzamento teste com uma linhagem suscetível S com a finalidade de identificar plantas RC_6F_2 resistentes homozigotas. A presença de segregação de um gene dominante de resistência foi confirmada neste cruzamento pela proporção observada 1:2:1 de progênies homozigotas resistentes e suscetíveis (ausência de segregação para resistência/ suscetibilidade dentro da progênie). O remanescente das sementes de indivíduos RC_6F_2 homozigotos para alelos de resistência foi utilizado para mais um ciclo de autocruzamento com a finalidade de aumentar o número de sementes. Uma linhagem RC_6F_3 resultante deste ciclo foi selecionada para o estudo em questão e, juntamente com a linhagem recorrente, foi genotipada com 125 marcadores microssatélites previamente selecionados de modo a cobrir o melhor possível o genoma .

A lógica de utilizar LQIs para identificar marcadores ligados a genes é simples: espera-se que as linhagens sejam geneticamente idênticas (monomórficas) para locos marcadores não ligados ao gene e que sejam polimórficas para marcadores situados no fragmento genômico doado pela linhagem parental doadora e que, portanto, estão ligados ao gene de resistência (Ma, 1991; Muehlbauer *et al.* 1988). Dos vários microssatélites testados por Ogliari (1999), somente 5 revelaram polimorfismos entre as LQIs. Destes cinco, dois pertencem ao cromossomo 2, dois ao cromossomo 5 e um ao cromossomo 6, segundo o mapa consensual de milho disponível na base de dados de milho (*www.agron.missouri.edu*). A identificação de três regiões genômicas distintas como possíveis locais do gene sob estudo nos leva a conclusão óbvia de que a estratégia de utilização de LQIs é passível de erros. A principal fonte de erros é que, por chance, uma linhagem resistente obtida por retrocruzamento pode diferir do parental recorrente não apenas para o segmento cromossômico portador do gene alvo, mas também para regiões não ligadas ao gene, uma vez que é possível que estas regiões se mantenham em estado heterozigótico durante todo o processo de retrocruzamento, seja por meio de seleção voluntária ou involuntária, e sejam fixadas para alelos do parental doador durante os ciclos de autofecundação finais. Assim, para esclarecer o real posicionamento do gene, o autor estudou a co-segregação destes cinco marcadores candidatos e o gene de resistência em uma população oriunda do retrocruzamento entre a linhagem resistente convertida e uma outra linhagem suscetível teste e concluiu que o gene está situado no cromossomo 2. No entanto, um gene de resistência a *E. turcicum*, denominado *Ht1*, já havia sido mapeado neste mesmo local por Bentolila *et al.* (1991). Como saber se o gene mapeado por Ogliari (1999) é o mesmo relatado por estes autores? Esta simples questão serve para nos lembrar que marcadores moleculares, por si só, não resolvem problemas fundamentais deste tipo, dado que um marcador define uma região cromossômica e não um gene. Para esclarecer esta questão, o autor teve que recorrer a recursos fitopatológicos básicos: inoculou a linhagem resistente com uma coleção de raças do patógeno e comparou o espectro de resistência conferida pelo gene da linhagem com o espectro do gene *Ht1*

de Bentolila *et al.* (1991) e de outros genes descritos na literatura presentes em linhagens diferenciais, concluindo que os espectros são diferentes e que, portanto, os genes são diferentes. Presentemente, no entanto, não se sabe se o novo gene, denominado de *Htp*, é uma forma alélica de *Ht1* ou se é um novo loco ligado a este. A exemplo da questão acima, os marcadores pouco podem ajudar na solução deste problema. Para confirmar uma destas duas hipóteses há que achar recombinantes, o que nos remete novamente aos testes fitopatológicos tradicionais. Este exemplo é interessante pois ilustra um ponto importante: marcadores moleculares são apenas ferramentas e que, como quaisquer outras, apresentam limitações. Seu uso no melhoramento para resistência a doenças não dispensa os conhecimentos e métodos fundamentais de fitopatologia.

Uma séria limitação ao uso de LQIs é que o desenvolvimento destas linhagens é laborioso e requer muito tempo. Assim, não existem LQIs disponíveis para um grande número de culturas. Para tentar contornar este problema, Michelmore *et al.* (1991) propuseram o uso da técnica de análise de segregantes agrupados, ou *bulked segregant analysis*. Segundo esta técnica, o DNA de plantas de uma população segregante (F_2, por exemplo) é agrupado em dois *pools*: um contendo DNA somente de plantas suscetíveis e outro somente de plantas resistentes. As amostras agrupadas e as linhagens parentais são então genotipadas com os marcadores. A exemplo das LQIs, somente marcadores ligados ao gene de resistência revelarão polimorfismos entre os dois agrupamentos, pois o *background* genético destes é casualizado em relação a locos marcadores não ligados ao gene responsável pela característica usada para a formação dos *pools*. Em termos práticos, os agrupamentos simulam LQIs. Além de dispensar a necessidade de LQIs, uma outra vantagem desta técnica é a de que ela também pode ser usada para identificar marcadores ligados a genes de resistência poligênica, como veremos abaixo, o que tornou esta técnica uma referência metodológica em estudos nesta área.

3. RESISTÊNCIA POLIGÊNICA

A grande aplicação dos marcadores moleculares, sem sombra de dúvida, é ao estudo das bases genéticas das resistências ditas poligênicas. Os marcadores permitem a "dissecção de características quantitativas em fatores genéticos discretos" (Lander & Botstein, 1989) ou, em outras palavras, permitem individualizar o efeito fenotípico de cada poligene e acompanhar a segregação de cada um. Esta dissecção é o que ficou informalmente chamado de "mendelização" de características poligênicas. Tais fatores genéticos são denominados de *quantitative trait loci* (QTL) ou, no caso específico de locos de resistência a doenças, de *quantitative resistance loci* (QRL).

3.1 QRLS X AMBIENTE

É sabido, de longa data, que a resistência de uma planta é função da interação entre os genes da planta e do patógeno, interação esta modulada pelo ambiente. Uma das maiores contribuições dos marcadores tem sido justamente a de permitir estimar o efeito ambiental na expressão fenotípica de QRLs e o trabalho de Bubeck *et al.* (1993) é um exemplo disto. Os autores estudaram resistência em milho a *Cercospora* em dois cruzamentos que diferiram entre si com relação às linhagens

parentais resistentes utilizadas (cruzamento 1 = ADENT x B73rhm1; cruzamento 2 = NC250A x B73rhm1). ADENT e NC250A são resistentes, mas em diferentes níveis, ao passo que B73rhm1 é suscetível ao patógeno. Os resultados indicaram a segregação de vários QRLs nos cruzamentos e que, somente em alguns casos, marcadores significativamente associados a QRLs em um cruzamento também o foram no outro, evidenciando que ADENT e NC250A possuem alguns QRLs em comum, mas nem todos. A identificação de QRLs distintos em materiais resistentes abre a possibilidade de que estes venham e ser combinados em um único genótipo, o que seria o equivalente, na prática, a construção de uma pirâmide de genes de resistência quantitativa.

Um outro aspecto a ser destacado com relação a este trabalho diz respeito a variação do número de QRLs detectados em um mesmo cruzamento em ambientes diferentes. A população ADENT x B73rhm1, por exemplo, foi avaliada em três ambientes e, de um total de 9 regiões cromossômicas significativamente associadas a resistência, somente uma região, localizada no cromossomo 2, mostrou associação significativa em todos os três ensaios. Uma outra região, do cromossomo 4, mostrou-se significativa em dois ensaios e as demais em apenas um dos três ensaios. Esta inconsistência de resultados entre ambientes, interpretada como sendo devida a interações genótipo x ambiente ou a variação aleatória dentro de ensaios, ilustra um aspecto importante: o de que, como qualquer outra característica métrica, a ação de genes de resistência quantitativa também é modulada por fatores ambientais. Até aqui, esta conclusão não difere dos trabalhos clássicos envolvendo interações G x A, mas há um componente fundamental que faz a diferença. Como foi dito no começo, uma vez que marcadores moleculares permitem individualizar o efeito de cada poligene, então o efeito do ambiente sobre os mesmos também pode ser individualmente avaliado. QRLs que apresentam marcada interação com o ambiente são interessantes do ponto de vista fitopatológico pois um estudo mais aprofundado dos mesmos pode fornecer informações sobre variáveis ambientais importantes ao desenvolvimento da doença (Kerns *et al.*, 1999). Por último, o trabalho aborda outra conclusão que pode ser generalizada para qualquer patossistema, qual seja a de que a contribuição dos QRLs para o fenótipo resistência varia em função do QRL analisado: uns QRLs apresentam efeito marcante sobre o fenótipo ao passo que para outros o efeito é apenas marginal. É claro que estimativas de contribuição fenotípica variam em função da distância entre marcador e gene, mas isto pode ser amenizado se os trabalhos forem conduzidos com base em mapas genômicos razoavelmente saturados com marcadores, como foi o caso do trabalho em discussão. Assim, se estudos forem conduzidos em diversos ambientes, torna-se possível identificar aqueles QRLs mais estáveis e de efeitos fenotípicos marcantes, que seriam então candidatos a programas de seleção.

As variações experimentais que podem ser empregadas para o estudo de interações QRL x ambiente são inúmeras. Souza *et al.* (2000), por exemplo, se ativeram apenas ao estudo dos efeitos da adubação nitrogenada sobre QRLs de resistência a *Xanthomonas* e genes de nodulação em feijoeiro. O nitrogênio, sabe-se, inibe o estabelecimento da associação simbiótica entre feijoeiro e *Rhizobium*. Aliado a isto, tem-se como regra geral que o excesso de nitrogênio predispõe a planta ao ataque de patógenos, mas não existem informações mais precisas sobre este fenômeno no



Quem planta Monsoy, colhe muito mais resultados.



A Monsoy é a marca do grupo Monsanto para produção e comercialização de sementes certificadas de soja, trazendo a alta qualidade de seu programa mundial de pesquisa, baseado no maior banco de germoplasma do mundo.

Suas sementes oferecem muito mais tecnologia e apresentam alto potencial produtivo, mostrando no campo muito mais resultados.

É por isso que a Monsoy é muito mais semente.

MONSOY

Muito mais semente.

EugeniaAMFL

patossistema feijoeiro x *Xanthomonas*. Assim, os autores realizaram experimentos em casa de vegetação onde plantas de linhagens recombinantes e segregantes para resistência a *Xanthomonas* e *Rhizobium* foram conduzidas sob dois regimes de adubação por meio de soluções nutritivas: num regime as plantas não receberam suplemento nitrogenado, ao passo que no outro a solução nutritiva foi acrescida de 5 mM NH_4NO_3. De modo geral, a adição de nitrogênio influenciou negativamente na expressão fenotípica de genes de resistência e de nodulação. Na ausência de nitrogênio, por exemplo, o número de regiões genômicas significativamente associadas à resistência a *Xanthomonas* foi reduzido de 5 para 3 quando da adição de nitrogênio. A porcentagem da variação fenotípica explicada pelas associações entre marcadores e QRLs (valor R^2) também foi reduzida de 42% para 26%, indicando que o efeito do N sobre os QRLs não foi apenas qualitativo, mas também quantitativo. A mesma situação também ocorreu no caso de genes de nodulação. Tanto o número de genes detectados sob o regime de adubação nitrogenada como a contribuição fenotípica dos mesmos foram menores, confirmando o efeito deletério deste elemento na nodulação e corroborando o fato de que os níveis de abubação nitrogenada recomendados para variedades comerciais de feijoeiro afetam negativamente a fixação simbiótica deste elemento. Por outro lado, o trabalho revelou que alguns QRLs e genes de nodulação foram detectados em ambos os regimes nutricionais. Estes genes, pouco influenciados pelos níveis de N, podem ser então utilizados para desenvolver cultivares insensíveis a N e que, portanto, se beneficiem tanto do N fixado biologicamente como do N fornecido através da adubação.

3.2 QRLs x estádio fenológico

A expressão de genes de resistência também pode se dar de maneira diferenciada ao longo da vida da planta, e termos tais como "resistência de plântula", "resistência de planta adulta" e "resistência de campo" refletem este fenômeno (Singh, 1986). Em muitos casos, é importante determinar se genes de resistência expressos na fase jovem também o são na fase adulta pois que, em casos afirmativos, plantas resistentes podem ser selecionadas precocemente. Este é o caso de genes de resistência de repolho a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Os QRLs que controlam resistência de plantas adultas a este patógeno também controlam resistência na fase de *seedling* independente do método de inoculação, seja este feito artificialmente ou por infecção natural (Camargo *et al.*, 1995). É interessante ressaltar que a contribuição fenotípica dos QRLs detectados neste trabalho variou significativamente com o método de avaliação da resistência. A associação entre marcadores e o QRL localizado no grupo de ligação 9 explicou 43% da variação fenotípica em resistência no ensaio de campo, em oposição a 20% no ensaio de casa de vegetação, ao passo que o QRL do grupo de ligação 1 se portou de maneira oposta, contribuindo com 19,5% no campo e 35% em casa de vegetação. Os autores creditam este fato à possibilidade de um destes genes (o do grupo de ligação 9) atuar especificamente no hidatódio e regiões adjacentes, daí sua maior expressão sob condições de campo onde estes tecidos não foram injuriados, ao contrário do ensaio em casa de vegetação no qual a inoculação deu-se através de ferimento no limbo foliar. Finalmente, dois QRLs de menor contribuição fenotípica foram detectados no ensaio de casa de vegetação mas não no de campo.

Segundo os autores, estes QRLs ou podem ser expressos somente no estádio juvenil ou não foram detectados em campo devido: a) a um maior erro experimental, que faz com que QRLs de pequenos efeitos não sejam detectados; b) a um menor poder discriminatório do método de avaliação de sintomas usado ou c) a uma expressão diferencial dos QRLs em função do método de inoculação adotado, como discutido acima. Todas as hipóteses são possíveis e talvez até ocorram simultaneamente. Danesh *et al.* (1994), por exemplo, verificaram a última hipótese no patossistema tomateiro x *Ralstonia solanacearum*, onde certo QRL só foi detectado quando as plantas foram inoculadas por meio de injeção no caule e não quando as raízes foram imersas em solução de inóculo.

3.3 QRLs x QRLs

Se analisarmos todos os trabalhos de mapeamento de características quantitativas, veremos que a ação coletiva dos genes identificados explica apenas parte da variação fenotípica existente entre os pais. A parte não explicada geralmente é atribuída ao erro experimental ou a insaturação do genoma com marcadores. Existe, no entanto, outra causa de variação, a epistase, que é pouco estudada e que certamente responde por uma parcela da variação fenotípica.

A detecção de epistase é difícil na prática pois requer experimentos com número elevado de indivíduos. Normalmente, testes de epistasia são feitos entre pares de QRLs empregando uma análise de variância bi-fatorial onde os fatores principais são os locos marcadores. O termo da análise de variância referente à interação entre locos testa os efeitos epistáticos. Se significativo, indica que o efeito combinado dos genes ligados aos marcadores sob análise não é aquele esperado da simples adição de seus efeitos calculados separadamente. No caso de marcadores co-dominantes, como cada fator terá três níveis, então teremos 9 classes genotípicas a serem testadas em uma população F_2. Se a população sob estudo for pequena, então pode não haver indivíduos em número suficiente dentro de cada classe, especialmente nas classes de menor freqüência (dupla homozigotas), inviabilizando o teste de epistase. Fica fácil ver que testes envolvendo mais de dois locos simultaneamente exigem um número muito elevado de indivíduos e, por isto, não são realizados na prática. No caso de um teste tri-fatorial em uma população F_2, por exemplo, existem 27 possíveis genótipos, sendo que os mais raros ocorrem a uma freqüência de 1/64. Um outro problema é que o número de interações a serem testadas é muito elevado, fazendo com que a probabilidade de que um erro do tipo I seja cometido aumente. Se **m** marcadores forem considerados, por exemplo, então haverão m!2(m-2) possíveis interações bi-fatoriais. Uma saída é utilizar níveis de significância mais rigorosos, mas isto aumenta a probabilidade de não detectarmos efeitos epistáticos reais, um problema ainda mais saliente quando se trata de populações pequenas (Tanksley, 1993).

Tanksley (1993) argumenta que nos trabalhos de mapeamento, embora em alguns casos a existência de epistase seja corroborada por elevados níveis de significância estatística e que estes podem ser de fato interações intergênicas, na maioria dos casos a significância dos testes fica próxima ao limite probabilístico, sugerindo que se tratam de artefatos estatísticos. Com base nisto, o autor sugere que fortes interações epistáticas entre poligenes podem ser exceção na natureza. No entanto, levando em consideração

as limitações experimentais e estatísticas, esta conclusão parece ser prematura. De fato, Lark *et al.* (1995) utilizaram uma população de linhagens recombinantes de soja composta por 224 linhagens e demonstraram exatamente o oposto para genes que controlam altura, produção e maturidade. O interessante neste trabalho é que muitas interações epistáticas foram encontradas entre estes locos e locos não associados diretamente às características avaliadas. Outro exemplo é a resistência a *Phytophthora capsici* em pimentão, que é do tipo quantitativa mas provavelmente governada por poucos genes.Tentativas de transferir estes genes por meio de retrocruzamento normalmente não conseguem recuperar o nível de resistência da linhagem parental doadora (Palloix *et al.*, 1990; R. Kobori, comunicação pessoal). Lefebvre & Palloix (1996) creditam este fato à existência de epistase entre QRLs. Ao analisarem 94 linhagens dihaplóides e 119 locos marcadores, os autores encontraram efeitos epistáticos que chegaram a explicar 62% da variância fenotípica, um valor extremamente elevado. Além do mais, foram encontrados efeitos epistáticos benéficos tanto entre alelos da mesma linhagem parental como entre alelos das duas linhagens parentais. Estes resultados ilustram a influência do *background* genético da linhagem recorrente. A quebra de combinações epistáticas favoráveis pode explicar a dificuldade de obter material com bom nível de resistência em programas de retrocruzamento. Por outro lado, o mapeamento de QRLs abre a interessante perspectiva de explorar comercialmente estes efeitos. Linhagens parentais podem ser engenhadas com auxílio dos marcadores ligados aos QRLs epistáticos de modo que o híbrido mantenha as combinações alélicas favoráveis.

3.4 QRLs VERTICAIS E HORIZONTAIS

Uma característica de resistência monogênica é que estes genes podem interagir com genes do patógeno, um fenômeno conhecido como resistência vertical. Quando não há interação, diz-se que a resistência é horizontal (Vanderplank, 1963). É importante determinar se a resistência é vertical ou horizontal, pois vários estudos mostram que resistências verticais são menos duráveis pois são passíveis de serem vencidas dentro da capacidade microevolutiva do patógeno (Camargo & Bergamin Filho, 1995). Se a distinção entre estes dois tipos de resistência é uma tarefa simples quando se trata de resistência monogênica, o que dizer das resistências poligênicas? Neste caso, a distinção não é tão simples com base única e exclusivamente em observações fenotípicas, uma vez que este é o resultado da segregação de vários genes de resistência que, em tese, pode ser uma mistura de verticais e horizontais. Seria verdade esta tese ou será que resistências quantitativas são conferidas somente por genes horizontais? Este é mais um assunto que pode ser abordado de maneira eficiente com marcadores moleculares. Leonards-Schippers *et al.* (1994), por exemplo, demonstraram que a resistência horizontal de duas variedades de batata era devido ao fenótipo cumulativo resultante de uma mistura de um número pequeno de QRLs horizontais e outros verticais. Por outro lado, Boscariol *et al.* (1998) demonstraram que os QRLs que controlam resistência do feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) são essencialmente os mesmos que controlam resistência a *X. a.* pv. *phaseoli* variante *fuscans* (Xapf), indicando que, neste caso, a seleção de genótipos resistentes para um patógeno resultará em genótipos resistentes para o outro. Segundo

os autores, esta resistência não-específica é interessante haja vista que estes dois patógenos apresentam um elevado grau de divergência genética. A conclusão é de que ou os QRLs reconhecem diferentes genes de patogenicidade presentes em Xap e Xapf, ou estes apresentam os mesmos genes de patogenicidade, que então foram conservados ao longo de seus históricos evolutivos. A primeira hipótese encontra subsídio nos resultados de Nodari *et al.* (1993), Boscariol *et al.* (1998) e Souza *et al.* (2000), que demonstraram a existência de uma região genômica no grupo de ligação 7 associada tanto a resistência a Xap e Xapf como também a *Rhizobium*, indicando a interessante possibilidade de existência de genes de resistência cujo espectro de atuação transcenda os limites da espécie biológica, um típico caso de pleiotropia. Embora esta explicação seja plausível, ela esbarra numa limitação do mapeamento genético por marcadores moleculares: um QRL não define um gene, e sim uma região genômica mais abrangente, onde podem estar presentes mais de um gene. Assim, no caso em questão, uma hipótese alternativa ao da pleiotropia seria o de ligação de dois genes de resistência distintos, um controlando resistência a *Xanthomonas* e outro a *Rhizobium*. A distinção entre estas duas hipóteses no caso do melhoramento do feijoeiro tem importância prática pois, prevalecendo a hipótese de pleiotropia, então genótipos selecionados para resistência a *Xanthomonas* também seriam resistentes para *Rhizobium*, o que obviamente é uma característica indesejável.

3.5 RESISTÊNCIA POLIGÊNICA?

Um dos livros texto mais utilizados em Fitopatologia (Agrios, 1997) define resistência poligênica como aquela "controlada por muitos genes (provavelmente dezenas ou até centenas)". Na verdade, esta definição, amplamente disseminada, é uma conjetura emprestada da genética quantitativa clássica que serve de base para o desenvolvimento de seus modelos teóricos. Ao contrário, a maioria dos trabalhos não relata mais que uma dezena de genes em determinado patossistema, o que vai de encontro ao conceito corrente de resistência poligênica. Quais as bases de tal discrepância? Uma das explicações é de que estas estimativas de números de genes são estimativas mínimas do verdadeiro número de genes que afetam determinada característica por, no mínimo, três razões (Dear, 1997; Falconer & Mackay, 1997): a) os experimentos não fornecem poder estatístico para separar o efeito de locos proximamente ligados em razão de usarem números limitados de progênies e/ou marcadores, b) pelas mesmas limitações experimentais, os testes estatísticos podem não detectar QTLs de pequenos efeitos fenotípicos e c) em um dado experimento, os QTLs detectados são somente aqueles que estão segregando na progênie. Não obstante estas limitações, sempre devemos lembrar que a idéia tradicional de característica poligência controlada por centenas de genes igualmente se baseia em dados experimentais e técnicas estatísticas também sujeitas a limitações, suposições e interpretações. Assim, hoje ainda não temos elementos para resolver definitivamente esta discrepância (Paterson, 1995).

3.6 GENOTIPAGEM SELETIVA

O método tradicional de mapeamento de QRLs envolve a genotipagem por marcadores de um maior número possível de indivíduos de uma população segregante. O número de indivíduos genotipados, no entanto, representa uma das grandes

limitações do mapeamento por marcadores moleculares, uma vez que a genotipagem é custosa e laboriosa não obstante os significativos avanços verificados no desenvolvimento de novos marcadores e equipamentos. A estratégia da genotipagem seletiva pode ser utilizada para identificar locos marcadores ligados aos genes de resistência sem a necessidade de genotipar um grande número de indivíduos. Segundo este método, somente indivíduos que apresentam características fenotípicas extremas são genotipados com os marcadores. De acordo com Lander & Botstein (1989), estes indivíduos são os mais informativos para a análise de ligação gênica, uma vez que seus genótipos podem ser inferidos com maior precisão a partir de seus fenótipos. A genotipagem seletiva, no entanto, apresenta algumas limitações e a primeira delas é que os efeitos dos QRLs assim mapeados são superestimados, uma vez que somente indivíduos extremos são considerados (Weller & Wyller, 1992). Uma segunda limitação é que QRLs de pequenos efeitos podem não ser detectados (Wang & Paterson, 1994).

A genotipagem seletiva pode ser combinada com a análise de agrupamentos segregantes, discutida acima, para reduzir ainda mais o número de genotipagens, mas existem poucos relatos da aplicação destas técnicas combinadas no mapeamento de QRLs. Chagué *et al.* (1997) localizaram um loco de resistência quantitativa ao vírus TYLCV em tomateiro. Os *bulks* R e S foram genotipados com mais de 600 *primers* e quatro fragmentos detectaram um QRL de médio efeito fenotípico (R^2=27,7%). O fato de apenas parte da variação fenotípica ter sido explicada pela associação marcador-gene de resistência pode significar, entre outras coisas, que a técnica de *bulk* pode não ser apropriada para detectar QRLs de menor efeito fenotípico, como já alertara Wang & Paterson (1994). Miklas *et al.* (1996) demonstraram isto em seu trabalho de mapeamento de QRLs ao vírus do mosaico dourado e a *Xanthomonas* em feijoeiro. Usando RAPDs, os autores compararam a eficiência da genotipagem seletiva combinada a análise de *bulks* com a estratégia tradicional de genotipagem de todos os indivíduos da população. Somente dois QRLs, de um total de nove, não foram detectados pela primeira estratégia. Estes QRLs, além de terem exercido menor efeito fenotípico, não foram detectados sob todas as condições experimentais testadas. Segundo os autores, esta pode ser a causa de sua não detecção por meio de *bulks*, uma vez que estes foram compostos com base nos resultados de todos os experimentos tomados em conjunto. Interessante é que somente três ou quatro plantas pertencentes aos extremos da distribuição fenotípica foram utilizadas para a composição dos *bulks* e o número de linhagens recombinantes utilizadas no ensaio, 79, também não foi muito elevado.

3.7 EFEITO GÊNICO CRÍPTICO

Em progênies segregantes F_2 resultantes do cruzamento entre duas linhagens, é comum observarmos genótipos superiores ou inferiores aos pais. Uma das causas desta segregação transgressiva é a de que as linhagens parentais possuem, em alguns locos, alelos cujo efeito fenotípico é contrário àquele esperado com base no fenótipo da linhagem. Em outras palavras, é comum encontrar alelos de resistência em material suscetível e alelos de suscetibilidade em material resistente. O efeito fenotípico destes alelos é mascarado pela presença de alelos em outros locos que agem em sentido

contrário. O termo "efeito críptico" foi emprestado de Thoday (1961), que o cunhou em um contexto um pouco diferente referindo-se à variância não aparente entre dois cromossomos homólogos resultante da ligação em repulsão de genes favoráveis. Assim, o fenótipo final do material será o resultado da ação combinada de todos os alelos. Se, por exemplo, houver uma preponderância de alelos de suscetibilidade nos vários locos que controlam resistência, então o fenótipo final será de suscetibilidade. A segregação destes locos pode então dar origem a indivíduos transgressivos e inúmeros trabalhos de mapeamento de QRLs confirmam esta hipótese. Camargo *et al.* (1995) observaram famílias F_3 com valores fenotípicos de resistência a *Xanthomonas* em *Brassica* de 1,5 a 2 vezes superiores ou inferiores aos pais, sugerindo a ocorrência de transgressão. Em um QRL, situado no grupo de ligação 2, alelos da linhagem parental resistente Badger Inbred-16 contribuíram para maior suscetibilidade ao patógeno. Análises dos genótipos marcadores das progênies transgressivas neste QRL indicaram que as quatro progênies mais suscetíveis eram ou homozigotas para alelos marcadores de BI-16 (um caso) ou heterozigotas e que as quatro mais resistentes eram ou homozigotas para alelos da linhagem parental suscetível OSU Cr-7 (três casos) ou heterozigotas, confirmando que, neste caso, a transgressão foi devido a combinação de alelos complementares das linhagens parentais. Este efeito complementar de QRLs é especialmente comum em cruzamentos interespecíficos e abre a perspectiva de que sejam obtidos genótipos com características fenotípicas superiores às espécies parentais.

4. PERSPECTIVAS

A aplicação mais direta dos marcadores moleculares em melhoramento tem sido em programas de retrocruzamento. No retrocruzamento, a porção do genoma do parental doador é reduzida pela metade a cada ciclo na ausência de ligação e há duas maneiras pelas quais marcadores podem ser úteis neste processo. A primeira seria a de ajudar na seleção de indivíduos que possuem o gene desejado, dispensando a necessidade de inoculações com o patógeno e possibilitando seleção precoce, e a segunda seria selecionar, dentre estes, aqueles que possuem a maior porção do genoma da linhagem parental recorrente, na tentativa de apressar a recomposição de seu genoma (Young & Tanksley, 1989). Um exemplo bem sucedido desta abordagem foi a transferência concomitante de dois locos de resistência a ferrugem em cevada descrito por Toojinda *et al.* (1998).

Em sua palestra durante a oitava Conferência de Genomas de Plantas e Animais, o Dr. Charles Stuber, ao fazer uma retrospectiva do uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento foi enfático ao afirmar que, embora existam exemplos práticos de seleção assistida por marcadores, o impacto da técnica de mapeamento de locos quantitativos por meio de marcadores moleculares no desenvolvimento de novas variedades foi menor do que muitos esperavam a 20 anos atrás (Stuber, 2000). Como dito no começo, o impacto maior dos marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças, até então, tem se verificado na fase de pré-melhoramento, como foi visto nos vários exemplos discutidos até agora. Segundo Dr. Stuber, a principal causa deste baixo impacto da metodologia estão nas limitações estatísticas que não permitem localizar os poligenes com a precisão necessária para um programa de melhoramento.

Liu (1998) lista as seguintes limitações de ordem estatística:

a) QRLs são genes hipotéticos baseados em inferências estatísticas e os efeitos genéticos usados para mapeá-los podem ter muito pouco significado biológico.
b) Os modelos genéticos nos quais o mapeamento de poligenes se baseia não são acurados.
c) A quantidade de informação genética presente nos experimentos não é adequada estatisticamente.
d) As metodologias de análise estatística não são poderosas o suficiente e nem são adequadas para análises que envolvam um alto nível de interações epistáticas.

Como os testes estatísticos se baseiam no número de recombinantes entre marcador e poligene e na variância genética da característica em questão, então vários destes problemas poderiam ser amenizados se um número maior de indivíduos pudesse ser analisado. Além disto, também deve ser lembrado que a eficiente detecção de recombinantes também exige a disponibilidade de marcadores polimórficos. O alto custo da genotipagem de indivíduos com marcadores, associado a necessidade de gerar mapas com alto poder de resolução representam dois obstáculos de ordem prática a serem somados aos problemas estatísticos apresentados acima.

Se por um lado as limitações aqui discutidas realmente constituem empecilho para programas de seleção assistida por marcadores, por outro há que ser levado em conta que novas técnicas vêm sendo desenvolvidas no sentido de atenuá-las, o que nos abre a perspectiva de um futuro mais promissor da aplicação dos marcadores diretamente na seleção. Se considerarmos a área de marcadores, por exemplo, muito progresso foi realizado neste campo. Há dez anos atrás só havia um marcador disponível, o RFLP, que por sinal é o mais custoso e trabalhoso dos atualmente disponíveis. Hoje contamos com marcadores baseados na reação de PCR como microssatélites e AFLPs. Por serem mais baratos e rápidos, permitem que um maior número de locos marcadores seja avaliado. Embora haja um custo associado ao desenvolvimento dos microssatélites, para algumas culturas (milho e trigo, por exemplo) eles já existem em abundância. O uso de AFLPs também está se tornando mais comum devido a seu alto poder de detecção de polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A combinação destes marcadores pode gerar mapas genéticos razoavelmente saturados em um curto espaço de tempo. Avanços no campo da robótica e informática, por sua vez, têm possibilitado a genotipagem de centenas de indivíduos concomitantemente. Já no campo da estatística, métodos mais sofisticados de análises também vêm sendo desenvolvidos, tal como o método de mapeamento composto de intervalos (*composite interval mapping* - Zeng, 1993; 1994), uma variante das análises de mapeamento por intervalos que combina estas com regressão linear múltipla e que oferece maior resolução na detecção de poligenes. O *software* que emprega esta solução, denominado *QTL Cartographer* (Basten & Zeng, 1995), vem sendo cada vez mais utilizado em detrimento do tradicional *MapMaker QTL* de Lander & Boltstein (1989).

Avanços espetaculares na área de sequenciamento genômico também têm contribuído significativamente na área de mapeamento de poligenes, principalmente na tarefa de identificar "marcadores candidatos" que apresentam uma maior probabilidade de estarem ligados a poligenes devido ao fato de serem homólogos a genes de resistência e por estes geralmente ocorrerem de forma agrupada no genoma. Projetos de sequenciamento de ESTs (*expressed sequenced tags*), tal como o projeto brasileiro SUCEST de cana-de-açúcar (*http://sucest.lbi.dcc.unicamp.br*), são uma ótima fonte de "marcadores candidatos". Marcadores candidatos também podem ser desenvolvidos no laboratório por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos homólogos a regiões conservadas de genes de resistência (Kanazin *et al.* ,1996 ; Yu *et al.* 1996).

Finalmente, outra classe de marcadores candidatos são aqueles genes de defesa vegetal, tal como proteínas relacionadas a patogenicidade (*pr-proteins*), peroxidases, glucanases e quitinases. Estes genes codificam produtos que estão diretamente implicados na defesa da planta ou podem estar relacionados na biossíntese de compostos de defesa tais como as fitoalexinas. Embora vários já tenham sido clonados, a contribuição destes para a resistência, bem como sua localização genômica, ainda permanecem desconhecidas. Segundo Faris *et al.* (1999), este genes provavelmente são regulados por um ou mais sistemas transdutores de sinais, enquanto outros têm expressão constitutiva ou induzida pelo ataque de patógenos. Assim, é possível que muitos destes genes sejam responsáveis pelos efeitos de alguns QRLs. De fato, ao utilizarem vários destes genes como marcadores para mapear QRLs em trigo, muitos, incluindo oxalato oxidase, peroxidase, superóxido dismutase, quitinase e thaumatina, revelaram-se ligados a QRLs. Outro exemplo bem sucedido de aplicação da estratégia de genes candidatos é o trabalho de Byrne *et al.* (1996), onde foram usados genes envolvidos na síntese de flavona para mapear genes de resistência a lagarta da espiga em milho. A ligação entre QRLs e quatro genes candidatos, entre eles o gene *pl*, que codifica uma proteína reguladora de transcrição, explicou mais de 75% da variação fenotípica em resistência a esta praga.

Os trabalhos de Byrne *et al.* (1996) e Faris *et al.* (1999) são muito importantes pois constituem exemplos de mapeamento de poligenes que fazem uso do conhecimento prévio de vias metabólicas, gerado por trabalhos na área de biologia molecular, para estabelecer um modelo poligênico. Esta nova abordagem, denominada de "Modelo Metabólico Genético" (Liu , 1998), é a mais racional pois o modelo é construído não apenas com base em associações estatísticas entre fenótipo e marcadores moleculares, como é a abordagem tradicional de mapeamento, mas também em relações biológicas pré-determinadas entre marcadores e característica fenotípica. Ainda segundo o autor, a complexa relação biológica que porventura possa existir entre os poligenes pode ser determinada por experimentos bioquímicos. Desta forma, os modelos genéticos obtidos estatisticamente podem ser validados pelos modelos metabólicos e vice-versa, ou seja, os modelos genéticos podem contribuir para encontrar mais componentes da cadeia metabólica. De um modo geral, espera-se que modelos metabólicos genéticos devam contribuir ainda mais para o conhecimento das bases biológicas das características métricas, conhecimento este que deverá ser empregado para elaborar melhores estratégias de melhoramento (McMullen *et al.*, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTOLILA, S.; GUITTON, C.; BOUVET, N.; SAILAND, A.; NYKAZA, S.; FREYSSINET, G. Identification of RFLP marker tightly linked to the Htl gene in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.393-398, 1991.

BOSCARIOL, R.L.; SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de regiões genômicas associadas a resistência a dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.132-138, 1998.

BUBECK, D.M.; GOODMAN, M.M.; BEAVIS, W.D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, v.33, p.838-847, 1993.

BYRNE, P.F.; MCMULLEN, M.D.; SNOOK, M.E.; MUSKET, T.A.; THEURI, J.M. WIDSTRON, N.W.; WISEMAN, B.R.; COE, E.H. Quantitative trait loci and methabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.8820-8825, 1996.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle Genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. 919p.

CAMARGO, L.E.A.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. **Phytopathology**, v.85, p.1296-1300, 1995.

CHAGUÉ, V.; MERCIER, J.C.; GUÉNARD, M.; COURCEL, A.; VEDEL, F. Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.671-677, 1997

DANESH, D.; AARONS, S.; McGILL, G.E., YOUNG N.D. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. **Molecular Plant-Microbe interactions**, v.7, p.464-471, 1994.

DEAR, P.H. **Genome mapping**: a practical approach. Oxford: University Press, 1997. 371p.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Essex: Longman, 1997. 464p.

FARIS, J.D.; LI, W.L.; LIU, D.J.; CHEN, P.D. GILL, B.S. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.219-225, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; BYRUM, J. ; KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.505-512, 1993.

KANAZIN, V.; MAREK, L.F.; SCHOEMAKER, R.C.; Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.11746-11750, 1996.

KERNS, M.R.; DUDLEY, J.W.; RUFENER, G.K. QTL for resistance to common rust and smut in maize. **Maydica**, v.44, p.37-45, 1999.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.

LARK, K.G.; CHASE, K.C.; ADLER, F.; MANSUR, L.M.; ORF, J.H. Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.4656-4660, 1995.

LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper – *Phytophthora capsici* Leonian. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.503-511, 1996.

LEONARDS-SCHIPPERS, C.; GIEFFERS, W.; SCHAÜFFER-PREGL, R.; RITTER, E.; KNAPP, S.J. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study of QTL mapping in an allogamous plant species. **Genetics**, v.137, p.67-77, 1994.

LIU, B.H. QTL mapping: future considerations. In: LIU, B.H. (Ed.) **Statistical genomics**. New York: CRC Press, 1998. 611p.

MA, Y. Near-isogenic line revisited by DNA markers in maize. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.32, p.179-186, 1991

MCMULLEN, M.D.; BYRNE, P.F.; SNOOK, M.E.; WISEMAN, B.R.; LEE, E.A.; WIDSTROM, N.W.; COE, E.H. Quantitative trait loci and metabolic pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.1996-2000, 1996.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.9828-9832, 1991.

MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V.; BEAVER, J.S.; MONTOYA, C.; ZAPATA, M. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, v.36, p.1344-1351, 1996.

MUEHLBAUER, G.L.; SPECHT, J.E.; THOMAS-COMPTON, M.A.; STASWICK, P.E.; BERNARD, R.L. Near-isogenic lines: a potential resource in the integration of conventional and molecular marker linkage maps. **Crop Science**, v.28, p.729-735, 1988.

NODARI, R.O., TSAI, S.M., GUSMÁN, P., GILBERTSON, R.L. and GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean: III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, v.134, p.341-350, 1993.

OGLIARI, J.B. Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, através do uso de marcadores moleculares microssatálites. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 115p. Tese, Doutorado.

PALLOIX, A.; DAUBÈZE, A-M.; PHALY, T.; POCHARD, E. Breeding transgressive lines of pepper for resistance to *Phytophthora capsici* in a recurrent selection system. **Euphytica**, v.51, p.141-150, 1990.

PATERSON, A.H. Molecular Dissection of quantitative traits: progress and prospects. **Genome Research**, v.5, p.321-333, 1995.

SIMCOX, K.D.; BENNETZEN, J.L. The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize. **Phytopathology**, v.83, p.1326-1330, 1993.

SINGH, D.P. **Breeding for resistance to diseases and insect pests**. New York: Springer Verlag, 1986. cap.2, p.2-25.

SOUZA, A.A.; BOSCARIOL, R.; MOON, D.H.; CAMARGO, L.E.A.; TSAI, S.M. Effects of QTLs of *Phaseolus vulgaris* controlling host-baceria interactions under two levels of nitrogen fertilization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p.155-161, 2000.

STUBER, C. Some perspectives on using molecular markers for enhancing plant breeding. In: PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 8., San Diego, 2000. **Resumos**. San Diego, 2000. p.46.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.

THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, v.191, p.368-340, 1961.

TOOJINDA, T.; BAIRD, E.; BOOTH, A.; BROERS, L.; HAYES, P.; POWELL, W.; THOMAS, W.; VIVAR, H.; YOUNG, G. Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.123-131, 1998.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases**: epidemics and control. New York: Academic Press, 1963. 349p.

WANG, G.L.; PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling startegies for mapping QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.355-361, 1994.

WELLER, J.I.; WYLER, A. Power of different sampling strategies to detect quantitative trait loci variance effects. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.582-588, 1992.

YOUNG, N.D.; TANSKLEY, S.D. RFLP analysis of the size of chromossomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.353-359, 1989.

YU, Y.G.; BUSS, G.R.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.11751-11756, 1996.

ZENG, Z.B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p.10972-10976, 1993.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1466, 1994.

32

PLANTAS TRANSGÊNICAS NO MELHORAMENTO

MARCIO CASTRO SILVA-FILHO[1]
MARIA CRISTINA FALCO[2]

[1]Depto. de Genética, USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13400-970 - Piracicaba, SP.
[2]Pós-Doutoranda do Depto. de Genética - USP/ESALQ.

1. O SIGNIFICADO DA TRANSFERÊNCIA DE GENES PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS

As pesquisas agrícolas e o desenvolvimento tecnológico são e continuarão a ser requisitos básicos para aumento da produtividade agrícola e a melhoria da qualidade dos alimentos. Existem várias maneiras de aumentar a produtividade de forma sustentável, incluindo o uso de insumos químicos como fertilizantes e defensivos, adubos orgânicos, controle integrado de pragas, conservação dos recursos naturais e uso de variedades melhoradas, produzidas pelos métodos tradicionais ou por técnicas biotecnológicas (Herrera-Estrella, 1999). Dentre estas, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de plantas transgênicas, é provavelmente a mais promissora para aumentar a produção agrícola e principalmente, para a obtenção de uma agricultura mais limpa e com alimentos de melhor qualidade, desde que apropriadamente integrada a um programa de melhoramento.

Basicamente, a primeira geração de plantas transgênicas está relacionada à melhoria de características agronômicas, ou seja, resistência a insetos e doenças e tolerância a herbicidas (*input traits*). A capacidade de variedades de plantas transgênicas aumentar produtividade e reduzir custos de produção, tem sido demonstrada nos casos de plantas resistentes a vírus, insetos, herbicidas, em que a taxa de aumento na produção é da ordem de 5% a 10%, e alguns herbicidas, até 40% (Herrera-Estrella, 1999). Uma nova geração de plantas transgênicas começa a despontar no mercado, resultado das pesquisas e do seqüenciamento de genes de espécies de interesse agronômico: os projetos Genoma. O seqüenciamento dos genes e o estudo de suas funções permitem a manipulação de processos metabólicos visando a obtenção de alimentos de melhor qualidade (*output traits*). Dentre os produtos em desenvolvimento, convém ressaltar a melhoria da qualidade de diferentes óleos, e também a alteração da composição dos nutrientes, particularmente sobre níveis de proteína, aminoácidos essenciais e outros micronutrientes (Kishore & Shewmaker, 1999; Facciotti *et al.*, 1999). Finalmente, a terceira geração de plantas transgênicas, com previsão para entrar no mercado em meados da próxima década, tem por objetivo a produção de produtos de interesse industrial (plástico biodegradável, lubrificantes industriais, matéria-prima para detergentes, enzimas de interesse industrial etc.) ou farmacêutico (vacinas, hormônios, anticorpos, fatores de coagulação, entre outros), ou seja, uso das plantas como biorreatores.

A transferência de segmentos de DNA exógeno para um organismo completo é um importante aspecto da engenharia genética, uma vez que não está restrita a indivíduos sexualmente compatíveis. Características podem ser transferidas entre plantas, animais, bactérias e fungos, sem contudo produzir novos organismos. O objetivo principal é que os genes, com propriedades específicas sejam simplesmente introduzidos em um organismo, sem alterar suas demais características.

A população humana literalmente dobrou nos últimos 40 anos e aumentou 6 vezes nos últimos 200 anos. Desde o início do século XX a agricultura tem-se

intensificado, primeiro com a descoberta de processos químicos de produção de fertilizantes, depois com o uso de materiais genéticos melhorados e uso de defensivos químicos. Assim, a produção global de cereais praticamente dobrou entre 1960 e 1990 (Kishore & Shewmaker, 1999). A demanda por produtos resultantes do melhoramento de plantas tem crescido dia a dia, aumentando a necessidade de novos métodos de melhoramento, seja para introduzir genes de resistência, seja para melhorar caracteres de produção ou qualidade. Nos métodos convencionais, para que ocorra a transferência de características desejáveis, o material genético de duas plantas é combinado via cruzamento, e misturado em um híbrido. Os descendentes são então repetidamente retrocruzados com um dos parentais, por um período de vários anos e submetidos a um processo de seleção até que uma planta com as características desejadas seja obtida. Técnicas de cultura de células e tecidos podem transpor estas barreiras, mas de forma limitada.

A transferência de genes entre espécies não relacionadas trouxe uma nova dimensão ao melhoramento de plantas. Genes podem ser introduzidos em uma planta, de forma precisa, sem alterar suas características positivas existentes. Teoricamente, genes de várias fontes (fungos, bactérias, animais, plantas) podem ser construídos de tal forma, que após sua transferência tornam-se ativos em um organismo, ou especificamente a um tecido, ou mesmo expressos num determinado período do desenvolvimento da planta. Tudo isso tornou-se possível em função do conhecimento das bases moleculares e dos mecanismos bioquímicos que regulam as características de importância agronômica. Com o recente desenvolvimento de vários sistemas de transformação e regeneração de plantas, o fator limitante para o uso da engenharia genética no melhoramento está no reduzido número de genes isolados que regulam os caracteres desejados e, principalmente na sua disponibilidade, uma vez que os principais genes de interesse são patenteados. Assim, genes ou promotores de interesse podem ser considerados como *commodities*. Todavia, as técnicas de clonagem molecular de genes exploram as características inerentes ao gene: estrutura ou função, localização no cromossomo e padrão de expressão gênica (Delú-Filho *et al.*, 1999).

As principais técnicas de engenharia genética, particularmente aquelas relacionadas à transferência de genes, atualmente fazem parte do conjunto de protocolos adotados por grandes e médias companhias de produção de sementes, juntamente com as técnicas de cultura de células e tecidos.

2. O CONCEITO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

A maioria das características estruturais das células requer um grande número de diferentes proteínas para sua expressão. Para um gene transferido ser expresso em um organismo receptor, isto é, para que sua informação genética seja lida e traduzida em forma de proteína, ela deve ser regulada, ou seja, ligada e desligada novamente, conforme suas necessidades. A região do DNA envolvida na ativação de um gene é chamada de promotor. Promotores de plantas e bactérias não são intercambiáveis (devido às particularidades da transcrição entre procariontes e eucariontes), portanto, um gene transferido para planta deve ser precedido de um promotor de planta (Thomzik, 1996).

Durante o processo de transformação de plantas, é produzida uma mistura de células transformadas e não transformadas, sendo necessário resgatar e regenerar

em plantas o pequeno número de células transformadas. Para possibilitar esse processo seletivo, um gene de seleção é introduzido juntamente com o gene de interesse. Este gene de seleção codifica (contém informação) para síntese de uma enzima capaz de alterar um antibiótico ou um herbicida, de forma que suas propriedades tóxicas sejam atenuadas. Apenas as células transformadas, contendo o gene de seleção, são capazes de se desenvolver em plantas normais na presença do agente seletivo.

Também é possível introduzir um gene "repórter", além do gene de seleção, que pode, por exemplo, codificar para uma enzima que converte um substrato adicionado, em uma substância colorida. Isto permite detectar o gene transferido nas células receptoras em um estágio bastante inicial. Quando um gene exógeno é estavelmente incorporado ao genoma das células receptoras e é expresso e replicado, está caracterizada a transformação. Além disso, o gene inserido ou transgene deve segregar de forma mendeliana durante as gerações. Finalmente, as células transformadas são utilizadas para regenerar plantas transgênicas.

3. PRÉ-REQUISITOS PARA TRANSFERÊNCIA DE GENES

Antes do gene ser transferido, o gene deve ser isolado do organismo relevante. A localização de um gene particular e seu isolamento do material genético total (genoma) de um organismo, é uma tarefa extremamente laboriosa e requer um grande número de operações. Na verdade, um gene constitui-se de uma ínfima fração do genoma de um organismo. Para isolá-lo são necessários alguns procedimentos básicos: a construção de uma biblioteca genômica (genoteca) ou de cDNA e de uma sonda apropriada que se possa reconhecer o referido fragmento. Para isso é necessário utilizar a tecnologia do DNA recombinante e as propriedades físico-químicas do gene de interesse. Basicamente, a tecnologia do DNA recombinante fundamenta-se na utilização das enzimas de restrição e modificação, dos vetores de clonagem, e nas técnicas de transformação bacteriana e seleção das moléculas recombinantes. Resumindo, as enzimas de restrição (endonucleases) clivam a fita dupla do DNA em locais precisos (baseado na sua seqüência de nucleotídeos), isolando o gene de interesse. Como os vetores de clonagem (na maioria das vezes pequenas moléculas circulares de DNA) replicam-se independentemente do DNA cromossômico, a sua ligação com o fragmento de DNA contendo o gene de interesse (utilizando a enzima T_4 DNA Ligase) e a subseqüente introdução do DNA recombinante em células hospedeiras (geralmente *E. coli*), permitem a amplificação ou clonagem do DNA de interesse. Assim, a clonagem molecular nada mais é do que induzir uma bactéria a replicar uma seqüência determinada de DNA, de tal modo que seja possível isolá-la posteriormente para manipulação (Thomzik, 1996).

Para o sucesso da transferência de genes em plantas, dois requisitos básicos são necessários. Primeiro, é necessário ter um protocolo estabelecido de regeneração de plantas *in vitro*. Esta etapa é essencial para o sucesso dos trabalhos. Segundo, um eficiente método de introdução do gene em células e sua capacidade de regenerar plantas férteis. Dois métodos básicos de transferência de genes podem ser descritos para plantas: transferência indireta de genes via uma agrobactéria (*Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*) e transferência direta utilizando meios químicos, físicos ou elétricos.

3.1 TRANSFERÊNCIA INDIRETA

Raças virulentas da bactéria de solo Gram-negativa, *Agrobacterium tumefaciens*, contêm não apenas o DNA cromossomal mas também uma molécula de DNA circular, conhecida como plasmídeo *Ti* -indutor de tumor (Van Larebeke *et al.*, 1974). O processo de transformação inicia-se com a liberação de compostos fenólicos (acetoseringonas) pelas plantas, após um ferimento. Estes compostos ativam uma série de genes bacterianos que irão culminar com a transferência de um fragmento de DNA do plasmídeo *Ti* para a célula vegetal (para uma revisão veja Sheng & Citovsky, 1996). Este fragmento de DNA é conhecido como T-DNA (DNA de transferência). A informação genética carregada pelo T-DNA é lida e traduzida pela célula vegetal, e, quando em dicotiledôneas, produz uma doença conhecida como "galha da coroa". Quando a infecção é causada pela bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, a doença é denominada "raiz em cabeleira" devido ao sintoma de excesso de raízes (Chilton *et al.*, 1982). Esta bactéria também é comumente utilizada na transformação genética de plantas, porém em menor escala quando comparada aos vetores derivados do plasmídeo *Ti* de *A. tumefaciens* (Tepfer, 1990). *A. tumefaciens* é um sistema natural de transferência de genes, que agora está sendo explorado para introduzir genes de interesse em células vegetais, via inserção no T-DNA do plasmídeo *Ti* (Hernalsteens *et al.*, 1980; Walden *et al.*, 1990). Entretanto, a manipulação do plasmídeo *Ti* é extremamente dificultada em função do seu tamanho (120 a 250 kb), além de apresentar o inconveniente de desenvolver tumor nas plantas transformadas. Assim, foram desenvolvidos novos vetores (plasmídeos binários) de menor tamanho a fim de permitir a sua manipulação. Primeiramente, foram retirados os genes presentes no T-DNA que promovem a tumorigênese, conservando-se apenas duas regiões de 25 pares de base localizadas nas extremidades (direita e esquerda) do T-DNA, responsáveis por sua transferência. Em seguida, outros genes envolvidos no processo e presentes no plasmídeo *Ti* (região de virulência) foram retirados do plasmídeo binário e incorporados num segundo plasmídeo (*helper*) de forma a garantir a presença de proteínas essenciais ao mecanismo (Brasileiro & Dusi, 1999). Muitas espécies vegetais de importância agronômica não são naturalmente infectadas por *Agrobacterium*, ou apresentam um reduzido nível de suscetibilidade (mais particularmente as monocotiledôneas). Assim, este método de transformação mostrou-se muito pouco eficaz para este grupo de plantas, levando a necessidade de se desenvolver outros métodos de transformação.

3.2 TRANSFERÊNCIA DIRETA DE GENES

A transferência direta de genes inclui métodos como a microinjeção, a eletroporação, tratamento químico com PEG (polietilenoglicol), microperfuração com a ajuda de um raio laser UV, e bombardeamento de partículas (biobalística ou biolística). Nesses métodos, em contraste com a transferência baseada na utilização do sistema *Agrobacterium*, o DNA exógeno é diretamente introduzido nas células receptoras. Para a maioria destes métodos, entretanto, a célula receptora deve ser protoplasto (célula destacada dos tecidos vegetais que teve suas paredes celulares completamente removidas pela ação de enzimas como celulases e pectoliases), com membrana celular fina o suficiente para facilitar a inserção do DNA exógeno. Em

muitas espécies de dicotiledôneas é possível regenerar plantas férteis a partir de protoplastos isolados *in vitro*; mas por outro lado, em monocotiledôneas, os resultados de sucesso têm sido reportados em apenas alguns casos isolados.

No método da microinjeção, o DNA a ser transferido é injetado em protoplastos ou diretamente no núcleo da célula, sob um microscópio, com a ajuda de um tubo capilar fino e um micromanipulador (Crossway *et al.*, 1986). No método a laser UV, poros são formados na parede celular ou membrana plasmática de células individuais, sob um microscópio, com a ajuda de um curto pulso de raio laser UV. Os poros são fechados após poucos segundos (< 5 segundos), e o DNA pode penetrar na célula (Weber *et al.*, 1990). No método de tratamento químico com PEG, o DNA é misturado a protoplastos isolados da planta receptora em uma solução salina ($MgCl_2$); o polietilenoglicol é então adicionado. Este tratamento químico ajuda o DNA a ser introduzido na célula por endocitose (Potrykus *et al.*, 1985; Negritiu *et al.*, 1987).

O terceiro método de transformação mais utilizado é o da eletroporação, onde protoplastos isolados da planta receptora são misturados com o DNA, como no tratamento químico, e são expostos a uma corrente de alta ou baixa voltagem, dependendo da célula, por um período específico. Momentaneamente são formados "poros" na membrana do protoplasto, por onde o DNA é transferido para a célula (Shillito *et al.*, 1985). Atualmente já se utiliza a eletroporação de células ou tecidos intactos, o que facilita a obtenção de plantas transformadas (Arencibia *et al.*, 1997).

No método de bombardeamento de partículas (Klein *et al.*, 1987; Christou *et al.*, 1988), o segundo mais utilizado, o DNA é aderido a micropartículas de ouro ou tungstênio, que são aceleradas com pólvora, descarga elétrica, ou gás e atiradas contra células isoladas, tecidos ou órgãos.

Tanto a transferência direta quanto a indireta com *Agrobacterium* possuem vantagens, desvantagens e limitações. Portanto, a escolha do método é um caso particular e depende da espécie vegetal e do tipo de tecido ou célula utilizada na transferência do gene.

4. PROBLEMAS NA TRANSFORMAÇÃO E REGENERAÇÃO DE PLANTAS SUPERIORES

Após a transferência do gene de interesse para a célula da planta receptora, esta deve regenerar uma planta fértil. Para a maioria das plantas de interesse agronômico, entretanto, este passo constitui-se em um dos principais entraves. Muitas vezes, dentro de uma mesma espécie vegetal, a regeneração é genótipo-dependente, o que dificulta a transformação de determinados genótipos de interesse. As monocotiledôneas em particular – e especialmente as gramíneas de importância comercial como o arroz, o trigo, o milho e a cana-de-açúcar – geralmente apresentam problemas para transformação ou regeneração de células. Uma das principais limitações é a ausência de um protocolo eficiente de cultura de tecidos para a variedade em questão. Nem sempre o protocolo desenvolvido para um genótipo pode ser adaptado para outra variedade de uma mesma espécie, dificultando o processo de obtenção de transformantes. Assume-se ainda que apenas uma pequena proporção de células, ou tipo celular é competente para receber o DNA exógeno e regenerar plantas (Potrykus, 1990). Outros fatores decisivos para o sucesso da transformação, além da idade do

A Genética a serviço da Agricultura



A MBG é uma empresa dedicada ao descobrimento de novos genes e ao melhoramento genético de plantas visando a geração de novos conhecimentos, tecnologias e produtos que possam contribuir com a agricultura.

MBG
MILENIA
BIOTECNOLOGIA E GENÉTICA

Rua: Pedro Antonio de Souza, 405 -
CEP 86031-610
Pq. Rui Barbosa
tel: (43) 371- 9090
Londrina - Pr

tecido, são o balanço hormonal endógeno e o antibiótico utilizado no processo seletivo. Na transferência indireta de genes, também é importante escolher a estirpe correta da bactéria, já que algumas estirpes provocam um estresse muito grande no material.

A transferência natural de genes por *Agrobacterium tumefaciens* ainda é o método mais eficiente e mais utilizado em dicotiledôneas. De acordo com a literatura, mais de 650 espécies de plantas foram transformadas com sucesso utilizando este método. Entretanto, um exame mais crítico destes trabalhos mostrou que, exceto para poucas solanáceas, não houve reprodução dos resultados por outros grupos de pesquisadores. O uso de *Agrobacterium* é restrito a forte dependência do genótipo. As monocotiledôneas, até então, estavam fora do espectro de hospedeiros de *Agrobacterium*, o que tornava este método inviável para a obtenção de plantas transgênicas deste grupo. Mais recentemente, com o desenvolvimento do plasmídeo super-binário, esta limitação foi superada incorporando várias monocotiledôneas de interesse como o milho (Gould *et al.*, 1991; Ishida *et al.*, 1996), o arroz (Christou *et al.*, 1991; Hiei *et al.*, 1994), o trigo (Vasil *et al.*, 1993) e a cana-de-açúcar (Enriquez-Obregon *et al.*, 1998) dentre as culturas transformadas pelo sistema. A transferência direta utilizando PEG ou eletroporação em protoplastos, tem transformado estavelmente e regenerado um número significativo de plantas férteis de espécies monocotiledôneas (Zhang *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1991). Entretanto, ambas as técnicas são restritas a espécies ou genótipos que possuam um eficiente protocolo de regeneração de plantas. A regeneração de protoplastos de monocotiledôneas é um trabalho árduo e está restrito a um pequeno número de espécies e genótipos e requer o estabelecimento de suspensões de células embriogênicas, das quais protoplastos possam ser isolados e regenerados em plantas.

O método de bombardeamento de micropartículas, também conhecido como biobalística, oferece grandes possibilidades na solução de problemas deste grupo de plantas. Este método também pode ser utilizado em tecidos, meristemas, embriões, órgãos, micrósporos etc. Desde que este método foi desenvolvido, intensivos esforços foram feitos objetivando transformar espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas. Embora o problema da especificidade de hospedeiro tenha sido resolvido com esta técnica, persiste a imprevisibilidade da freqüência de expressão transiente do gene e da transformação estável (Potrykus, 1990). Nos últimos anos, foi crescente o número de espécies monocotiledôneas estavelmente transformadas por este método, como exemplo: milho (Fromm *et al.*, 1990), arroz (Christou *et al.*, 1992), aveia (Sommers *et al.*, 1992), cana-de-açúcar (Bower & Birch, 1992), cevada (Wan & Lemaux, 1994) e trigo (Weeks *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994). O método da biobalística sem dúvidas, apresenta maior potencial para transformação das principais espécies de importância agronômica.

5. PLANTAS TRANSGÊNICAS E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE INTERESSE

A engenharia genética de plantas (chamada de *green genetic engineering*, para distinguir da *red genetic engineering*, de animais) surgiu há pouco mais de 15 anos, quando um fragmento de DNA bacteriano foi introduzido com sucesso via um vetor derivado do plasmídeo *Ti* de *A. tumefaciens* e expresso em uma célula vegetal *in vitro*

(Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Desde então, milhares de trabalhos foram reportados comprovando a eficiência e aplicabilidade da técnica. Atualmente, dezenas de milhões de hectares são cultivadas com plantas transgênicas nos cinco continentes, tornando-se uma realidade na agricultura mundial. Vale ressaltar que a área cultivada tem crescido de forma exponencial e, segundo especialistas, a principal onda de plantas transgênicas visando a qualidade dos alimentos, ainda está por vir.

Apesar de ser relativamente nova (as primeiras plantas transgênicas foram obtidas em 1983), a engenharia genética vegetal ainda necessita de investimentos e infra-estrutura consideráveis, tornando-a muitas vezes, de difícil acesso aos programas de melhoramento genético. Entretanto, sua aceitação e aplicabilidade têm disseminado esta tecnologia como uma das principais ferramentas nos projetos de pesquisa.

A seguir, serão discutidos alguns aspectos relacionados às principais características atualmente disponíveis no mercado.

5.1 TOLERÂNCIA A HERBICIDAS

A possibilidade de utilizar engenharia genética para ampliar a gama de herbicidas que podem ser utilizados em uma dada espécie comercial de planta foi uma das primeiras estratégias formuladas na engenharia genética vegetal (Pfister *et al.*, 1981; Glaser, 1983). Normalmente, a tolerância a herbicidas é uma característica governada por poucos genes (usualmente monogênica), o que facilita o desenvolvimento de variedades resistentes. Assim sendo, várias abordagens apareceram rapidamente devido aos consideráveis benefícios econômicos. Partindo do príncipio que herbicidas são essenciais para uma agricultura em larga escala e produtiva, e que uma única alternativa para controle químico traz desvantagens econômicas e ecológicas, a idéia de aumentar o número de alternativas de combate às plantas invasoras em uma cultura comercial é muito atrativa para o produtor (Hain & Schreier, 1996).

Os genes de resistência a herbicidas são de ocorrência natural, pois eles estão presentes em praticamente todas as espécies vegetais. Se eles não existissem, a maioria dos herbicidas não seria seletiva. Algumas espécies de plantas mostram uma resistência no mínimo parcial a certos herbicidas ditos inespecíficos, o que significa que alguns genes de resistência aos herbicidas estão presentes no genoma vegetal – eles são simplesmente menos eficientes do que os genes que conferem resistência aos herbicidas seletivos. Isto é comprovado pela pesquisa realizada com um banco de genes de arroz, onde foram testadas 16 mil variedades de 99 países, para resistência ao herbicida glifosato. Seis variedades mostraram-se resistentes a altos níveis do herbicida (1kg ha^{-1}), confirmando a presença em seus genomas, de genes naturais de resistência. Uma outra abordagem é que os herbicidas são produtos químicos escolhidos com base na presença de genes de resistência nas espécies comerciais. Os herbicidas não são naturais, contrariamente aos genes de resistência presentes nas espécies. Eles são portanto, a base da seletividade do herbicida (Hain & Schreier, 1996).

Existem obviamente, diferentes genes de resistência a herbicidas, e cada espécie de planta difere em seus genes, assim como as muitas variedades de uma mesma espécie. Isto significa que não existe um herbicida ideal – um que possa deixar todas as variedades de plantas cultivadas intocadas enquanto controla todas as espécies invasoras. Assim, um amplo espectro de herbicidas seletivos deve ser utilizado em

combinação para garantir um adequado controle de invasoras. Se o melhoramento convencional de plantas ou a engenharia genética pudessem tornar todas as espécies de plantas cultivadas tolerantes a um herbicida particular, certamente o controle das invasoras seria mais eficiente, sem contar que este herbicida teria um domínio sobre o mercado (Hain & Schreier, 1996).

Existem vários mecanismos que podem fazer com que uma planta resista a ação de herbicidas: a) ação de um sítio de resistência; b) superprodução do sítio de ação; c) detoxicação do herbicida por degradação ou por conjugação; d) compensação bioquímica da ação do herbicida; e) inibição do herbicida; f) inibição do transporte do herbicida para o local de ação. Todos esses mecanismos ocorrem naturalmente em plantas tolerantes a herbicidas. Em contraste, muitas espécies cultivadas como milho e arroz, detoxicam muitos herbicidas por hidroxilação ou metilação de seus grupos de substância. Reações de degradação são conhecidas para metribuzin, pela produção de uma desaminase encontrada em variedades tolerantes de soja (Fedtke, 1991). Plantas que superexpressam glutamina sintetase, o sítio de ação de todos os herbicidas Basta, são resistentes a este herbicida (Donn *et al.*, 1984).

Todos os herbicidas paraquat e diquat matam plantas por inibição do transporte de elétrons no fotossistema I, que leva a formação de quantidades incompensáveis de radicais oxigênio. Biótipos resistentes produzem grande quantidade da enzima superóxido desmutase, que detoxica o oxigênio ativo, num exemplo de compensação da ação de um herbicida (Harper & Harvey, 1978).

Com ajuda da engenharia genética, é possível transferir alguns desses genes presentes em plantas tolerantes para uma espécie comercial de interesse, que não apresente resistência. Entretanto, existem outros organismos que são sabidamente capazes de "quebrar" herbicidas, como por exemplo, alguns microrganismos do solo. Os microrganismos apresentam enzimas similares às enzimas vegetais, mas que não são inibidas por herbicidas, o que constitui uma importante fonte de genes de tolerância a ser utilizada na engenharia genética.

Teoricamente, todas as plantas cultivadas podem ser resistentes a todos os herbicidas, mas até o presente, existem certos limites e não apenas devido ao estágio de desenvolvimento da tecnologia. Por exemplo, ainda é impossível transformar todas as espécies cultivadas importantes com adequada eficiência, isto é, incorporar genes em seus genomas por métodos *in vitro*. Os efeitos secundários dos novos genes introduzidos sobre o metabolismo também não são totalmente benéficos, podendo tornar o biótipo resistente menos vigoroso que o biótipo sensível, especialmente na ausência do herbicida. Fenômenos deste tipo já foram observados nos dois projetos pioneiros de resistência a herbicidas discutidos na literatura: resistência a atrazina e a glifosato (Hain & Schreier, 1996).

A atrazina é um herbicida inibidor de fotossíntese pois reduz o transporte de elétrons no fotossistema II. Sua seletividade é devido à degradação e reação de conjugação em plantas resistentes. Provavelmente a mais importante reação é a conjugação à glutationa, como ocorre em milho. Nos Estados Unidos e principalmente na França, o uso regular de atrazinas por muitos anos, levou à seleção de biótipos resistentes, contendo um sítio de ação alterado – a proteína D1, de 32 kDa. Esses mutantes foram caracterizados pelo fato de que em alguma instância eles tiveram

resistência cruzada com outros herbicidas com o mesmo modo de ação: triazinonas, uracilas e uréias (Van Oorschoot, 1991). O gene de resistência (*psb*A) está localizado no cloroplasto e é transferido via linhagem materna. Para a engenharia genética, entretanto, os cloroplastos representam uma segunda barreira à transformação de plantas (a primeira é a membrana celular), pois a incorporação do DNA exógeno nesta organela está longe de se tornar rotina. Tentou-se introduzir o gene mutante *psb*A no núcleo e transportar a proteína para o cloroplasto com a ajuda de uma seqüência de direcionamento apropriada. Embora a proteína tenha sido transferida (Cheung *et al.*, 1988), as plantas resultantes não foram suficientemente resistentes. Por outro lado, outros melhoristas conseguiram introduzir com sucesso, um gene mutante *psbA* em *Brassica campestris*, utilizando métodos convencionais (Beversdorf *et al.*, 1980). Resultados positivos também foram obtidos utilizando fusão de protoplastos (Thomzik & Hain, 1988). Embora seja possível a transferência de genes de resistência a herbicidas do tipo atrazina por meio de engenharia genética, está claro que a estratégia possui limitações que geralmente penalizam a produção – foram relatadas reduções de cerca de 20% na produção (McCloskey & Holt, 1990), reduzindo os benefícios econômicos de tais variedades, o que garante suas vantagens apenas em circunstâncias especiais. A estratégia opcional, criada pela Ciba-Geigy para contornar este problema, foi clonar um gene da enzima glutationa-S-transferase de fígado de rato, que detoxifica a atrazina. As plantas transformadas com este gene, realmente foram resistentes ao herbicida, sem contudo, perder a capacidade produtiva. Mas, como a reputação dos herbicidas a base de atrazina tem sido severamente afetada pela contaminação de lençol freático, o projeto foi interrompido (Hain & Schreier, 1996).

A produção de plantas resistentes ao glifosato foi outro projeto pioneiro da engenharia genética de plantas. Glifosato é um herbicida de amplo espectro que interfere na via metabólica da síntese de aminoácidos aromáticos e inibe uma enzima presente no início da cadeia, a 5-enolpiruvil 3-fosfochiquimato (EPSP) sintetase. Diferentemente dos animais de sangue quente, que obtêm os aminoácidos aromáticos dos alimentos, plantas e microrganismos possuem uma via metabólica para sua síntese e são, portanto, sensíveis ao glifosato.

Uma companhia de biotecnologia da Califórnia, a Calgene, foi a primeira a produzir plantas resistentes ao glifosato por técnicas de engenharia genética; a bactéria *Salmonella typhimurium* resistente foi selecionada *in vitro* e o gene mutante da EPSP sintetase foi clonado (Comai *et al.*, 1985). A Monsanto, uma das empresas fabricantes do glifosato, seguiu outra estratégia. Usando uma cultura de células de petúnia, os pesquisadores conseguiram selecionar plantas resistentes ao glifosato com uma mutação no sítio de ação e algumas outras plantas em que a proteína era superexpressa (Shah *et al.*, 1986). A razão para essas diferentes linhas de pesquisa foi que em plantas, a EPSP sintetase é codificada no núcleo, mas a enzima tem que ser transportada para o cloroplasto, onde ela torna-se ativa. Se a busca por mutantes é conduzida em plantas, o gene encontrado já contém o sinal necessário para o transporte; no caso de bactéria, o sinal para transporte deve ser incorporado. Este procedimento também torna as plantas resistentes ao glifosato (Hain & Schreier, 1996). Outros genes que codificam EPSP sintetases modificadas já foram isolados de outros microrganismos e estão sendo utilizados na obtenção de variedades comerciais tolerantes ao glifosato.

Em soja, espécie já dotada de parcial resistência ao glifosato, a transferência deste simples gene de resistência resulta em uma tolerância bastante satisfatória ao herbicida. Entretanto, em algumas espécies particulares como o milho e a beterraba, o grau de resistência não foi suficiente pois o glifosato foi transferido e acumulado nos tecidos meristemáticos, tornando a planta estéril após aplicação do herbicida ou penalizando a produção. A clonagem de genes para degradação do glifosato foi a única saída encontrada pelos pesquisadores para contornar o problema (Kishore & Barry, 1992). Várias espécies (milho, tomate, beterraba, algodão) com ambos os genes – o gene da EPSP sintetase e o gene de degradação extraído de bactéria – foram estudadas para viabilizar seu uso agrícola.

Esta é a primeira realização de uma estratégia clássica e muito discutida de tornar um herbicida não seletivo em seletivo, utilizando a engenharia genética. Além da possibilidade de transferir o sistema para a prática agrícola, e a questão se ele pode competir efetivamente com herbicidas seletivos e de atuação no solo, existe ainda o problema do aparecimento de biótipos de plantas invasoras resistentes na região. Apesar de ter sido usado há vários anos, diferentemente das atrazinas, não foi observada a seleção de biótipos resistentes no campo contra a ação do glifosato. A questão se isso é uma propriedade positiva do glifosato e em que ele difere dos outros herbicidas, ainda não pode ser respondida. A maneira que o glifosato tem sido utilizado e a sua curta meia-vida podem ter contribuído desfavoravelmente para o desenvolvimento de resistência no campo. O problema só poderá ser avaliado após extensivo uso de variedades resistentes, com aplicações sucessivas do produto em uma mesma estação. Efeitos indesejáveis deste tipo poderão ser evitados com o manejo adequado do herbicida – usando rotação com outros herbicidas, por exemplo.

Outro projeto para converter um herbicida não seletivo ou semi-seletivo em herbicida seletivo através de engenharia genética, diz respeito à resistência ao Basta ou glufosinato de amônio, um análogo químico sintético de um herbicida (bialaphos) produzido naturalmente pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*. Em plantas, o Basta inibe a enzima glutamina sintetase, levando a fomação de amônia e matando as células (Hain & Schreier, 1996). O fungo que sintetiza o bialaphos também possui um gene que pode ser utilizado como princípio de resistência: transferindo-o para a planta, o *pat* ou *bar*, gene que codifica para fosfinotricina acetiltransferase, confere resistência ao Basta (De Greef *et al.*, 1989). Várias espécies de plantas têm sido transformadas para tolerância ao Basta, muitas delas já registradas como variedades resistentes. Os genes de resistência são altamente ativos e a margem de segurança observada em plantas resistentes é mais do que adequada, e o que é mais interessante, sem penalidade para a produção. Assim como o glifosato, o Basta não é efetivo em solo, mas resta saber se resistência de invasoras pode ser desenvolvida em condições de produção em larga escala, já que o Basta é relativamente novo e, ao contrário do glifosato, ainda não foi extensivamente utilizado. Seleção *in vitro* em cultura de células em suspensão, entretanto, levou a formação de resistência através de amplificação do local de ação (Donn *et al.*, 1984). Em vista da sua eficiência sobre células vegetais em cultivo, o gene *bar* tem-se estabelecido como um eficiente marcador seletivo em engenharia genética de plantas e tem sido utilizado em muitos laboratórios por todo

o mundo. Previsões indicam que o uso da resistência ao Basta em plantios comerciais irá aumentar no futuro, mas resta saber se ele irá promover um efeito satisfatório em campo.

Inibidores de acetolactase sintetase (ALS) formam um grande grupo de herbicidas disponíveis comercialmente. O grupo é composto de produtos químicos de classes de substâncias incontáveis que têm em comum o sítio de ação com acetolactase sintetase. ALS ou AHAS (acetohidroxiácido sintase) é uma enzima que participa da biossíntese de aminoácidos. Semelhantemente à EPSP sintase, sua ação é encontrada em plantas e em microrganismos (Stidham, 1991), onde ocorre na forma de um número de isoenzimas (enzimas de função semelhantes codificadas por genes diferentes). Este grupo de herbicidas inclui as sulfoniluréias, uma classe que compreende tanto herbicidas seletivos, como não seletivos, que podem ser utilizados antes ou depois da emergência. A seletividade em plantas cultivadas e a resistência natural em espécies invasoras são devidas essencialmente ao eficiente metabolismo – é freqüente a detoxificação por hidroxilação seguida por reações de conjugação (Hain & Schreier, 1996).

Igualmente variadas são as imidazolinonas, uma classe de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação encontrado nas sulfoniluréias. Outra classe de compostos com o mesmo sítio de ação é a das triazolopirimidinas, além de outras que não serão aqui mencionadas.

A possibilidade de utilizar estes herbicidas para selecionar microrganismos e culturas de células para resistência *in vitro*, levou muito rapidamente à criação de plantas modelo de resistência a herbicidas. Inicialmente, os melhoristas lançaram linhagens de milho resistentes a herbicidas da classe das imidazolinonas. A nova variedade tinha um público específico: ser cultivado em campos onde a soja havia sido tratada com "Scepter", mas obteve um estrondoso sucesso nos dois primeiros anos após o lançamento. Encorajados por isso, em 1993 a DuPont introduziu linhagens de soja resistentes a sulfoniluréias (Hain & Schreier, 1996).

Uma ampla gama de produtos têm sido investigados e a resistência é sempre devida a uma mutação em um dos genes para o sítio de ação. Resistência cruzada com outros herbicidas destes grupos é encontrada freqüentemente e em alguns casos a mutação aumenta a resistência e em outros aumenta a sensibilidade (Hain & Schreier, 1996).

Os oponentes da engenharia genética de plantas apresentam uma série de argumentos contra o uso de plantas transgênicas resistentes a herbicidas, como por exemplo: a) resistência a herbicidas em plantas significa aumentar o uso de herbicidas, o que significa mais produtos químicos sobre a terra; b) resitência a herbicidas torna os produtores dependentes das companhias químicas; c) resistência a herbicidas torna as espécies mais pobres do ponto de vista genético; d) genes de resistência a herbicida irão escapar das plantas cultivadas para as plantas selvagens e tornar os herbicidas obsoletos; e) genes de resistência a herbicidas em plantas levam à produção de novas substâncias que podem ser tóxicas.

Muitas dessas questões foram levantadas com base em argumentos essencialmente subjetivos, impedindo uma avaliação adequada de riscos e benefícios. A seguir serão apresentadas algumas discussões a respeito dessas questões segundo Hain & Schreier (1996).

5.1.1 RISCO DAS PLANTAS RESISTENTES A HERBICIDAS PROVOCAREM AUMENTO NO USO DE HERBICIDAS

Alguns dos projetos descritos objetivam substituir herbicidas pré-emergentes (utilizados profilaticamente no solo antes ou durante o plantio) por herbicidas emergentes, ou transformar herbicidas pré-emergentes em herbicidas pós-emergentes que possam ser utilizados em doses menores. Isto permite um uso mais racional do produto, ou seja, o objetivo da engenharia genética não é aumentar, mas sim reduzir a utilização de herbicidas, promovendo um maior controle de invasoras. A forma pela qual o risco acima é abordado ignora o fato de que cada indústria deve ser guiada primeiramente pelas necessidades do mercado e pela competição. Aqui a questão inerente é encontrar o melhor e mais efetivo método de controle de plantas invasoras, e, embora isso envolva outros fatores, o preço pelo qual este controle é oferecido depende largamente da dose de aplicação. A redução na dose de aplicação de um herbicida existente certamente reduz os custos de tratamento por hectare, o que garante maior volume de vendas do produto e soberania sobre os concorrentes. Os herbicidas são atualmente um dos itens mais caros dentro dos insumos agrícolas. É lógico que o produtor não utilizará maior quantidade deste produto só porque a planta cultivada apresenta uma maior tolerância (Hain & Schreier, 1996).

5.1.2 GENES DE RESISTÊNCIA A HERBICIDAS PODEM ESCAPAR DAS PLANTAS CULTIVADAS PARA AS SELVAGENS

Nesta discussão deve ser lembrado que genes de resistência a herbicidas ocorrem naturalmente em plantas e são constantemente explorados nas práticas agrícolas usuais. O uso contínuo e extensivo de herbicidas na agricultura durante principalmente as três últimas décadas, pode ser visto como um experimento gigante sobre a estratégia de resistência. Os resultados desta experiência mostram que não há notícias desta transferência, pelo menos não com uma freqüência que justifique preocupações em todo o mundo. Nenhuma transferência horizontal de genes foi observada entre espécies relacionadas, após muitos anos de intensiva pressão de seleção. Quando plantas invasoras passaram a apresentar resistência a herbicidas, isso ocorreu não por transferência horizontal de genes, mas sim por mutação de genes das próprias invasoras (Hain & Schreier, 1996).

5.1.3 EMPOBRECIMENTO DAS ESPÉCIES

O empobrecimento das espécies como resultados de sucessivos métodos de melhoramento tem sido discutido por décadas, desde a alta *performance* de variedades produzidas pelos modernos métodos de melhoramento, não sendo portanto um problema surgido com o advento da engenharia genética. Não existe discernimento entre risco específico de engenharia genética e risco de espécies melhoradas. Apesar disso, não há dúvidas de que plantas alteradas por engenharia genética poderão substituir outras plantas cultivadas, da mesma forma que ocorre no melhoramento convencional. O risco do *pool* de genes das plantas cultivadas entrar em erosão pelo sucesso das modernas técnicas de melhoramento é também real, como todas as técnicas anteriores. A solução para este sério problema ainda não foi encontrada, mas ele certamente não foi causado ou agravado pela engenharia genética. No melhoramento convencional, não apenas poucos e definidos genes são transferidos, mas genomas

inteiros. Milhares e milhares de genes e outras seqüências de DNA, que podem codificar para inúmeras proteínas, sobre os quais nada é totalmente conhecido, são introduzidos em ambientes que para muitos deles são novos. Como as seqüências transferidas em engenharia genética são poucas e bem definidas, as chances de erosão genética são reduzidas (Hain & Schreier, 1996).

5.2 RESISTÊNCIA A PRAGAS

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, dos quais, 13% devido a insetos. Atualmente os métodos de controle concentram-se basicamente na utilização de agroquímicos, mas há uma grande demanda por parte da sociedade pelo desenvolvimento de uma agricultura limpa, mais amistosa, que diminua o uso de energia e químicos e que não deixe tantos resíduos nos alimentos e no meio ambiente. O uso de variedades resistentes a pragas e patógenos vem de encontro a estes objetivos. As técnicas convencionais de melhoramento genético e as técnicas *in vitro* têm contribuído para tornar as plantas mais resistentes a estes fatores indesejáveis (Jouanin *et al.*, 1998).

Ao lado da resistência a herbicidas, o isolamento de genes que codificam para toxinas do *Bacillus thuringiensis* (genes *Bt*), abriram uma segunda área relevante para proteção de plantas na engenharia genética, resultando em produtos que já estão no mercado (bactérias melhoradas ou plantas modificadas por engenharia genética). Como no caso da resistência a herbicidas, o avanço na pesquisa e o seu rápido desenvolvimento foram dirigidos pelo fato de que o fenótipo desejado – neste caso a resistência a inseto – pode ser conseguido pela expressão de um simples gene na planta. O inseticida expresso pela planta apropriadamente modificada é uma proteína rapidamente biodegradada, não tóxica para animais de sangue quente (Hain & Schreier, 1996).

As estratégias para incorporar resistência a pragas diretamente em plantas não estão restritas ao princípio *Bt*. Existem muitas outras proteínas que apresentam propriedades inseticidas ou atuam como fatores antinutricionais sendo prejudiciais aos insetos, além de vários vírus que podem ser mobilizados com o propósito de controle de insetos. Este trabalho, assim como a pesquisa para encontrar resistência a nematóide, tem levado a um número elevado de resultados promissores (Hain & Schreier, 1996).

5.2.1 ENDOTOXINAS DO *Bacillus thuringiensis*: OS INSETICIDAS BIOLÓGICOS SENDO PRODUZIDOS POR ORGANISMOS TRANSGÊNICOS

A influência da biologia molecular e da engenharia genética sobre os tradicionais métodos de proteção contra insetos são claramente ilustrados pelos inseticidas baseados nas toxinas cristalinas do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Algumas previsões indicam que produtos tradicionais contendo toxinas do *Bt* e agentes químicos de proteção serão total ou parcialmente substituídos por plantas transgênicas capazes de produzir os ingredientes ativos.

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, que durante sua fase de esporulação no solo, forma cristais de proteína e os estoca na forma de corpúsculos de paraesporos. Na autólise da bactéria os esporos dormentes, resistentes ao calor, e os cristais de proteína são liberados. Essas endotoxinas são diferentes das exotoxinas

freqüentemente produzidas pelas mesmas células e excretadas no meio. Elas geralmente possuem uma forte ação tóxica, que não é restrita aos insetos e não é portanto, recomendada para controle de insetos.

Há cerca de um século, um *B. thuringiensis* foi isolado de uma larva do bicho-da-seda (*Bombix mori*, Lepidoptera), e dez anos depois, um organismo similar foi isolado de *Ephestia kuehniella* Berliner (em Thüringen, na Alemanha). Neste trabalho, associou-se a bactéria como causadora da morte de larvas de *Galleria melonella*, Lepidoptera e a chamou de *B. thuringiensis* (Hain & Schreier, 1996). Atualmente, existem várias coleções no mundo que contêm milhares de isolados de *B. thuringiensis*. As várias raças são classificadas com base em seu espectro de ação, suas toxinas cristalinas e suas similaridades genéticas (Tabela 1).

Como elas são altamente efetivas contra pragas de importância agrícola e florestal, muitos produtos *Bt* são agora utilizados para controle de pragas. Eles agem seletivamente contra pragas específicas, com reduzidos riscos para organismos benéficos e são muito seguros para o aplicador.

Estudos sobre o mecanismo de ação têm identificado as toxinas cristalinas do *B. thuringiensis* como veneno que age no sistema digestivo de larvas de inseto. O mecanismo de ação tem sido estudado extensivamente em Lepidópteros, Dípteros e Coleópteros. No pH alcalino do intestino desses insetos, os cristais de proteína ingeridos com a dieta se dissolvem e as pró-toxinas dissolvidas são então clivadas pelas proteinases intestinais do tipo tripsina (Milne & Kaplan, 1993), ativando as toxinas. As toxinas ativadas ligam-se às células da superfície do intestino médio causando aumento de volume e ruptura das mesmas e, conseqüentemente, destruindo o epitélio do intestino médio. A destruição do epitélio do intestino médio é devida à mudança no seu equilíbrio osmótico. O mecanismo exato ainda não está totalmente claro: duas possibilidades que têm sido propostas são a formação de poros nas membranas celulares pela própria toxina e a interação com as proteínas responsáveis pelo transporte de sódio e potássio presentes na membrana (Himeno, 1987).

A função dos esporos na patogênese é classificada em três tipos de reação. A reação do tipo I designa aquelas larvas que morrem muito rapidamente, dentro de 1 a 7 horas. Nessas larvas, o pH do intestino médio é maior que 9,5. Após a dissolução da parede do intestino pela toxina, o suco digestivo penetra no "haemocoel", onde os esporos germinam no esqueleto dos insetos e o *Bt* prolifera. No tipo II (pH intestinal entre 8,0 e 9,5) o inseto leva de 2 a 4 dias para morrer e os esporos germinam antes da morte. Se o pH do intestino da larva é menor que 8,0 (tipo III), a toxina abre o caminho para a invasão do haemocoel pela bactéria, causando morte por infecção

TABELA 1. Classificação simplificada das toxinas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* (Adaptado de Hain & Schreier, 1996).

Genótipo	Ação da toxina	Peso molecular da toxina
cryIA,B,C	Lepidoptera	cerca de 130 kD
cryIIA,B	Lepidoptera, Diptera	cerca de 70 kD
cryIIIA,B	Coleoptera	cerca de 73kD
cryIVA,B	Diptera	cerca de 130 kD
cryIVC,D	Diptera	cerca de 75 kD

bacteriana generalizada. Através da exploração da patogênese e da colonização de insetos, o *Bt* tem encontrado um nicho ecológico para reprodução e sobrevivência da espécie no curso de sua evolução (Hain & Schreier, 1996).

Produtos em *sprays* baseados em *Bt* são, não apenas o mais eficaz bioinseticida comercial para proteção de lavouras e florestas e para controle de mosquito, mas também começam a substituir as medidas de controle convencionais que apresentam algumas limitações práticas. Em 1992, entre os bioinseticidas em uso no mundo cerca de 90% são baseados no *Bt*, o que representou 2% do mercado mundial de pesticidas (Lambert & Peferoen, 1992). Este desenvolvimento é o resultado de décadas de pesquisa básica. Os primeiros estudos sobre o uso do *Bt* para controle de insetos foram realizados no início da década de 30 contra a "*European corn borer*" (*Ostrinia nubilalis*). O primeiro produto comercial (Sporeine) foi lançado na França em 1938, seguido por muitos outros produtos, principalmente em países europeus. A produção do Thuricide® pela Bioferm Corporation nos Estados Unidos, iniciou-se em 1957. Dois importantes acontecimentos ocorridos nos anos 60 foram particularmente importantes para a consagração dos produtos a base da toxina do *Bt*. O primeiro foi a descoberta da raça HD-1, uma raça *Bt kurstaki*, com 2 a 200 vezes mais atividade que os isolados anteriores. O HD-1 pôde ser produzido em larga escala e transformou-se na base da maioria dos produtos comerciais lançados desde então. O segundo foi a introdução de um sistema internacional para padronizar a atividade dos produtos *Bt* comerciais (Hain & Schreier, 1996). A despeito da sólida pesquisa desenvolvida na última metade do século XX com os produtos *Bt*, sua participação no mercado mundial de inseticidas é de apenas 1,5% a 2,0%. A previsão é que essa participação pelo menos dobre até o ano 2000, diferente dos outros produtos que apresentam uma tendência à estagnação. As razões para o baixo consumo são duas limitações: o estreito espectro de ação e a curta duração do seu efeito inseticida, problemas estes que a engenharia genética está empenhada em resolver (Hain & Schreier, 1996).

No início da década de 80, conseguiu-se a expressão funcional do gene da endotoxina do *Bt* em *E.coli* (Schnepf & Whiteley, 1981). Esta foi a primeira demonstração do potencial da engenharia genética na proteção de plantas cultivadas. Nos anos seguintes, alguns genes de endotoxinas foram isolados (Tabela 2) e expressos em uma ampla gama de microrganismos, de baculovírus a cianobactérias. O objetivo desses estudos foi melhorar a estabilidade da toxina no campo (uma das limitações anteriormente mencionadas) e, em certas condições, melhorar o efeito sobre determinadas pragas de importância.

A despeito do indiscutível sucesso dos produtos à base do *Bt*, eles são restritos quase que inteiramente a culturas de alto valor comercial, como hortaliças, e a controle de vetores de doenças em espécies florestais. As razões permanecem na biologia do *B. thuringiensis* e suas toxinas cristalinas: a) a ação altamente seletiva do *Bt* está freqüentemente restrita a poucas espécies; b) ele apresenta uma curta atividade foliar devido à alta instabilidade sob luz UV e à degradação por outros fatores; c) ineficácia contra pragas do solo que atacam raízes ou caule, pela dificuldade de alcance do produto; d) curta atividade no solo devido à degradação microbiana; e) baixa atividade na água devido à rápida deposição dos esporos e

TABELA 2. Relação de genes de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis (*Adaptado de Hain & Schreier, 1996).

Genes	Peso molecular da endotoxina (kD)	Raça	Referência
Ativo contra Lepidoptera			
cryIA(a)	133,1	*Bt kurstaki*	Schnepf *et al.* (1985)
cryIA(b)	130,6	*Bt kurstaki*	Wabiko *et al.* (1986)
cryIA(c)	133,3	*Bt kurstaki*	Adang *et al.* (1985)
cryIC	135,0	*Bt entomocidus*	Honee & Visser (1988)
Ativo contra Coleoptera			
cryIIIA	73,1	*Bt san diego*	Hernstadt *et al.* (1987)
Ativo contra Diptera			
cryIVA	134,4	*Bt israelensis*	Ward & Ellar (1987)
cryIVB	127,8	*Bt israelensis*	Sekar & Carlton (1985)
cryIVC	77,8	*Bt israelensis*	Thorne *et al.* (1986)
cryIVD	72,4	*Bt israelensis*	Donavan *et al.* (1988)
cytA	27,4	*Bt israelensis*	Waalwijk *et al.* (1985)

cristais e adsorção a partículas orgânicas. Todas essas propriedades justificam a limitada utilização do *Bt* e a necessidade de freqüentes reaplicações, equipamentos especiais e intenso monitoramento da cultura. Em outras palavras, a utilização desses produtos consome tempo e recursos consideráveis, quando comparados com o controle utilizando inseticidas químicos. Isto faz com que eles sejam pouco utilizados em grandes culturas como as do milho, soja, trigo, algodão, arroz etc. Para atingir este mercado, as propriedades do *Bt* devem ser otimizadas através de melhores formulações e novos sistemas de aplicação, ou talvez pela modificação da própria biologia do *B. thuringiensis*. Uma grande perspectiva é oferecida pela engenharia genética, com o desenvolvimento de microrganismos ou plantas transgênicas que expressem as endotoxinas do *Bt* (Hain & Schreier, 1996; Peferoen, 1997).

Na utilização de microrganismos transgênicos para ampliar a gama de hospedeiros, três técnicas são mais comumente adotadas: a) transferir um gene de toxina do *Bt* para uma raça não-homóloga, ou combinar endotoxinas complexas com ação aditiva ou sinergistíca; b) transferir genes da toxina do *Bt* para vírus entomopatogênicos para acelerar sua ação e ampliar o espectro de hospedeiros; c) modificar os domínios funcionais nos genes para toxinas cristalinas usando tecnologia do DNA recombinante, de forma a ampliar o espectro de ação e melhorar a estabilidade dos produtos no campo.

Usando eletroporação, Crickmoore *et al.* (1990) transferiram um gene *cry*IIIA, ativo contra coleópteros, para *Bt israelensis* e obtiveram não apenas a ação esperada contra larvas de coleópteros e mosquitos, mas também atividade contra lepidópteros (*Pieris brassicae*). Resultados similares foram obtidos quando genes *cryI*A(b) foram transferidos para *Bt tenebrionis*. Além da atividade contra lepidópteros e coleópteros, obteve-se também uma inesperada atividade contra dípteros.

Para evitar problemas regulatórios nos testes com raças de *Bt* obtidas pela tecnologia do DNA recombinante, Carlton *et al.* (1990) utilizaram um meio termo. Utilizando a conjugação bacteriana que ocorre naturalmente, os autores transferiram um gene *cry*IIIA ativo contra coleópteros, para uma raça de *Bt kurstaki*. O resultado desta estratégia gerou o produto comercial Foil®, da Ecogen, que é eficiente contra a larva do besouro Colorado e contra a *European corn borer* (*Ostrinia nubilaris*). Como a raça não tinha sido produzida geneticamente, a Ecogen teve dificuldades na obtenção do registro de seu produto comercial (Hain & Schreier, 1996).

Uma segunda estratégia para ampliar o campo de ação das endotoxinas do *Bt* foi dada por Martens *et al.* (1990) que expressaram os genes *cryI*A(c) e *cryI*A(b) em um vírus da polihidrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Culturas de células de *Spodoptera frugiperda* foram infectadas com o vírus recombinante AcNPV, contendo *cryI*A(b) e expressaram grande quantidade de pró-toxina *cryI*A(b). Entretanto, ambos os grupos foram incapazes de detectar alguma ação da virose recombinante contra larvas de lepidópteras, provavelmente porque as endotoxinas do *Bt* estavam localizadas dentro das células, não podendo exercer nenhum efeito tóxico.

A terceira estratégia para ampliar o espectro de ação é utilizar a tecnologia do DNA recombinante para produzir raças com grandes quantidades de endotoxinas ou modificar os complexos cristalinos das toxinas. As pesquisas nesta área têm sido muito intensas.

O uso dos produtos convencionais à base de *Bt* é restrito pela inadequada duração dos efeitos tóxicos, ou pela baixa atividade contra larvas que se alimentam dentro da planta ou em suas raízes, ou seja, fora do alcance direto do produto. Para prolongar a ação dos efeitos dos ingredientes ativos do *Bt* e para estender seus efeitos para as pragas que se alimentam dentro da planta, genes de endotoxinas foram expressos em microrganismos endofíticos ou nas próprias plantas hospedeiras. A companhia americana CGI selecionou uma bactéria endofítica (*Clavibacter xyli* sp cynodotis), que coloniza o sistema vascular de plantas, que foi capaz de produzir endotoxinas *cryI*A(c) para dar mais eficiência no controle de larvas como a *European corn borer*. Sementes de milho foram então cobertas com *C. xyli*, resultando na colonização de mais de 90% das plantas com a bactéria. Considerando a proteína total da planta, a quantidade de toxina formada foi de mais de 0,025%. O produto da CGI é conhecido como InCide®, e é um dos poucos produtos desse tipo testados no campo (Hain & Schreier, 1996).

O sistema CellCap®, uma formulação da Mycogen Corporation's, foi lançado no mercado com uma proposta de um aumento de duas a três vezes no tempo de duração das endotoxinas nas folhas. O sistema utiliza uma bactéria não patogênica, a *Pseudomonas fluorescens*, que coloniza folhas e contém um plasmídeo que codifica para uma endotoxina *Bt*. A raça transgênica *de P. fluorescens* produz uma toxina cristalina no fermentador mas, diferente do *B. thuringiensis,* ela não se quebra ao final da fermentação. Por razões regulatórias, a bactéria é morta e fixada. Mas, diferentemente dos produtos convencionais, ele contém uma toxina estável encapsulada e fixada na célula da bactéria. Como a bactéria geneticamente modificada no produto tinha sido morta, não houve grandes problemas para a sua liberação comercial (Hain & Schreier, 1996).

5.2.2 PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO GENES *Bt*

Tão logo houve possibilidade de transformar plantas geneticamente (1983-1985), foram realizadas várias tentativas de expressar endotoxinas do *Bt* em vegetais. O primeiro resultado com sucesso ocorreu em 1987, quando foram produzidas plantas transgênicas de fumo resistentes ao ataque de pragas (Vaeck *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987; Fischoff *et al.*, 1987). Um grande número de projetos de sucesso nesta área foram então divulgados (Tabela 3). A primeira geração de plantas foi capaz de sintetizar uma pró-toxina, mas a expressão do gene foi baixa e resultou em pequena quantidade de toxina (menos que 0,001% das proteínas solúveis da folha), resultando em pouco ou nenhum controle.

A necessidade de se otimizar a eficiência da tradução justifica-se pelos diferentes códons utilizados nos vários organismos. Embora o código genético seja universal, ele também é redundante, isto é, para um aminoácido existem freqüentemente mais de um códon. No processo evolutivo, uma diferença no uso dos códons redundantes foi desenvolvida entre plantas e bactéria. Para codificar a leucina, por exemplo, os códons selecionados pela bactéria, geralmente não são os mesmos selecionados pelas plantas. Esta situação é conhecida como preferência de códon. Assim, um gene de

TABELA 3. Plantas transgênicas resistentes a insetos obtidas pela transferência de genes da toxina do *B. thuringiensis* (Adaptado de Jouanin *et al.*, 1998).

Planta	Gene	Tipo	Inseto alvo	Referência
Tabaco	cryIA(a)	GN	*Manduca sexta* (L)	Barton *et al.* (1987)
	cryIA(b)	GN	*Manduca sexta* (L)	Vaeck *et al.* (1987)
	cryIA(b)&(c)	PM	*Manduca sexta* (L)	Perlak *et al.*(1991)
	cryIA(b)	GN	*Manduca sexta* (L)	Willians *et al.* (1993)
(cloroplastos)	cryIA(c)	GN	*H.virescens, H. zea, S. exigua* (L)	McBride *et al.* (1995)
	cryIC	S	*Spodoptera littoralis* (L)	Strizhov *et al.*(1996)
Tomate	cryIA(b)	GN	*Heliothis virescens* (L)	Fischoff *et al.* (1987)
Algodão	cryIA(b) e (c)	S	*H. zea, H. virescens* (L)	Perlak *et al.* (1990)
Batata	cryIA(b)	GN	*Phthorimaea operculella* (L)	Peferoen (1992)
	cryIIIA	S	*Leptinotarsa decemlineata* (C)	Adang *et al.* (1993)
	cryIIIA	S	*Leptinotarsa decemlineata* (C)	Perlak *et al.* (1993)
Alfafa	cryIC	S	*Spodoptera littoralis* (L)	Strizhov *et al.* (1996)
Canola	cryIA(c)	S	*Plutella xylostella, H. zea* (L)	Stewart *et al.* (1996)
			Trichoplusia ni, S. exigua (L)	
Soja	cryIA(c)	S	*H. zea, H. virescens* (L)	Stewart *et al.* (1996)
			Pseudoplusia includens (L)	
Milho	cryIA(b)	S	*Ostrinia nubilaris* (L)	Koziel *et al.* (1993)
Arroz	cryIA(b)	S	*Chilo suppressalis* (L)	Fugimoto *et al.* (1993)
			Cnaphalocrosis medinalis (L)	
Poplar	cryIA(a)	PM	*Lymantria dispar* (L)	McCown *et al.* (1991)
	cryIIIA	GN	*Chrysomela tremulae* (C)	Cornu *et al.* (1996)

L, Lepidoptera; C, Coleoptera; GN, gene nativo; PM, parcialmente modificado; S, gene sintético.

bactéria não será perfeitamente traduzido em proteína na planta. A presença de vários códons que são raramente utilizados em plantas leva a uma reduzida expressão. Além disso, diferentemente da maioria dos genes vegetais, esses genes bacterianos são extremamente ricos em nucleotídeos A + T. Especula-se que o códon usual dos genes *cry* está longe de se expressar bem em plantas e que os sinais de poliadenilação assim como outros fatores, reduzem a estabilidade do transcrito (Jouanin *et al.*, 1998). Os genes de bactéria como os de *Bt* devem primeiro ser otimizados antes de serem favoravelmente traduzidos em proteínas: no gene transferido, os códons que são raros nas plantas são substituídos por códons mais comuns. Esta otimização tem levado à obtenção de genes parcial ou totalmente sintéticos. Como resultado, a quantidade de endotoxina produzida na planta tem, em alguns casos, aumentado em até mil vezes (Perlack *et al.*, 1991). Por exemplo, em tabaco a proporção de endotoxina aumentou de 0,001% para 0,3% do total de proteínas solúveis. O códon usual também pode ser otimizado para expressão em mono ou dicotiledôneas. Neste último caso, a expressão do gene foi ampliada pela inserção de introns na seqüência 5' não traduzida (Koziel *et al.*, 1993).

Na maioria dos casos, as seqüências que codificam toxinas do *Bt* foram introduzidas sob o controle de um promotor constitutivo – promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor – CaMV. Entretanto, em alguns casos, promotores tecido-específicos – promotor PEPC de milho que se expressa em tecidos verdes, ou um promotor específico para pólen – (Koziel *et al.*, 1993), ou promotores induzidos por ferimentos – o promotor do gene relacionado à patogênese PR-1a – (Willians *et al.*, 1993) ou o gene da manopina sintetase de *A. tumefaciens* (Vaeck *et al.*, 1987), também foram utilizados.

A possibilidade de desenvolver plantas transgênicas que produzam endotoxinas de *Bt* pode solucionar os problemas tradicionais dos produtos *Bt*. A transferência e expressão de genes de toxina *cry* em plantas converte inseticidas não sistêmicos em sistêmicos, possibilitando o controle até dos insetos que se alimentam dentro da planta ou em suas raízes. As empresas Ciba-Geigy e Mycogen obtiveram autorizações para plantio de milho transgênico resistente a insetos, em 1994. Em 1996, a Delta and Pineland e a Monsanto obtiveram liberação para primeira comercialização de algodão transgênico, nos EUA. Os benefícios da incorporação de um gene sintético *cry*IA não estão restritos à adequação de eficiência de controle de *Heliothis virescens*, comparável à eficácia dos produtos em *spray*: como as plantas tratadas com estes produtos, as plantas transgênicas com superexpressão do gene *Bt* também apresentaram eficácia no controle de *Helicoverpa zea*. Neste caso, o próximo passo será introduzir um gene *Bt* ativo contra Lepidópteras, assim como previnir ou minimizar o desenvolvimento de resistência nestas variedades sintéticas. Em 1996, a Monsanto conseguiu liberação para comercialização de batata resistente ao besouro Colorado, obtido pela introdução do gene *cryIII*. Estes exemplos mostram que algumas das limitações dos produtos tradicionais de *Bt* têm sido superadas com a introdução das plantas transgências.

5.2.3 OS PROBLEMAS DE RESISTÊNCIA AO *Bt*

Alguns procedimentos vêm sendo recomendados a fim de diminuir a pressão de seleção e conseqüentemente dificultar a quebra da resistência ao *Bt*, uma vez que

a seleção de insetos resistentes ao *Bt* é inevitável, seja ele pulverizado sobre a plantação ou produzido nas células do vegetal. Sempre haverá alguns indivíduos dotados de resistência natural, que com o uso do *Bt* ganham uma súbita vantagem para sobreviver e reproduzir-se. As autoridades americanas estipularam que as plantas transgênicas em campo devem ser combinadas com plantas não transgênicas, controladas com produtos químicos, ou em rotações sazonais com sistemas convencionais de proteção. Outras idéias alternativas têm sido propostas como a combinação em uma mesma planta de vários genes *Bt*. Existem ainda, outros tipos de genes que conferem resistência a insetos que também podem ser utilizados em combinação com o sistema *Bt*. Outra estratégia que tem sido proposta é combinar variedades misturadas com e sem genes *Bt*, estabelecer refúgios com cultivos alternados de plantas resistentes e não resistentes, para dar à praga a chance de se reproduzir. Desta forma espera-se que, com a competição entre os dois tipos de pragas, o biótipo resistente não se sobressaia rapidamente (Hain & Schreier, 1996).

5.2.4 PEPTÍDEOS INIBIDORES DE PROTEINASES

Sabe-se desde 1938, que as plantas contêm peptídeos que atuam como inibidores de proteinases (IPs). Este grupo de proteínas está amplamente distribuído no reino vegetal e faz parte de um mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de pragas e doenças (Richardson, 1991). As proteínas de defesa podem ser produzidas constitutivamente, em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque, como as sementes, ou podem ser induzidos por danos mecânicos, como ocorre quando um inseto se alimenta de uma folha (Jouanin *et al.*, 1998). Interessantemente, a ativação da expressão dos IPs se dá de forma sistêmica em toda a planta. Entretanto, alguns IPs são tóxicos a mamíferos o que indica que devam ser cautelosamente estudados para uso como mecanismo de proteção de plantas a insetos.

Assim como o *Bt*, os IPs atuam no intestino dos insetos inibindo a atividade proteolítica das proteinases intestinais. Assim, são considerados agentes antimetabólicos devido à redução da digestibilidade e qualidade nutricional das folhas. A principal ação dos IPs se dá na inibição da digestão protéica dos alimentos ingeridos pelos insetos, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos. Este processo interfere na síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Alternativamente os inibidores podem afetar o metabolismo de forma indireta, via um mecanismo de *feedback* que aumenta a produção de proteinases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis devido à inibição da atividade proteolítica (Broadway & Duffey, 1986).

Os efeitos tóxicos e antinutricionais dos inibidores de proteinases são basicamente estudados em insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Ortoptera (Hain & Schreier, 1996).

De acordo com sua especificidade, os inibidores de proteinase (IPs) podem atuar sobre quatro classes de proteinases: as serino-proteinases (normalmente presentes em lepidópteros), cisteíno-proteinases (encontrados principalmente em coleópteros), metalo-proteinases e aspartil-proteinases, sendo que estas duas últimas são de ocorrência rara e, portanto, menos estudadas. Os IPs vegetais são pequenos polipeptídeos variando de 6.000 a 20.000 Da. IPs do tipo serina e cisteína são abundantes em sementes e tecidos de reserva de plantas, e quando incorporados em

dietas artificiais de insetos, têm demonstrado o seu potencial de interferir no crescimento larval de insetos (Boulter, 1993; P. Pompermayer, 1999 – Comunicação pessoal).

Alguns trabalhos pioneiros mostraram (Green & Ryan, 1972) que em batatas e tomates, os genes que codificam os inibidores de proteinases estão ligados a seqüências regulatórias de forma que são ativados por ferimentos, compostos químicos (ácido jasmônico, coronatina, sistemina etc), estímulo elétrico, e expressam-se de forma sistêmica em toda a planta. A expressão de um gene antisense de pró-sistemina em tomate transgênico, reduziu a capacidade das plantas em produzir inibidores, tornando-as mais suscetíveis ao ataque da larva de *Manduca sexta* (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993).

Os genes que codificam IPs são capazes de funcionar em sistemas heterólogos. Após a transferência do gene que codifica o inibidor de tripsina do caupi (*Vigna sinensis*) para plantas de tabaco, Hilder *et al.* (1987) observaram uma expressiva redução no consumo de área foliar por parte da lagarta da maçã do algodoeiro (*Heliothis virescens*) quando comparadas ao controle. Convém ressaltar que o inibidor de tripsina do caupi é um dos IPs que não são tóxicos aos mamíferos (Pusztai *et al.*, 1992). Resultados semelhantes também foram observados em trabalhos similares de transferência de genes IPs de tomate e batata para fumo (Johnson *et al.*, 1989). É interessante notar que os parentes selvagens do tomate encontrados nos Andes, possuem conteúdo de IPs muito superiores às variedades comumente comercializadas. Esta observação suscita a questão se os tomates comercializados atualmente foram melhorados a partir de variedades contendo menos IPs ou se a seleção para diminuição do conteúdo de IPs ocorreu no curso do melhoramento (para melhor produção ou sabor).

Poucos inibidores de proteinases do tipo cisteína são conhecidos e sua ação sobre insetos praga tem sido menos estudada que os IPs de serina. A caracterização das proteinases intestinais de insetos da ordem Coleoptera tem mostrado a presença de cisteíno-proteinases (Terra & Ferreira, 1994; Jouanin *et al.*, 1998). Recentemente, foi mostrado que um potente inibidor de proteinase encontrado em *Trypanosoma cruzi*, a Chagasina, foi altamente eficiente na inibição da atividade proteolítica de uma cisteíno-proteinase encontrada em uma importante praga da cana-de-açúcar, o coleóptero *Sphenophorus* (M.C. Falco – Comunicação pessoal). Estas observações levaram à transformação genética da cana-de-açúcar com o gene em questão. Trabalhos envolvendo o cDNA de uma cisteíno-proteinase de arroz (oriza-cistatina) quando introduzido em diferentes plantas (batata, arroz, poplar, tomate, algodão), interferiram no desenvolvimento de diferentes pragas (Leplé *et al.*, 1995).

Uma observação interessante mostrou que diversas espécies de insetos são capazes de se adaptar à presença de IPs expressos em plantas transgênicas (para uma revisão, Jongsma & Bolter, 1997). Aparentemente, este mecanismo foi utilizado por insetos polífagos durante o processo de coevolução com as plantas. Basicamente, este processo consiste na produção de proteinases que são pouco sensíveis à inibição dos IPs (Paulillo *et al.*, 2000).

Além de selecionar dentre os genes com potencial de resistência, deve haver a preocupação em não promover o rápido desenvolvimento de biótipos de pragas resistentes. Não há razões para supor que a extraordinária adaptabilidade que os insetos têm demonstrado em relação a inseticidas e plantas resistentes, não irá se repetir quando eles forem expostos a toxinas ou bioinseticidas engenhados em suas

plantas hospedeiras pelas novas técnicas moleculares. Isto é especialmente verdadeiro se a pressão de seleção aplicada pelas novas tecnologias, for similar àquelas aplicadas anteriormente, como por exemplo, o plantio de variedades resistentes (Wolfson & Murdock, 1995).

Para minimizar esta probabilidade, uma característica desejável nas plantas com gene de resistência a insetos é que elas tenham um efeito negativo sobre o crescimento da praga, mas que não cause alta mortalidade (Wolfson & Murdock, 1995). O decréscimo na população de pragas pode ser conseguido com atraso no desenvolvimento larval, retardo na ovoposição, diminuição na fecundidade, ou a combinação desses fatores. O crescimento lento de populações de insetos pode também ser positivamente associado com outros componentes do manejo de pragas (Farrar & Kennedy, 1990). Broadway (1995) concluiu que, embora numerosos estudos têm demonstrado que os IPs têm potencial para reduzir significativamente o desenvolvimento de insetos herbívoros, um simples inibidor não pode ser utilizado contra todos os insetos herbívoros, e um inibidor pode ter seu efeito reduzido devido a mudanças nas proporções relativas das enzimas digestivas presentes no intestino médio. Desta forma, um possível controle total dos insetos praga utilizando IPs está praticamente descartado, o que reduziu o interesse na aplicação de plantas transgênicas expressando IPs como estratégia de controle. Uma das razões desse desapontamento foi revelado recentemente, quando demonstrou-se que *Spodoptera exigua* (lagarta da beterraba) pode adaptar-se à presença de IPs em plantas transgênicas de tabaco expressando várias combinações de IPs de batata (PI-2) ou inibidores endógenos. O crescimento larval não foi afetado pelos IPs, embora estes tenham sido ligados às proteinases do intestino. As larvas evitaram uma drástica redução na sua capacidade digestiva através de um aumento de até três vezes na secreção de proteinases insensíveis aos IPs. As larvas parecem possuir sistemas *feedback* para monitorar e manter um nível adequado de atividade protéica. Várias espécies de insetos estudadas (Coleópteros e Lepidópteros), usando diferentes classes de proteinases (serinas, cisteínas e aspartil proteinases) para digestão de proteína, mostraram adaptação aos IPs vegetais por uma expressão de proteinases insensíveis aos mesmos (Jongsma *et al.*, 1996). Uma outra observação interessante é que os insetos apresentam uma complexa família multigênica que codifica diferentes isoformas de proteinases. A lagarta *Helicoverpa armigera* apresenta pelo menos 28 genes que codificam variantes de serino-proteinases que são diferencialmente regulados em função do tipo de dieta ou hospedeiro utilizado (Bown *et al.*, 1997).

A questão que persiste é se a resistência a insetos pode ser alcançada pela expressão de um número limitado de IPs em plantas transgênicas. O sucesso dos insetos em contornar a presença dos inibidores nas planta requer que eles herdem genes de proteinases que não sejam suscetíveis àqueles IPs inseridos na planta transgênica, e que estes possam ser expressos em quantidade suficiente para compensar a inibição das proteinases comumente utilizadas. Análises bioquímicas dos extratos intestinais de diferentes insetos indicaram que devem existir entre três e seis atividades de proteinases principais e dez a vinte outras de menor importância. Isto sugere que o número de proteinases insensíveis aos IPs deve ser limitado, principalmente porque, nos casos investigados, aproximadamente 70% das proteinases foram sensíveis aos

IPs vegetais induzidos por ferimentos. Outra questão é que a atividade de proteinases insensíveis aumentou duas a três vezes para compensar a inibição das proteinases sensíveis, mas isto não foi suficiente para restaurar os níveis normais de atividade protéica. Assim, a adaptação fisiológica aos IPs vegetais parece ser limitada (Jongsma *et al.*, 1996).

Algumas alternativas têm sido usadas na tentativa de contornar os problemas observados com a adaptação dos insetos aos IPs produzidos pelas plantas. Uma estratégia baseia-se na utilização de IPs de espécies vegetais bastante distantes, sob o ponto de vista evolutivo, daquelas em que o inseto utiliza como hospedeiro. Uma outra forma seria a melhoria na afinidade do IP introduzido pela proteinase-alvo do inseto (Michaud *et al.*, 1997). Esta última estratégia pode ser testada utilizando IPs engenhados, com suas afinidades otimizadas por modelos computacionais, como o descrito por Urwin *et al.* (1995), ou por *phage display*, como proposto por Jongsma *et al.* (1995). No primeiro caso, os autores engenharam a oryza-cistatina, um IP do tipo cisteína, por deleção de um resíduo aspartato de um dos sítios, resultando em um inibidor mais potente contra *Caenorhabditis elegans* e contra o nematóide de cisto *Globodera pallida*, de grande importância na cultura da batata. Na metodologia do *phage display*, grandes bibliotecas de variantes de genes de IPs que diferem apenas em aminoácidos presentes no sítio de inibição, são utilizados contra proteinases específicas de insetos. Este tipo de estratégia tem sido utilizado para a seleção de inibidores de serino-proteinase do tipo Kunitz de soja (Roberts *et al.*, 1992; Dennis & Lazarus, 1994), e na obtenção de variantes de IP do tipo Bowman-Birk, usualmente encontrado em sementes de soja, e atualmente em estudo como inibidor de proteinases digestivas da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) — Projeto de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Outras classes de inibidores que são produzidas pelas plantas para protegê-las contra o ataque de insetos são os inibidores de α-amilases (Garcia Olmedo *et al.*, 1987; Richardson , 1991; Grossi de Sá *et al.*, 1997). Entretanto, o número de trabalhos ainda é reduzido principalmente, pelo fato de inibirem amilases de mamíferos. O exemplo mais comum é o gene α-AI de feijão que confere resistência a bruquídeos como *Calosobruchus maculatus*, *C. chinensis* e *Bruchus pisorum*, embora já tenham sido relatados casos de *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, dois outros bruquídeos, com capacidade de clivar alguns tipos de α-AI (Ishimoto *et al.*, 1996).

Uma outra classe de proteínas com propriedades tóxicas a insetos, portanto passíveis de serem utilizadas na engenharia genética, são as lectinas. As lectinas fazem parte de um grande grupo de glicoproteínas vegetais de variados efeitos, incluindo uma atividade inseticida. Vários tecidos das plantas, incluindo raízes, folhas, frutos e sementes, freqüentemente apresentam quantidades substanciais de lectinas, principalmente as leguminosas. As lectinas têm sido sugeridas como agentes tóxicos contra insetos, no entanto seus efeitos são bastante variados (Boulter *et al.*, 1990). A variação nos efeitos das lectinas sobre os insetos pode ser devido a diferenças no seu mecanismo de ação, que ainda é pouco conhecido. Acredita-se que as lectinas atuem sobre alvos glicosilados no intestino dos insetos, causando inibição da absorção de nutrientes e/ou destruição de células do intestino médio (Eisemann *et al.*, 1994).

Existem ainda, outras enzimas que são tóxicas aos insetos que vêm sendo testadas. Uma das mais promissoaras é a colesterol oxidase de Streptomicetos (Corbin *et al.*, 1994). A sua atividade em plantas transgênicas é comparável ao efeito dos genes *Bt*, sendo que sua eficiência complementa algumas limitações desta estratégia, como por exemplo em *Anthonomus*. Enzimas como quitinases e lipoxigenases, que aparentemente agem contra insetos perfuradores e sugadores, a polifenol peroxidase (PPO) (Jouanin *et al.*, 1998) estão ainda em fase inicial de estudo.

As preocupações com estratégia de manejo de plantas transgênicas para controle de insetos são basicamente as mesmas dos genes de resistência introduzidos nas variedades através de métodos convencionais de melhoramento genético. Muitos dos alelos que conferem resistência nos insetos são recessivos e as estratégias de manejo devem garantir que um certo número de insetos suscetíveis estejam presentes para que os alelos de resistência não se fixem na população (Jouanin *et al.*, 1998). As estratégias para manter a suscetibilidade aos genes do *B. thuringiensis*, estão listadas na Tabela 4, e podem ser consideradas nos diversos sistemas que utilizam plantas transgênicas como ferramenta de controle de doenças e pragas e na tolerância a diversos fatores.

TABELA 4 . Estratégias para uso de plantas transgênicas na agricultura, particularmente para controle de pragas (Adaptado de McGaughey & Whalon,1992).

Seleção do gene de interesse	Gene único Múltiplos genes Genes quiméricos Genes variantes
Escolha dos promotores	Constitutivo Tecido-específico Induzidos (p.ex. por lesões)
Expressão do gene	Alta dose Baixa dose Mistura de ambas
Táticas de campo	Campos uniformes, com gene único Campo com mistura de genes Rotação de genes no campo Campo com plantio em mosaico Refúgios (espacial e/ou temporal)

5.3 RESISTÊNCIA A VÍRUS

As doenças virais em espécies cultivadas causam consideráveis perdas na produção. Considerando que o controle de vírus através de produtos químicos tem-se mostrado pouco eficiente tanto na agricultura como na medicina, as perdas são minimizadas pelo uso de métodos indiretos de controle. Geralmente estes métodos têm como alvo os vetores das doenças virais, normalmente insetos, nematóides e fungos. É comum a combinação de medidas de higiene com o uso de sementes livres de vírus e eliminação dos focos de vírus nas proximidades da cultura. O controle de vírus através de resistência genética é também muito importante e está dentre os principais objetivos da pesquisa para melhoramento de plantas.

O melhoramento convencional utiliza essencialmente propriedades de resistência dominante monofatorial, que são cruzadas nas variedades desejadas (Frasr, 1990). Entretanto, como as viroses envolvem rápida quebra de resistência, recomenda-se incorporar vários genes de resistência em uma mesma variedade como forma de retardar a quebra da resistência por parte do vírus. Um exemplo é o vírus do mosaico do tomateiro – ToMV. Neste caso, tem sido mostrado que a troca de apenas dois aminoácidos na proteína transportada leva a falha na resistência correspondente, inativando o gene de resistência (Tm-2) (Weber *et al.*, 1993). O conhecimento da biologia molecular do vírus, dos mecanismos pelos quais eles se replicam e se propagam, aliado às técnicas de engenharia genética, oferece oportunidades para o desenvolvimento de novas abordagens no controle de doenças virais. Estas pesquisas têm produzido resultados positivos nos últimos anos (Hain & Scherier, 1996).

Devido à sua diversidade, mecanismos de controle de largo espectro são improváveis de serem encontrados e aplicados. O ponto inicial para o melhoramento utilizando a tecnologia do DNA recombinante é o mesmo do melhoramento convencional: a resistência alvo está em fatores dominantes monogênicos. A eficácia de controle é exposta à extraordinária capacidade de evolução do vírus, que leva freqüentemente à quebra da resistência. No entanto, a engenharia genética tem utilizado vários métodos e estratégias que em combinações apropriadas, retardam a quebra de resistência.

As estratégias aplicadas pela biologia molecular no melhoramento para resistência a vírus estão concentradas sobre a expressão de genes para proteínas do vírus, como proteínas do nucleocapsídeo (capa protéica), proteínas de empacotamento, proteínas de transporte, ou seja, proteínas que exercem seu papel após sua transferência para a planta. A presença inadequada de uma dessas proteínas tanto ao nível espacial quanto temporal, interrompe a transcrição, replicação, ou mesmo a disseminação do vírus. As estratégias são então discutidas sobre como a replicação viral é inibida via expressão do RNA, isto é, RNA anti-senso, ribozimas e RNA satélite.

5.3.1 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA CAPA PROTÉICA

Muitos vírus consistem essencialmente de ácidos nucléicos empacotados dentro de uma capa protéica. Esta proteína permite o transporte de ácidos nucléicos dentro da planta e também propicia proteção e estabilidade dentro e fora do hospedeiro (a planta) e a insetos vetores. Proteção cruzada é um fenômeno de resistência conhecido há muito tempo, pela qual a infecção com um vírus atenuado protege a planta contra subseqüente infecção por uma raça virulenta da mesma espécie ou de espécies relacionadas, de forma que esta não consegue replicar seu ácido nucléico. Uma das hipóteses que têm sido lançadas para explicar este fenômeno é que a presença da capa protéica de um vírus é responsável pela primeira infecção, o que previne o empacotamento e a replicação do material genético de um segundo vírus. Embora a base genética para explicar este fenômeno ainda não tenha sido totalmente esclarecida, os métodos de engenharia genética podem ser utilizados para simular uma situação semelhante. Assim, a capa protéica foi constitutivamente expressa em uma planta transgênica para investigar os efeitos de sua presença sobre o empacotamento e a

replicação de vírus. O primeiro trabalho realizado envolvendo o uso de plantas transgênicas resistentes a vírus mostrou que em plantas de fumo, a expressão de um transgene para capa protéica preveniu contra a replicação do vírus do mosaico do tabaco – TMV (Powell Abel *et al.*, 1986). Neste estudo, foram observados redução no número de sítios de infecção após inoculação artificial mecânica, bloqueio na disseminação do vírus na planta e finalmente, menor produção de partículas virais. Resultados similares também foram obtidos em muitos outros sistemas envolvendo a interação vírus-planta (MacKenzie & Tremaine, 1990; Lawson *et al.*, 1990; Lindbo & Dougherty, 1992). Quando visto sob o ponto de vista quantitativo, entretanto, o sistema torna-se pouco consistente. Freqüentemente o nível de resistência não corresponde à intensidade de expressão encontrada. Os efeitos variam amplamente com a quantidade de inóculo e também de planta a planta. Da mesma forma que na proteção cruzada, a expressão de uma proteína do nucleocapsídeo também fornece proteção contra espécies relacionadas do vírus, sendo o grau de proteção diretamente relacionado com a seqüência homóloga da proteína da capa. Neste aspecto, alguns dos estudos de campo têm mostrado resultados muito positivos, e as variedades transformadas (tabaco, alfafa e algumas cucurbitáceas) rapidamente tornam-se passíveis de comercialização.

A partir da compreensão das bases moleculares do processo de infecção e replicação virais, um tipo promissor de abordagem tem sido proposto nos programas visando a resistência de plantas a vírus. Esta estratégia tem sido utilizada com sucesso contra um grande número de vírus vegetais, os vírus de RNA. Estes vírus contêm um genoma de fita simples que infecta o hospedeiro com a *plus strand*, isto é a fita sense. Um dos resultados positivos foi obtido com o vírus da murcha do tomateiro (TSWV – *tomato spotted wilt virus*). Neste estudo, foi utilizado o nucleocapsídeo ou proteína N que é fortemente associada com os fragmentos do genoma viral dentro do vírus. Gielen *et al.* (1991) e Pang *et al.* (1993) mostraram que a expressão do gene TSWV N em plantas transgênicas de tabaco produziu resistência ao TSWV. Novamente, não foi observada uma correlação positiva entre o grau de expressão da proteína e a resistência ao vírus. Nenhuma proteção contra vírus de outras famílias foi observada. Similarmente, não houve correlação entre grau de expressão e efeito (Pang *et al.*, 1993): uma pequena quantidade de RNA protege a planta, mas grandes expressões não evitam a replicação viral (Hain & Scherier, 1996). Este fenômeno é similar à regulação do anti-senso discutida posteriormente.

5.3.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE VÍRUS

Ao infectar uma planta, um vírus geralmente prolifera nas células infectadas e então se dissemina de forma sistêmica no organismo inteiro. O ácido nucléico do vírus é transportado por uma proteína de transporte codificada pelo vírus e, via plasmodesmos, espalha-se por toda a planta. Assim sendo, estratégias que visem interferir no processo de transporte dos ácidos nucléicos virais têm despertado a atenção dos pesquisadores. Para conseguir resistência ao vírus duas abordagens têm sido empregadas: a primeira, visa a interrupção da expressão da proteína de transporte (via RNA anti-senso, por exemplo); a segunda, tem por objetivo a modificação da proteína de transporte (via mutagênese sítio dirigida) de forma que ela se ligue ao

ácido nucléico viral, mas não seja capaz de transportá-lo. Assim, a expressão constitutiva de uma proteína de transporte modificada na planta competirá com a proteína natural sintetizada pelo vírus de forma a evitar a disseminação sistêmica do vírus (Lapidot *et al.* 1993; Malyshenko *et al.*, 1993). Resultados interessantes foram observados por Beachy *et al.* (1990) ao expressarem uma proteína de transporte modificada. Contrariamente ao esperado, os autores mostraram que a expressão constitutiva de uma proteína de transporte modificada facilitou a disseminação do vírus nas plantas. Entretanto, quando as proteínas de transporte foram apropriadamente modificadas e expressas em plantas transgênicas (Beck *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995), a disseminação local e sistêmica do vírus foi impedida, além de conferir resistência a espécies aparentadas ao vírus. Além disso, também foi verificada resistência a espécies não aparentadas, o que significa que muitas proteínas de transporte viral devem ter uma porção comum, apesar das diferenças nas seqüências de aminoácidos.

5.3.3 INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL POR ANTI-SENSO

Nas estratégias descritas acima, as proteínas que interrompem o processo de replicação viral foram formadas pela expressão de genes que foram introduzidos em plantas. Mas, a engenharia genética também dispõe de mecanismos que podem suprimir a expressão de certos genes vegetais ou mesmo virais, interferindo no processo de infecção. A facilidade de inativar genes de plantas foi demonstrada em várias situações, dentre as quais convêm ressaltar a alteração na pigmentação floral (Van der Krol *et al.*, 1988), e no processo de maturação do tomate (Sheehy *et al.*, 1988). A técnica é relativamente simples: o gene a ser suprimido é clonado no sentido contrário e colocado sob o controle de um promotor forte. Em seguida, é reintroduzido na célula e expresso na forma de um RNA anti-senso. Isso faz com que a quantidade de produto anti-senso seja suficiente para a reduzir a expressão de um gene apropriado, via formação de mRNAs de fita dupla devido à complementariedade das seqüências. A propriedade da tecnologia anti-senso para inativar a replicação viral e a disseminação do vírus têm sido testadas em vários sistemas planta/vírus. Os resultados são geralmente menos expressivos do que aqueles obtidos com expressão de proteína viral, com exceção feita ao efeito de genes anti-senso contra viroses que proliferam não no citoplasma, mas no núcleo de células vegetais (Bejarano & Lichtenstein, 1992). Para alguns, a utilização de várias estratégias de controle para um mesmo vírus em uma única planta pode prevenir contra o aparecimento de resistência viral, para outros, entretanto, é possível que plantas transgênicas cuja resistência a vírus foi conseguida por moléculas de RNA como anti-senso e ribozimas, que não são traduzidas em proteínas, terão um particular favorecimento quando for avaliada a sua segurança.

5.3.4 RIBOZIMAS

Por muitos anos, acreditou-se que a catálise de reações químicas nos sistemas biológicos fossem atribuídas somente a proteínas, embora tenha sido questionado – particularmente por pesquisadores especializados em evolução molecular – que o RNA, a mais velha molécula biológica ativa, devesse também ser capaz de tal tarefa. Como as proteínas, várias espécies de RNA são capazes de formar estruturas secundárias e terciárias estáveis, podendo sofrer alterações na conformação. Desta

forma, os substratos podem ser especificamente ligados e os estágios de transição das reações químicas podem ser estabilizados. Reações metabólicas catalisadas com ajuda de RNA têm atualmente recebido grande atenção por parte dos pesquisadores. Dentre os RNAs cataliticamente ativos, as enzimas de RNA (ribozimas) são vistas com potencial particular para aplicações na biologia molecular. Como endonucleases específicas elas catalisam a clivagem de RNA (Cech, 1987). Assim sendo, pode-se supor que as ribozimas sejam usadas para clivar produtos gênicos primários, como os mRNAs, e então suprimir a expressão de um gene. Os primeiros estudos empregando esta estratégia contra vírus de RNA de fita simples foram bastante promissores (Steinecke *et al.*, 1992), inclusive em plantas de tabaco transgênico (Wegener *et al.*, 1994).

5.3.5 RNA SATÉLITE

Em muitas doenças virais e plantas, as moléculas de RNA estão associadas a "satélites", cuja presença está relacionada à atenuação dos sintomas da doença. Estes satélites são pequenas moléculas de RNA que se replicam com o vírus e são empacotadas nas partículas virais. A base molecular da atenuação dos sintomas ainda é desconhecida. Estudos têm sido conduzidos para introduzir genes que induzam a produção desses satélites em plantas, mas os resultados são contraditórios (Harrison *et al.*, 1987).

5.3.6 ASPECTOS DE SEGURANÇA

A engenharia genética aplicada ao desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a vírus é uma das ferramentas mais promissoras no sentido de reduzir significativamente as perdas da produção provocadas por doenças virais. Entretanto, como em outras situações os aspectos de segurança devem ser considerados. As principais preocupações são com encapsulação heteróloga, expansão da gama de hospedeiro, possibilidade de recombinação do vírus e emergência de novas doenças. Resultados mostraram que o genoma viral proliferando em células hospedeiras com presença de outros vírus freqüentemente são encapsidados com proteínas provenientes de outros vírus (encapsulação heteróloga ou transencapsulação), criando vírus híbridos. Com a nova capa protéica, o genoma viral pode adquirir novas propriedades que influenciem sua capacidade de proliferação. Geralmente a capa protéica determina que a transferência do vírus seja realizada por um vetor, geralmente um inseto. Assim, o vírus que antes era transmitido mecanicamente, passa a necessitar da presença do vetor (um inseto ou fungo). Desta forma, a gama de hospedeiro ou sua distribuição geográfica pode ser alterada. Entretanto, a transencapsulação é um fenômeno que ocorre independentemente da engenharia genética e, portanto, tem sido considerado como um processo natural. Os genomas virais encapsidados com outras proteínas são encontrados após infecções mistas e podem ser transferidos por um novo vetor (Bourdin & Lecoq, 1991). A transencapsulação como resultado de mistura de infecção é rara. A heteroencapsulação em uma planta transgênica que sintetize uma capa protéica, provavelmente não traria conseqüências negativas: após deixar o novo vetor e infectar um novo hospedeiro, o genoma viral perde sua capa protéica e as novas propriedades que esta capa confere. Então, a transencapsulação não teria sérias conseqüências, pois em um campo de plantas transgênicas em que uma capa protéica confere proteção contra outros vírus, os efeitos adversos seriam transientes. O vírus encapsulado requer constante reposição de sua população de plantas transgênicas.

Uma vez que é removido, o "novo" vírus é eliminado junto com a possibilidade de efeitos adversos. Além disso, estratégias que objetivem evitar este problema podem ser identificadas. Ao contrário da expressão completa de um gene de capa protéica em uma planta transgênica, pode-se pensar em expressar variantes desse gene cujo produto da proteína formada não possa ser transferido por um vetor. Recentes pesquisas procuram produzir transgenes que produzam apenas fragmentos da capa protéica, mas que ainda possuam proteção contra a doença viral. Os trabalhos nesta segunda geração de estratégias antivirais é intensos e a descoberta de um inibidor de polimerase de um vírus de animal são bastante animadora (Digard *et al.*, 1995).

Um outro aspecto que deve ser considerado é que um RNA viral pode trocar o material genético com o mRNA do gene de defesa antiviral, criando então, novas propriedades que podem ser desfavoráveis à planta hospedeira. Apesar da possibilidade de alterações genéticas deste tipo não serem conhecidas, a controvérsia sobre os riscos e benefícios da resistência a vírus tem sido discutida (Falk & Bruening, 1994; Green & Allison, 1994). Os resultados mais promissores deste campo têm sido obtidos a partir de estudos em que várias estratégias para evitar o desenvolvimento de resistência do patógeno foram combinadas para conferir à planta, ampla reistência ao vírus (Hain & Scherier, 1996).

5.4 RESISTÊNCIA A DOENÇAS

Estima-se atualmente que cerca de 24% da produção agrícola mundial sejam perdidas devido às doenças. Os atuais métodos de proteção agrícola permanecem concentrados no uso de agroquímicos, entretanto, a necessidade do desenvolvimento de uma agricultura mais "amigável", com menor consumo de energia, menor contaminação dos aplicadores e dos mananciais hídricos, baixos efeitos residuais nos alimentos etc., tem proporcionado a busca de novas tecnologias para a obtenção de resistência às doenças.

Além dos métodos de controle de doenças tradicionais, como o uso de agroquímicos, manejo adequado com rotação de culturas, e melhoramento buscando variedades resistentes, a biotecnologia tem fornecido novas ferramentas para proteção de plantas contra patógenos. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo a interação planta-patógeno são considerados essenciais para a utilização das técnicas de engenharia genética. Assim, os estudos sobre os mecanismos de resistência foram intensamente realizados nos últimos anos, permitindo um rápido avanço nos conhecimentos nesta área (para uma revisão, veja Jackson & Taylor, 1996). As modernas técnicas de melhoramento genético para resistência a doenças não são apenas uma forma de reduzir o tempo nos programas de melhoramento, mas principalmente pelas inúmeras abordagens possíveis no desenvolvimento de variedades resistentes. Um outro aspecto importante é conhecer as vias moleculares que controlam os mecanismos de resistência das plantas para explorá-las com o objetivo de controlar o patógeno. O mecanismo de resistência pode muitas vezes ser induzido de forma que o potencial de resistência natural da planta seja ativado, tanto por uma infecção primária com o patógeno, quanto pela inoculação com microrganismos não patogênicos (Maurhofer *et al.*, 1994). Além disso, os mecanismos de resistência podem ser ativados com o uso de indutores — ingredientes ativos que conferem resistência em plantas.

As monoculturas são particularmente vulneráveis ao aparecimento de raças virulentas de patógenos e, conseqüentemente, surgem as doenças que resultam em severas perdas agrícolas. Para controlar as epidemias, o material cultivado é geralmente substituído a intervalos variáveis (3 a 5 anos por exemplo) por novas cultivares que apresentem locos adicionais para resistência (Rommens *et al.*, 1995). A demanda por novos locos de resistência requer um contínuo esforço por parte dos melhoristas no sentido de identificar e caracterizar germoplasma resistente. Infelizmente, os locos para resistência a doenças são, na maioria das vezes, transferidos somente entre cultivares sexualmente compatíveis. Um outro aspecto relevante é que o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças pode levar mais de uma década a partir dos cruzamentos, seguidos de seleção (Agrios, 1988).

5.4.1 A INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

Na verdade, milhares de microrganismos são conhecidos como causadores de doenças em plantas. Para colonizar um determinado hospedeiro, um microrganismo precisa desenvolver um sistema capaz de escapar das barreiras utilizadas pelas plantas para prevenir a infecção. Uma vez rompidas as barreiras, as plantas necessitam desenvolver outras medidas para bloquear a invasão do patógeno. Depois desta nova resposta de resistência por parte da planta, o patógeno precisa utilizar um outro mecanismo capaz de restaurar a virulência. Trata-se de um processo extremamente dinâmico ao longo da evolução, que resultou em estratégias extremamente originais de defesa e ataque entre as plantas e os patógenos (Jackson & Taylor, 1996).

As reações de defesa das plantas contra patógenos podem ser caracterizadas como passiva ou ativa. Assim, a penetração de um fungo nos tecidos de uma planta é freqüentemente prevenida por mecanismos de proteção passivos, como presença de espessa parede celular, cutícula ou agentes químicos. Vários processos são observados quando um patógeno, como um fungo por exemplo, entra em contato com uma planta. As primeiras reações de defesa resultam na limitação da área do tecido atacada. A reação de hipersensibilidade (RH) produz uma lesão local visível causada pela "morte programada das células" ou apoptose. A ativação deste mecanismo é entretanto pouco conhecida. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* mostraram que a expressão de genes de resistência e a formação de necroses ocorrem espontaneamente na ausência do patógeno (Dietrich *et al.*, 1994). Esses mutantes podem fornecer importantes informações para a compreensão das bases moleculares da RH e dos mecanismos de resistência em geral. Além da morte celular local, o sítio de infecção freqüentemente apresenta um número de células com alterações na parede celular que servem de barreira física para a disseminação do patógeno. Dentre essas barreiras, pode-se citar a formação de calose (β-1,3-glucanase), depósitos de cutina e reforço da parede celular por lignificação (Vance *et al.*, 1980). O acúmulo e a ligação de proteínas da parede celular, principalmente as glicoproteínas, que são ricas em hidroxi-prolinas, têm sido observados em combinação com aumento da expressão de peroxidases (Showalter *et al.*, 1985; Brandley *et al.*, 1992). Finalmente, as reações locais são suplementadas pela síntese, nas células em torno da lesão, de substâncias conhecidas como fitoalexinas, que exercem atividade antimicrobiana (Dixon, 1986; Ebel, 1986). Interessantemente, as reações locais também são induzidas por lesões mecânicas e pelo tratamento com

os então chamados elicitores (indutores). Elicitores típicos são componentes (moléculas) do patógeno que são excretados pelo patógeno ou eliminados pela parede celular.

Além dos rápidos mecanismos de defesa que dificultam a penetração e o desenvolvimento do patógeno, algumas partes da planta, infectadas ou não, respondem à infecção através do desenvolvimento de resistência a prévias infecções por vírus, bactérias ou fungos. A existência dessa resistência não específica, cuja base molecular ainda não está totalmente decifrada, é chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR) (Ryals *et al.*, 1996).

A partir da relação planta/patógeno, deve-se ressaltar que todas as espécies de plantas são resistentes à maioria dos patógenos (resistência básica), ou seja, a suscetibilidade de uma planta e a virulência de um patógeno são consideradas exceções. Apenas poucos patógenos conseguem desenvolver mecanismos que tornam compatíveis as interações com certas plantas, dando origem à doença. Esses mecanismos permitem a penetração e a colonização do tecido hospedeiro, de forma que eles suprimem ou retardam o desenvolvimento de reações de defesa por parte da planta. Assim, na forma compatível de reação, onde a planta torna-se suscetível e o patógeno virulento, a penetração das hifas do fungo em camadas profundas de células é facilmente observada na forma de lesões. Na reação de incompatibilidade, ao contrário, os fungos podem penetrar apenas nas camadas superficiais e então induzem necroses no local (RH) e o acúmulo de fitoalexinas (Hain & Schreier, 1996).

As bases genética das interações patógeno/hospedeiro foram explicadas pela hipótese gene-a-gene, na década de 40 (Flor, 1946). Estudos genéticos do sistema patológico da ferrugem (*Melampsora lini*) em plantas *Linum usitatissimum*, mostraram que as interações planta/fungo eram determinadas por um par complementar de genes: um gene de resistência (*R*) no hospedeiro e um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno. Uma variedade de planta hospedeira só é resistente se for infectada por uma espécie de patógeno que contém o gene de avirulência complementar. Essa interação gene-a-gene é na verdade uma simplificação de um processo mais complexo. Ela indica que há uma interação entre os produtos de genes de avirulência do patógeno e os produtos dos genes de resistência do hospedeiro, que resultará na resposta da planta. Nos últimos anos, alguns desses mecanismos de resistência foram explicados. Por exemplo, o gene *Cf-9* em tomate confere resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* se o fungo carregar o gene de avirulência *Avr9* (Jones *et al.*, 1994). Este mesmo gene foi inserido em plantas de tabaco e batata para verificar a expressão do gene em um outro sistema (Hammond-Kosack *et al.*, 1998). No sistema modelo *Arabidopsis thaliana/Pseudomonas syringae* esta conexão foi, nos últimos anos, extensivamente estudada (Bisgrove *et al.*, 1994; Kunkel, 1996). Embora identificados como determinantes genéticos da incompatibilidade a alguns genótipos específicos, a função dos genes de avirulência do patógeno permanecem obscuras. Os vírus de plantas são a única exceção, onde genes codificando capa protéica, replicases ou proteínas de movimento foram identificados como determinantes *Avr*. A especificidade viral do *Avr* é alterada pela substituição de aminoácidos que não comprometem de forma significativa a função da proteína na patogênese. Para outros tipos de microrganismos, este processo parece estar associado a mutações de avirulência para virulência, sugerindo que os produtos dos genes têm importante função na patogenicidade.

5.4.2 RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR)

A resistência sistêmica adquirida que, por analogia ao sistema animal, também é chamada de imunidade, refere-se a um sistema particular de transdução de sinais que exercem um papel importante na propriedade das plantas defenderem-se contra certos patógenos (Ryals *et al.*, 1996). Espe processo é caracterizado pela expressão coordenada de vários genes, chamados de SAR, cujos produtos estão relacionados à patogênese (PR) (Ward *et al.*, 1991). Sabe-se que as proteínas PR estão localizadas dentro e fora das células e que se acumulam após a indução por elicitores bióticos e abióticos, embora a função exata de muitas proteínas PR ainda não sejam conhecidas (as PR1, por exemplo, são proteínas ácidas encontradas próximas da parede celular, mas sem função conhecida). Algumas proteínas PR foram identificadas como as β-1,3-glucanases (PR2) (Kauffman *et al.*, 1987) e quitinases (PR3) (Legrand *et al.*, 1987), que degradam os polissacarídeos da parede celular dos fungos. Três classes de β-1,3-endoglucanases e cinco classes de endoquitinases de plantas foram descritas. Várias dessas enzimas inibiram o crescimento de fungos *in vitro*. Seus respectivos genes são, portanto, sérios candidatos à transformação de plantas (Leah *et al.*, 1991). Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de genes de quitinases e β-1,3-glucanases em plantas transgênicas podem promover um aumento na proteção contra patógenos. A mais importante prova da função de proteção das proteínas PR foi fornecida pelas plantas de tabaco apresentando aumento de resistência a doenças devido à expressão do gene PR-1a (Alexander *et al.*, 1993). Além da função hidrolítica das proteínas PR, foi mostrado recentemente uma função no sistema de detoxificação pela proteína PRP1-1; há evidências de que seja uma glutationa S-transferase (Hain & Scherier, 1996). No grupo PR4 agrupam-se as proteínas ácidas com ação antifúngica conhecida e que atuam em sinergismo com as PRs 2 e 3 (Caruso *et al.*, 1996). O grupo PR5 reúne as proteínas do tipo traumatinas, encontradas tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas, incluindo a osmotina do tabaco (AP24), a zeamatina do milho e as permatinas presentes em sorgo e trigo. A ação antifúngica deste grupo, ainda não foi totalmente elucidada, mas está aparentemente associada com a inibição do desenvolvimento de hifas, lise ou inibição da germinação de esporos. Experimentos recentes têm demonstrado que essas proteínas não são secretadas em níveis suficientes para proteger plantas transgências contra fungos, mas em sinergismo com quitinases, β-glucanases, e em combinação com a proteína RIP de cevada, os efeitos foram pronunciados. A função das proteínas RIPs está associada à inibição da biossíntese de proteínas por modificação da subunidade ribossomal 28S (Endo *et al.*, 1988; Leah *et al.*, 1991).

A soma de várias proteínas antifúngicas superexpressas em uma mesma planta, principalmente as PR-5 e as RIPs, representam uma importante estratégia para transformação de plantas visando resistência a doenças, uma vez que possibilita a proteção contra uma variada gama de patógenos, incluindo aqueles altamente destrutivos, que não possuem quitina em sua parede celular, como *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 1994).

Embora o sinal de tradução do SAR ainda não esteja completamente esclarecido, sabe-se que o ácido salicílico (ácido 2-hydroxybenzóico, SA) cumpre

uma importante função no desenvolvimento de SAR. O SA exógeno aumentou a resistência do tabaco ao TMV, e a injeção de SA em cotilédones de pepino induziu a resistência ao fungo *Colletotrichum lagenarium* (Mills & Wood, 1984). O acúmulo endógeno de ácido salicílico em floema de pepino foi similarmente observado após infecção com *C. lagenarium* ou com vírus da necrose do tabaco — TNV (Metraux *et al.*, 1990). Embora esses resultados confirmem a importância do SA como indutor endógeno de resistência, ele pode não ser a primeira molécula-sinal sistêmica. Na verdade, acredita-se que o SA não seja o sinal que ative a SAR em órgãos das plantas, mas ele é essencial para a transdução de sinal mediada pela SAR. Uma proteína associadas ao SA (SABP) foi isolada de folhas de tabaco em quantidades que estão correlacionadas com a indução da proteína PR1 por SA. A SABP possui uma atividade catalase que é inibida pelo ácido salicílico *in vitro* (Chen *et al.*, 1993). O fato de concentrações elevadas de H_2O_2 estimularem a expressão da PR1 em tabaco, sugere que o efeito do salicilato seja mediado pelos elevados níveis de H_2O_2. Nesta conexão é importante notar que o peróxido de hidrogênio também é requerido para aumentar a lignificação e para a ligação oxidativa das proteínas da parede celular no sítio de infecção (Bradley *et al.*, 1992).

5.4.3 FITOALEXINAS

As fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular, sintetizados e acumulados pelas plantas em resposta a uma infecção (Paxton, 1981). Elas podem ser divididas em várias classes de compostos químicos e, ao lado de terpenos e acetilenos, os principais representantes são isoflavonóides e estilbenos derivados do metabolismo geral do fenilpropano. Geralmente, um grupo de produtos naturais é encontrado em uma família de plantas, por exemplo, isoflavonóides são freqüentemente encontrados em Leguminosas, sesquiterpenos em Solanáceas, e dihidrofenaltrenos em Orchidáceas. A importância das fitoalexinas tem sido investigada em vários sistemas hospedeiro/parasita. Em soja, por exemplo, o fungo *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, induz o acúmulo de fitoalexinas do tipo isoflavonóides, principalmente glyceolina I (Ebel & Grisebach, 1988). Alguns estudos mostraram que a defesa das plantas pelas fitoalexinas é alcançada por mecanismos que tornam certos patógenos incapazes de degradar tais compostos. Assim, a patogenicidade do fungo *Nectria haematococca* em ervilha está correlacionada com sua habilidade de detoxificar a fitoalexina pisatina (Tegtmeier & Van Etten, 1982). Transformação de *Cochliobolus heterostrophus* com o gene da pisatina demetilase (*pda*) de *N. haematococca* tornou este patógeno do milho virulento em ervilhas (Schäfer *et al.*, 1989). Estas observações suportam a tese de que a tolerância a certas fitoalexinas determinam a patogenicidade. Igualmente, a faseolidina hidratase, é encontrada em *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e detoxifica o isoflavonóide faseolidina (Turbek *et al.*, 1992). Em ambos os casos, a virulência do fungo é devida a sua habilidade de inativar a fitoalexina correspondente. Isto fornece um importante ponto de partida para o melhoramento moderno de resistência a doenças. O isolamento de genes responsáveis pelas fitoalexinas, sua modificação e transferência para plantas, pode levar à produção de novos compostos, resistentes aos mecanismos de detoxificação de certos patógenos (Fischer & Hain, 1994).

A ação antibacteriana e antifúngica dos estilbenos 32S é conhecida há muitos anos. O resveratrol, o principal componente do estilbeno, é produzido pela ação da estilbeno sintase (STS). Lanz *et al.* (1990), confirmaram a presença de vários transcritos de STS em amendoim, após tratamento com vários elicitores. Hain *et al.* (1990) obtiveram sucesso na transferência de um gene quimérico STS de amendoim para tabaco. A enzima ativa (STS) e o resveratrol foram detectados nas plantas, após a indução com o elicitor Pmg do transcrito específico para STS. O efeito tóxico do resveratrol já foi observado *in vitro*: a germinação de conídios e o crescimento de hifas dos fungos *Botrytis cinerea* e *Phomopsis viticola* foram inibidos pelo resveratrol (Hoos & Blaich, 1990), e *in vivo*: houve redução de 50% da doença causada pela infecção com *B. cinerea* em plantas de tabaco transformadas com dois genes que codificam STS de videira (Hain *et al.*, 1993). Esta foi a prova experimental de que a resistência a doenças pode ser aumentada pela síntese adicional de fitoalexinas em plantas transgênicas. Uma vez que diferentes plantas podem produzir diferentes fitoalexinas, a síntese adicional de uma fitoalexina exógena amplia o repertório de defesas possíveis de uma planta em particular. Isto é particularmente interessante já que muitos patógenos concentram sua virulência em mecanismos capazes de detoxificar fitoalexinas.

Existem várias estratégias para a produção de plantas transgênicas com maior resistência a doenças. A transferência de enzimas hidrolíticas é uma delas: plantas transgênicas de tabaco e canola expressando uma endoquitinase de feijão mostraram um aumento na resistência ao fungo do solo *Rhizoctonia solani* e retardaram o aparecimento de sintomas (Broglie *et al.*,1991). O gene de uma quitinase bacteriana (*Serratia marcescens*), que foi expresso em tabaco, produziu resultados similares contra o mesmo fungo (Jach *et al.*, 1992).

Os genes de resistência (R) geralmente são encontrados em parentes silvestres ou espécies relacionadas de plantas cultivadas, servindo como fontes de extrema importância em programas de melhoramento, seja ele convencional ou baseado em técnicas moleculares. O isolamento desses genes possibilita sua introdução e expressão em plantas sexualmente incompatíveis, embora o limite de funcionamento desses genes em outros grupos taxonômicos ainda permaneça desconhecido. Entretanto, as pesquisas em desenvolvimento reforçam a necessidade de se conhecer melhor os aspectos moleculares da interação planta-patógeno, além das vias de sinalização que levam aos mecanismos de resistência por parte das plantas.

5.5 RESITÊNCIA A NEMATÓIDES

Os nematóides constituem uma das principais pragas da produção agrícola de diversas culturas em regiões tropicais e subtropicais. Os prejuízos são da ordem de bilhões de dólares anuais, pois geralmente o controle químico é ineficaz ou extremamente perigoso ao meio ambiente. O prejuízo causado pelo nematóide deve-se à sua penetração, seguida por alimentação, em diversas pates da planta como raízes, caules e folhas. As formas infectivas da praga são móveis dentro da planta, ocasionando lesões no xilema e floema ou nos espaços intercelulares, entre as células corticais. Os maiores danos são causados por formas endoparasíticas e sedentárias, como as pertencentes aos gêneros *Meloidogyne, Globodera* e *Heterodera* (Goddijn *et*

al., 1993). Os atuais métodos de controle são: uso de cultivares resistentes, nematicidas e rotação de cultura (Gurr *et al.*, 1991).

O ciclo de vida dos nematóides varia conforme o gênero, mas normalmente é possível distinguir quatro estágios juvenis, em cuja transição normalmente há substituição da cutícula. Após a emergência dos ovos (segundo estágio), o nematóide busca a raiz de um hospedeiro, penetra e migra até uma célula apropriada, que é induzida a formar um nicho permanente de alimentação para garantir sua permanência até o momento de se tornar adulto (Williamson & Hussey, 1996). As células alimentadoras geralmente apresentam-se atrofiadas, com citoplasma denso, maior número de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, menor vacúolo, espessamento e invaginações da parede celular. Estas células podem se desenvolver em um cisto, também chamado sincício (comum em *Heterodera* spp. ou *Globodera* spp.) ou em uma galha (*Meloidogyne* spp.).

Plantas são consideradas resistentes aos nematóides quando elas apresentam baixos níveis de reprodução destes parasitas. A busca de fontes de genes de resistência para o melhoramento convencional não resulta em avanços significativos, já que o cruzamento com espécies não aparentadas é praticamente impossível, restringindo a busca às espécies silvestres das plantas cultivadas. Os genes de resistência já identificados são específicos para determinados tipos de nematóides, impedindo uma maior abrangência do campo de ação (Williamson & Hussey, 1996).

Para a utilização de plantas transgênicas resistentes a nematóides, algumas estratégias têm sido propostas. Uma delas consiste em expressar na planta algum gene que codifique alguma proteína letal ao nematóide. Os nematóides necessitam de células vivas intactas para se alimentar e se reproduzir. A estratégia de resistência sugere que as plantas transgênicas devam possuir um mecanismo de acionamento de proteínas de defesa, apenas após a invasão pelo nematóide, levando à sua morte programada, que seria provocada pela necrose dos tecidos adjacentes ao seu local de infeção, levando-o à morte por inanição. Sistemas deste tipo e com diferentes detalhes, têm sido estudados por diversas companhias (PGS, Mongen, AGS, ATC). Até o presente, não existem dados de campo com eficácia do gene *Bt* contra nematóides. Nesta linha existem os inibidores de proteinases, mais especificamente aqueles que inibem proteinases do tipo cisteína, que podem também ser utilizados na busca de resistência a insetos, como é o caso das cistatinas, ou ainda as toxinas e as colagenases (Williamson & Hussey, 1996). Uma outra possibilidade consiste em utilizar genes que codifiquem proteínas bloqueadoras do desenvolvimento das células alimentadoras dos nematóides, que poderiam ser fitotoxinas. O gene para uma substância tóxica à célula vegetal a ser invadida deve ser dirigido por um promotor altamente tecido-específico, que se expresse apenas em células de raiz, mais precisamente nas células alimentadoras dos nematóides, impedindo assim a destruição das outras células vegetais pela ação das fitotoxinas. Uma outra seqüênca de regulação deve ser incluída para que haja indução do gene apenas após a lesão pelo nematóide. O dano provocado deve iniciar um processo de morte celular. Os fatores críticos à esta estratégia são: a) o gene programado para provocar a morte da célula deve ser ativado apenas no local atacado, não podendo apresentar nenhuma ação sistêmica; b) o nível basal da expressão do gene deve ser baixo o suficiente

para não afetar o crescimento e a produção da planta. Alguns trabalhos já têm demonstrado, entretanto, que nem sempre um promotor eficiente para raízes, o é para as células alimentadoras (Goddijn *et al.*, 1993). O número de promotores com essas características, ou seja, com ativação apenas em situação de infeção e com ação sítio-dirigida, ainda é muito baixo (Sijmons, 1993). Taylor *et al.* (1992) caracterizaram um promotor raiz-específico (*Tob*RB7) que regula a expressão de um gene cuja proteína do canal de membrana (Yamamoto *et al.*,1990) apresenta alta expressão em células gigantes (alimentadoras).

Várias metodologias têm sido propostas para identificar esses promotores específicos. Uma delas consiste em inserir ao acaso, no genoma vegetal, um gene repórter sem promotor *promoter tagging*, e depois analisar a expressão deste gene nos locais de alimentação do nematóide, identificando promotores nas seqüências adjacentes. Outra possibilidade é a ativação de um promotor truncado inativo, por seqüências ativadoras proximais *enhancer trapping* (Lindsey *et al.*, 1993). As estratégias de identificação desses promotores induzidos são interessantes, não apenas para os genes de resistência a nematóides, mas para uma ampla gama de genes de resistência que já foram anteriormente discutidos.

5.6 RESISTÊNCIA A ACIDEZ DO SOLO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO

Dentre os problemas agronômicos mais comuns das regiões tropicais, provavelmente o mais importante é a acidez do solo. Os solos ácidos compreendem cerca de 3,95 bilhões de hectares de terras livres de gelo, ou aproximadamente 40% da terra cultivável. Aproximadamente 43% da área tropical do mundo é classificada como ácida, compreendendo cerca de 68% da América tropical, 38% da Ásia tropical e 27% da África tropical. As baixas produtividades agrícolas e a diminuição da fertilidade dos solos são causados, principalmente pela combinação de toxidez por alumínio e por manganês e pela deficiência de nutrientes (principalmente P, Ca, Mg e K). A maioria das cultivares de milho, sorgo e arroz utilizadas na agricultura é suscetível ao alumínio tóxico do solo, que provoca redução de até 80% na produção. Está provado que a maioria das espécies de plantas exibe significativa variabilidade genética em sua tolerância ao alumínio, mas ainda não são conhecidas as bases moleculares envolvidas no processo de resistência. Duas estratégias básicas da planta têm sido propostas: a) capacidade de excluir o Al que penetra nas raízes; b) desenvolver mecanismos que permitam a planta tolerar concentrações tóxicas do Al dentro das células (Herrera-Estrella, 1999).

Vária hipóteses têm sido propostas para explicar como as plantas excluem o Al de dentro de suas raízes. Mecanismos baseados na alteração do pH da rizosfera, diminuição da capacidade de troca catiônica da parede celular, ou refluxo de Al^{+3} através da membrana plasmática (Kochian, 1995). Vários grupos de pesquisa sustentam que o mecanismo de exclusão do Al da raiz dá-se através de ligações deste com ácidos málico ou cítrico, que quelatam o Al^{+3} e impedem sua entrada na raiz. A existência de mecanismos de tolerância ao Al baseados na excreção de ácidos orgânicos (malato e citratos, por ex.) já foram reportados para uma série de espécies de importância (trigo, milho, feijão).

O uso da biotecnologia poderá facilitar a conversão de solos de baixa produtividade em áreas viáveis. A produção de plantas transgênicas tolerantes ao alumínio deve ser considerada uma peça importante nas estratégias de manejo para aumentar a produção agrícola de solos ácidos e para proteger florestas localizadas ao longo de regiões fortemente industrializadas. A geração de plantas tolerantes a metais através de engenharia genética tem-se mostrado viável. A produção de plantas transgênicas com capacidade de produzir ou aumentar a produção de ácidos orgânicos que quelatam ou detoxificam Al na rizosfera é uma grande estratégia para produzir plantas tolerantes ao Al. O ácido cítrico forma um forte quelato com o Al^{+3} que é cerca de 700 vezes mais forte que o valor correspondente ao complexo malato-Al (Suhayada & Haug, 1986). Assim, a superprodução de citrato parece ser o candidato ideal para produzir uma planta tolerante ao Al. Para testar se uma superprodução de citrato é possível em plantas transgênicas e para avaliar o impacto desses níveis sobre a tolerância ao Al, De la Fuente *et al.* (1997) produziram plantas transgênicas de tabaco que superexpressam a citrato sintase de *Pseudomonas aeruginosa* em seu citoplasma. Para produzir estas plantas, um gene quimérico em que a seqüência codante do gene da citrato sintase do *P. aeruginosa* foi transcricionalmente fusionado ao promotor 35S do CaMV, foi introduzido no genoma de plantas de tabaco. Análises bioquímicas dessas plantas mostraram que a maioria delas tinha seus níveis de citrato sintase elevados e tinha dez vezes mais citrato em suas raízes e expelia cinco vezes mais esse ácido orgânico em sua rizosfera. A inibição do cresimento de raízes por concentrações fitotóxicas de Al foi significativamente menor nas plantas com superprodução de citrato sintase do que nas linhagens controle. Para determinar se esta mesma estratégia poderia ser utilizada em outras espécies, esse mesmo gene quimérico foi utilizado para transformar mamão, espécie que tem sua produção limitada quando cultvada em solos com alta concentração de Al. As plantas transgênicas expressando a enzima bacteriana desenvolveram raízes a uma concentração de mais de 150 mM de Al, enquanto o controle não produziu raízes em concentrações acima de 50 mM (De la Fuente *et al.*, 1997).

A produção de plantas tolerantes ao Al é apenas um exemplo do que a biotecnologia pode fazer para melhorar a produtividade em solos ácidos ou tóxicos. Plantas tolerantes a drogas ou plantas que tenham capacidade de absorver nutrientes presentes no solo em orma não disponível, são exemplos entre outros, do que pode ser produzido pela engenharia genética, e que pode elevar significativamente a produtividade (Herrera-Estrella, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANG, M.J.; BRODY, M.S. CARDINEAU, G. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. **Plant Molecular Biology**, v.21, p.1131-1145, 1993.

ADANG, M.J.; STAVER, M.J.; ROCHELEAU, T.A; LEIGHTON, J.; BARKER, R.F.; THOMPSON, D.V. Characterized full length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity on *Manduca sexta*. **Gene**, v.36, p.289-300, 1985.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3.ed. London: Academic Press, 1988.

ALEXANDER, D.; GOODMAN, R.M.; GUT-RELLA, M.; GLASCOCK, C.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOY, D.; AHL-GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E.; RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expression pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.7327-7331, 1993.

ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.I.; PRIETO, D.; TELLEZ, P.; CARMONA, ER.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plantas resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v.3, p.247-255, 1997.

BARTON, K.A.; WHITELY, H.R.; YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p.1103-1109, 1987.

BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N.E. Coat protein-mediated resistance against virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.451, 1990.

BECK, D.L.; DOLLEWEERD, C.J.; LOUGH, T.J.; BALMORI, E.; VOOT, D.M.; ANDERSEN, M.T.; O'BRIEN, I.E.W.; FORSTER, R.L.S. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America SA**, v.91, p.10310-10314, 1994.

BECKER, D.; BRETTSCHNEIDER, R.; LÖRZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **The Plant Journal**, v.5, p.299-307, 1994.

BEJARANO, E.R.; LICHTENSTEIN, C.P. Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA. **Tibtech**, v.10, p.318-328, 1992.

BEVERSDORF, W.D.; WEISS-LERMAN, J.; ERICKSON, L.R.; SOUZA-MACHADO, V. Transfer of cytoplasmatically-inherited triazine resistance from birds rape to cultivated *Brassica campestris* and *Brassica napus*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.22, p.167-172, 1980.

BISGROVE, S.R.; SIMONICH, M.T.; SMITH, N.M.; SATTLER, A.; INNES, R.W. A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes. **Plant Cell**, v.6, p.927-933, 1994.

BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engeneered crops. **Phytochemistry**, v.34, p.1453-1466, 1993.

BOULTER, D.; EDWARDS, G.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A. Additive protective effects of different plant-derived insect resistance genes in tobacco plants. **Crop Protection**, v.9, p.351-354, 1990.

BOURDIN, D.; LECOQ, H. Evidence that heteroencapsidation between two polyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. **Phytopathology**, v.81, p.1459-1464, 1991.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v.2, p.409-416, 1992.

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, Helicoverpa armigera, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p.625-638, 1997.

BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linkink of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. **Cell**, v.70, p.21-30, 1992.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA,SPI; EMBRAPA,CNPH, 1999. 354p.

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p.827-833, 1986.

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Insect Physiology**, v.41, p.107-116, 1995.

BROGLIE, K.; CHET, I.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWTON, S.; MAUVAIS, C.J.; BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, v.254, p.1194-1197, 1991.

CARLTON, B.C.; GAWRON-BURKE, C.; JOHNSON, T.B. Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new bioinsecticides. In: INTERNATIONAL COLLOQUIM ON INVERTEBRATE PATHO-LOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., Adelaide, 1990. **Proceedings**. Adelaide: Society for Invertebrate Pathology, 1990.

CARUSO, C.; CAPORALE, C.; CHILOSI, G.; VACCA, F.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; POERIO, E.; BUONOCORE, V. Structural and antifungal properties of a pathogenesis related protein from wheat kernel. **Journal of Protein Chemistry**, v.15, p.35-44, 1996.

CECH, T.R. The chemistry of self-cleaving RNA and RNA enzymes. **Science**, v.231, p.1532, 1987.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSING, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v.262, p.1883-1886, 1993.

CHEUNG, A.Y.; BOGORAD, L.; VAN MONTAGUE, M.; SCHELL, J. Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.391-395, 1988.

CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSEDELBART, F.; TEMPÉ, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. **Nature**, v.295, p. 432-434, 1982.

CHRISTOU, P.; FORD, T.L.; KOFRON, M. The development of a variety-independent gene-transfer method for rice. **Trends in Biotechnology**, v.10, p.239-246, 1992.

CHRISTOU, P.; MACCABE, D.E.; SWAIN, W.F Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. **Plant Physiology**, v.87, p.671-674, 1988.

CHRISTOU, P; FORD, TL; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric-discharge particle-acceleration of exogenous dna into immature zygotic embryos. **Bio/Technology**, v.9, p.957-962, 1991.

COMAI, L.D.; FACIOTTI, D.; HIATT, W.R.; THOMPSON, G.; ROSE, R.E. Expression in plants of a mutant aroA gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. **Nature**, v.317, p.741-744, 1985.

COOPER, B.; LAPIDOT, M.; HEICK, J.A.; DODDS, J.A.; BEACHY, R. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. **Virology**, v.206, p.307-313, 1995.

CORBIN, D.R.; GREENPLACE, J.T.; WONG, E.Y.; PURCELL, J.P. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4239-4244, 1994.

CORNU, D.; LEPLÉ, J.C.; BONADÉ-BOTTINO,M.; ROSS, A.; AUGUSTIN, S.; DELPLANQUE, A.; JOUANIN, L.; PILATE, G. Expression of a proteinase inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin in transgenic poplars. In: AHUJA, M.R.; BOERJAN, W.; NEALE, D.B. (Ed.) **Somatic cell genetics and molecular genetics of trees**; proceedings. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p.131-136.

CRICKMORE, N.; NICHOLLS, C.; EARP, D.J.; HODGMAN, T.C.; ELLAR, D.J. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal delta endotoxin combinations. **Biochemical Journal**, v.270, p. 133-136, 1990.

CROSSWAY, A.; OAKES, J.V.; IRVINE, J.M.; WARD, B.; KNAUF, V.C; SHEWMAKER, C.K. Integration of foreign DNA following microinjection into tobaco mesophyll protoplasts. **Molecular and General Genetics**, v.203, p.179-185, 1986.

DE GREEF, W.; DELON, R.; DE BLOCK, M; LEEMANS, J.; BOTTERMAN, J. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. **Bio/Technology**, v.7, p.61-64, 1989.

DE LA FUENTE, J.M.; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v.276, p.1566-1568, 1997.

DELÚ FILHO, N.; CASCARDO, J.C.M.; FONTES, E.P.B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA,SPI; EMBRAPA,CNPH, 1999. 354p.

DENNIS, M.S.; LAZARUS, R.A. Kunitz domain inhibitor of tissue factor-factor VIIa: I. Potent inhibitor selected from libraries by phage-display. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.22129-22136, 1994.

DIETRICH, A.R.; DELANEY, T.P.; UKNES, S.J.; WARD, E.R.; RYALS, J.A.; DANGL, J.L. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. **Cell**, v.77, p.565-577, 1994.

DIGARD, P.; WILLIAMS, K.P.; HENSLEY, P.; BROOKS, I.S.; DAHL, C.E.; COEN, D.M. Specific-inhibition of herpes-simplex virus-DNA polymerase by helic peptides corresponding to the subunit interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.1456-1460, 1995.

DIXON, R.A. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. **Biological Review**, v.61, p.239-291, 1986.

DONAVAN, W.P.; DANKOCSIK, C.C.; GILBERT, M.P. Molecular characterization of a gene encoding a 72 kilodalton mosquito toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.4732-4738, 1988.

DONN, G.; TISCHER, E.; SMITH, J.A.; GOODMAN, H.M. Herbicide resistant alfafa cells: an exemple of gene amplification in plants. **Journal of Molecular Applied Genetics**, v.2, p.621-635, 1984.

EBEL, J.; GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: a molecular analysis. **Trends in Biochemical Sciences**, v.13, p.23-27, 1988.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.235-264, 1986.

EISEMANN, C.H.; DONALDSON, R.A.; PEARSON, R.D; CADOGAN, L.C.; VUOCOLO, T.; TELLAM, R.L. Larvacidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p.1-10, 1994.

ENDO, Y.; TSURUGI, K.; EBERT, R.F. The mechanism of action of barley toxin: a type 1 ribosome-inactivating protein with RNA N-glycosidase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.954, p.224-226, 1988.

ENRIQUEZ-OBREGÓN, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PIETRO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206, p.20-27, 1998.

FACCIOTTI, MT; BERTAIN, PB; YUAN L. Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thiosterase. **Nature Biotechnology**, v.17, p.593-597, 1999.

FALK, B.W.; BRUENING, G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? **Science**, v.263, p.1395-1396, 1994.

FARRAR, R.R.; KENNEDY, G.G. Growth inhibitors in host plant resistance to insects: examples from a wild tomato with *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomologycal Science**, v.25, p.46-56, 1990.

FEDTKE, C. Deamination of metribuzin in tolerant and susceptible soybean (*Glycine max*) cultivars. **Pesticide Science**, v.31, p.175-183, 1991.

FISCHER, R.; HAIN, R. Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins. **Current Opinion in Biotechnology**, v.5, p.125-130, 1994.

FISCHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MAR-RONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v.5, p.807-813, 1987.

FLOR, H.H. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Journal of Agricultural Research**, v.73, p.335-357, 1946.

FRASER, R.S.S. Genetics of plant resistence to viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.291, 1990.

FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J. Inheritance and expression of chimaeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, v.8, p.833-839, 1990.

FUGIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v.11, p.1151-1155,1993.

GARCIA OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMES, R.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and amylases. In: MIFLIN, B.J. (Ed.) **Oxford surveys of plant molecular and cell biology**. Oxford: University Press, 1987. p.275-334.

GIELEN, J.J.L.; DE HAAN, P.; KOOL, A.J.; PETERS, D.; VAN GRINSVEN, M.Q.J.M.; GOLDBACH, R.W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative strand RNA virus. **Bio/Technology**, v.9, p.1363-1367, 1991.

GLASER, V.P. Researchers tackle herbicide resistance. **Bio/Technology**, v.1, p.826-827, 1983.

GODDIJN, O.J.M.; LINDSEY, K.; VAN DER LEE, F.M.; KLAP, J.C.; SIJMONS, P.C. Diferential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-*gus*A fusion constructs. **The Plant Journal**, v.4, p.863-873, 1993.

GOULD J, DEVEY M, HASEGAWA O, ULIAN EC, PETERSON G, SMITH RH. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. **Plant Physiology**, v.95, p.426-434, 1991.

GREEN, A.E.; ALLISON, R.F. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. **Science**, v.263, p.1423-1425, 1994.

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p.776-777, 1972.

GROSSI DE SÁ, M.F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMEN, K.; CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean α-amylase inhibitor that inhibits the α-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v.203, p.295-303, 1997.

GURR, S.J.; MCPHERSON, M.J.; SCOLLAN, C.; ATKINSON, H.J.; BOWLES, D.J. Gene expression in nematode-infected plant roots. **Molecular and General Genetics**, v.226, p.361-366, 1991.

HAIN, R.; SCHREIER, P.H. Genetic engineering in crop protection: opportunities, risks, and controversies. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v.49, p.25-119, 1996.

HAIN, R.; BIESELER, B.; KINDL, H.; SCHRÖDER, G.; STÖCKER, R.H. Expression of a stilbene synthase in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. **Plant Molecular Biology**, v.15, p.325-335, 1990.

HAIN, R.; REIF, H.J.; KRAUSE, E.; LANGEBARTELS, R.; KINDL, H.; VORNAN, B.; WIESE, W.; SCHMELZER, E.; SCHREIER, P.H.; STÖCKER, R.H.; STENZEL, K. Disease resistance results from foreign phytoalezins expression in a novel plant. **Nature**, v.361, p.153-156, 1993.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; TANG, S.; HARRISON, K.; JONES, J.D.G. The tobacco *Cf-9* disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product Avr9. **The Plant Cell**, v.10, p.1251-1266, 1998.

HARPER, D.B.; HARVEY, B.M.R. Mechanisms of paraquat tolerance in perenial rye grass: II. role of superoxide dismutase, catalase and peroxidase. **Plant Cell Environment**, v.1, p.211-215, 1978.

HARRISON, B.D.; MAYO, M.A.; BAULCOMBE, D.C. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. **Nature**, v.328, p.799, 1987.

HERNALSTEENS, J.P.; VAN VLIET, F.; DE BEUCKELEER, M.; DE PICKER, A.; ENGLER, G.; LEMMERS, M.; HOLSTER, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. The *Agrobacterium tumefasciens* Ti-plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA into plant cells. **Nature**, v.287, p.654-658, 1980.

HERNSTADT, C.; GILROY, T.E.; SOBIESKI, D.A; BENNET, B.D.; GAERTNER, F.H. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran active delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. **Gene**, v.57, p.37-46, 1987.

HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.5978-5981, 1999.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, v.303, p.209-213, 983.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oriza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, p.271-282, 1994.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOUTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.333, p.160-163, 1987.

HIMENO, M. Mechanism of action of delta-endotoxin from *Bacilus thuringiensis*. **Journal of Toxicology: Toxin Review**, v.6, p.45-71, 1987.

HONEE, G.T.; VISSER, B. Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *B. thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.6240, 1988.

HOOS, G.; BLAICH, R. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. **Journal of Phytopathology**, v.129, p.102-110, 1990.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v.4, p.745-750, 1996.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α-amylase inhibitor of commun bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.79, p.309-315, 1996.

JACH, G.; LOGEMMAN, S.; WOLF, G.; OPPENHEIM, A.; CHET, I.; SCHELL, J.; LOGEMANN, J. Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection. **Biopractice**, v.1, p.33-40, 1992.

JACKSON, A.O.; TAYLOR, C.B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. **The Plant Cell**, v.8, p.1651-1668, 1996.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C.A. Expression of protease inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defence against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.9871-9875, 1989.

JONES, D.A.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; JONES, J.D. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvurum* by transposon tagging. **Science**, v.266, p.789-792, 1994.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.885-895, 1997.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Phage display of a double-headed proteinase inhibitor analysis of the binding domains of potato proteinase inhibitor II. **Molecular Breeding**, v.1, p.181-191, 1995.

JONGSMA, M.A.; WILLEM, J.; STIEKEMA, J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. **Tibtech**, v.14, p.331-333, 1996.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, p.1-11, 1998.

KAUFFMAN, S.; LEGRAND, M.; GEOFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-β-glucanase activity. **The EMBO Journal**, v.6, p.3209-3212, 1987.

KISHORE, G.M.; BARRY, G.F. **Glyphosate tolerant plants carrying a gene for a microbial glyphosate oxireductase**. s.l: s.ed.,1992. (Patent: Monsanto Corp. PCT Inc Appl. WO 9200377)

KISHORE, G.M.; SHEWMAKER,C. Biotechnology: enhancing human nutrition in developing and developed worlds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.5968-5972, 1999.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R; SANFORD, J.C. High velocity micropojectile for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, p.70-73, 1987.

KOCHIAN, L.V. Celular mecanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v.11, p.194-200, 1993.

KUNKEL, B.N. A useful weed put to work: genetic analysis of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Trends in Genetics**, v.12, p. 63-69, 1996.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. **BioScience**, v.42, p.112-122, 1992.

LANZ, T.; SCHRÖDER, G.; SCHRÖDER, J. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea*. **Planta**, v.181, p.169-175, 1990.

LAPIDOT, M.; GAFNEY, R.; DING, B.; WOLF, S.; LUCAS, J.; BEACHY, R. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. **The Plant Journal**, v.4, p.959-970, 1993.

LAWSON, C.; KANIEWSKI, HALEY, W.; ROZMAN, R.; NEWELL, C.; SAUNDERS, P.; TUMER, N.E. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic russet burbank. **Bio/Technology**, v.6, p.127, 1990.

LEAH, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, I.; MUNDY, J. Biological and molecular characterization of three anti-fungal proteins from barley seed. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.1564-1573, 1991.

LEGRAND, M.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tabacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.34, p.6750-6754, 1987.

LEPLÉ, J.C.; BONDÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Molecular Breeding**, v.1, p.319-328, 1995.

LI, K.; BUROW, M.D.; MURAI, N. High frequency generation of fertile transgenic rice plants after PEG-mediated protoplast transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, p.276-291, 1991.

LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Pathogen derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.5, p.144-153, 1992.

LINDSEY, K.; WEI, W.; CLARKE, M.C.; MCARDLE, H.F.; ROOKE, L.M.; TOPPING, J.F. Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. **Transgenic Research**, v.2, p.33-47, 1993.

LIU, D.; RAGHOTHAMA, K.G.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.1888-1892, 1994.

MACKENZIE, D.J.; TREMAINE, J.H. Transgenic nicotiana debneyii expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. **Journal of General Virology**, v.71, p.2167, 1990.

MALYSHENKO, S.I.; KONDAKOVA, O.A.; NAZAROVA, J.V.; KAPLAN, I.B. TALIANSKY, M.E.; ATABEKOV, J.G. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-funtional viral transport proteins. **Journal of General Virology**, v.74, p.1149-1156, 1993.

MARTENS, J.W.M.; HONEE, G.; ZUIDEMA, D.; VAN LENT, J.W.M.; VISSER, B.; VLAK, J. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.212-218, 1990.

MAURHOFER, M.; HASE, C.; MEUWLY, P.; METRAUX, J.P.; DEFAGO, G. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the gacA gene and of pyoverdine production. **Phytopathology**, v.84, p.139-146, 1994.

MCBRIDE, K.E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.J.; HOGAN, P.S.; STALKER, D.M.; MALIGA, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Bio/Technology**, v.15, p.362-365, 1995.

MCCLOSKEY, W.B.; HOLT, J.S. Triazine resistance in *Senecio vulgaris* parental and nearly isonuclear backcrossed biotypes is correlated with reduced productivity. **Plant Physiology**, v.92, p.954-962, 1990.

MCCOWN, B.H.; MCCABE, D.E.; RUSSEL, D.R.; ROBISON, D.J.; BARTON, K.A.; RAFFA, K.F. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by eletric discharge particle acceleration. **Plant Cell Reports**, v.9, p.590-594, 1991.

MCGAUGHEY, W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v.258, p.1451-1455, 1992.

METRAUX, J.P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v.250, p.1004-1006, 1990.

MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.4-6, 1997.

MILLS, P.R.; WOOD, R.K.S. The effects of polyacrylis acid, acetylsalicylic acid and salicylic acid on resistance of cucumber to *Coletotrichum lagenarium*. **Phytopathology Zeitschrift**, v.111, p.209-216, 1984.

MILNE, R.; KAPLAN, H. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumigerana*) resposible for the activationof delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.23, p.663-673, 1993.

NEGRITIU, I.; SHILLITO, R.D.; POTRYKUS, I.; BISASINI, G.; SALA, F. Hybrid genes in the analysis of transformation condictions: I. Setting up a single method for direct gene transfer to protoplasts. **Plant Molecular Biology**, v.8, p.363-373, 1987.

OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B; RYAN, C. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.8273-8276, 1993.

PANG, S.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses. **Bio/Technology**, v.11, p.819-824, 1993.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETI, P.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.892-896, 2000.

PAXTON, J.D. Phytoalexins: a working redefiniton. **Phytopatology Zeitschrift**, v.101, p.106-109, 1981.

PEFEROEN, M. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. In: GATEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A.; BOULTER, D. (Ed.) **Plant genetic manipulation for crop protection**. Wallingford: CAB Interna- tional, 1992. p.237-269. (Biotechnology in Agriculture, 7)

PEFEROEN. M. Progress and prospects for field use of *B. thuringiensis* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.173-177, 1997.

PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.O.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; FISHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v.8, p.939-943, 1990.

PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; MCPHERSON, S.L.; FISHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.3324-3328, 1991.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.313-321, 1993.

PFISTER, K.; STEINBACK, K.E.; GARDNER, G.; ARNTZEN, C.J. Photoaffinity labeling os an herbicide receptor protein in cloroplast membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, p.981-989, 1981.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.125-134, 1990.

POTRYKUS, I.; PASZKOWSKI, J.; SAUL, M.; PETRUSKA, J.; SHILLITO, R. Molecular and genetics of hybrid foreign gene introduction into tobacco by direct gene transfer. **Molecular and General Genetics**, v.199, p.169-177, 1985.

POWELL ABEL, P.; NELSON, R.S.; DE, B.; HOFFMAN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v.232, p.738-743, 1986.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOZ, S.; BROWN, D.J.; STEWART, J.C.; EWEN, S.W.B.; GATEHOUSE, A.M.R. Nutrition evaluation of the trypsin inhibitor from cowpea. **British Journal of Nutrition**, v.82, p.86-97, 1992.

RICHARDSON, M.J. Seed Storage Protein: the Enzyme inhibitors. In: ROGER, L.J. (Ed.) **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. v.5, p. 259-305.

ROBERTS, B.L.; MARKLAND, W.; SIRANOSIAN, K.; SAXENA, M.J.; GUTERMAN, S.K.; LADNER, R.C. Protease inhibitor display M13 phage: selection of high affinity neutrophil elastase inhibitors. **Gene**, v.121, p.9-15, 1992.

ROMMENS, C.M.T.; SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; STASKAWICZ, B.J. Intergenic transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **The Plant Cell**, v.7, p.1537-1544, 1995.

RYALS J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H-Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

SCHÄFER, W.; STRANEY, D.; CIUFFETTI, L.; VAN ETTEN, H.D.; YODER, O.C. One enzyme makes a fungal pathogen, but not a saprophyte, virulent on a new host plant. **Science**, v.246, p.247-249, 1989.

SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, p.2893-2897, 1981.

SCHNEPF, H.E.; WONG, C.; WHITELEY, H.R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, p.6264-6272, 1985.

SEKAR, V.; CARLTON, B.C. Molecular cloning of the delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Gene**, v.33, p.151-158, 1985.

SHAH, D.M.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v.233, p.478-481, 1986.

SHEEHY, R.E.; KRAMER, M.; HIATT, W.R. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.8805-8809, 1988.

SHENG, J.; CITOVSKY, C. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel? **The Plant Cell**, v.8, p.1699-1710, 1996.

SHILLITO.I.; SAUL, M.W.; PASZKOWSKI, J.; MULLER, M.; POTRYKUS, I. High frequency direct gene transfer to plants. **Bio/Technology**, v.3, p.1099-1103, 1985.

SHOWALTER, A.M.; BELL, J.N.; CRAMER, C.L.; BAILEY, J.A.; VARNER, J.E.; LAMB, C.J. Accumulation of hydroxyprolin-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, p.6551-6555, 1985.

SIJMONS, P.C. Plant-nematode interactions. **Plant Molecular Biology**, v.23, p. 917-931, 1993.

SOMMERS, D.A.; HINES, H.W.; GU, W.; KAEPPLER, H.F.; BUSHNELL, W.R. Fertile, transgenic oat plants **Bio/Technology**, v.10, p.1589-1594, 1992.

STEINECKE, P.; HERGET, T.; SCHREIER, P.H. Expression of a chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage of target mRNA and a concomitant reduction of gene expression *in vivo*. **The EMBO Journal**, v.11, p. 1525-1530, 1992.

STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHANDRAM, S.; PARROTT, W.A. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a syntthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v.112, p.115-120, 1996.

STIDHAM, M.A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. **Weed Science**, v.39, p.428-434, 1991.

STRIZHOV, N.; KELLER, M.; MATHUR, J. A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfafa and tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.15012-15017, 1996.

SUHAYADA, C.G.; HAUG, A. Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. **Physiologia Plantarum**, v.68, p.189-195, 1986.

TAYLOR, C.G.; SONG, W.; OPPERMAN, C.H.; CONKLING, M.A. Characterization of a nematode-responsive plant gene promoter. **Journal of Nematology**, v.24, p.621, 1992.

TEGTMEIER, K.J.; VAN ETTEN, H.D. The role of pisatin tolerance and degradation in the virulence of *Nectria haematococca* on peas: a genetic analysis. **Phytopathology**, v.72, p.165-171, 1982.

TEPFER, D. Genetic transformation using Agrobacterium rhizogenes. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.140-146, 1990.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109B, p.1-62, 1994.

THOMZIK, J.E.; HAIN, R. Transfer and segregation of triazin tolerant chloroplasts in *Brassica napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.165-171, 1988.

THOMZIK,J.E. Gene transfer in plants. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v.49, p.5-23, 1996.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A.M.; POLLOCK, T. Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, v.166, p.801-811, 1986.

TURBEK, C.S.; SMITH, D.A.; SCHARDL, C.L. An extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* which catalyses hydratation of the isolflavonoid phytoalexin phaseollidin. **FEMS Microbiology Letters**, v.94, p.187-190, 1992.

URWIN, P.; ATKINSON, H.; WALLER, D.; MCPHERSON, M. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **The Plant Journal**, v.8, p.121-131, 1995.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSENS, S.; DEBEUCKELLER, M.; DEAN, C.; ZABEU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, p.33-37, 1987.

VAN DER KROL, A.R.; LENTING, P.E.; VEENSTRA, J.; VAN DE MEER, I.M.; KOES, R.E; GERATS, A.G.M., MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. **Nature**, v.333, p.866-869, 1988.

VAN LAREBEKE, N.; ENGLER, G.; HOLSTERS, M.; VAN DEN ELSAKER, S.; ZAENEN, J.; SCHILPERRORT, R.A.; SCHELL, J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. **Nature**, v.252, p.169-170, 1974.

VAN OORSCHOOT, J.L.P. Cloroplastic resistance of weeds to triazines in Europe In: CASELEI, J.C., CUSSANS G.W.; ATKIN, R.K. (Ed.) **Herbicide resistance in weeds and crops**. s.l.: Bayer, 1991. p.87-102.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

VASIL, V.; SRIVASTAVA, V.; CASTILLO, A.M.; FROMM, M.E.; VASIL, I.K. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. **Bio/Technology**, v.11, p.1553-1558, 1993.

WAALWIJK, C.; DULLEMANS, A.; VAN WORKUM, M.E.S.; VISSER, B. Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28,000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.8206-8217, 1985.

WABIKO, H.; RAYMOND, K.C.; BULLA, L.A. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. **DNA**, v.5, p.305-314, 1986.

WALDEN, R.; KONCZ, C.; SCHELL, J. The use of gene vectors in plant molecular biology, a review. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, 175-194, 1990.

WAN, Y.; LEMAUX, P.G. Generation of a large numberof independently transformed fertile barley plants. **Plant Physiology**, v.104, p.37-48, 1994.

WARD, S.; ELLAR, D. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 kDa delta endotoxin. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.7195, 1987.

WARD, E.R.; UKNESS, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; METRAUX, J.P.; RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.3, p.1085-1094, 1991.

WEBER, H.; SCHULTZE, S.; PFITZNER, A.J.P. Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2 resistance gene in the tomato. **Journal of Virology**, v.67, p.6432-6438, 1993.

WEBER,G.; MONAJEMBASHI, S.; WOLFRUM, J.; GREULICH, K. Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.190-193, 1990.

WEEKS, J.T.; ANDERSON, O.D.; BLECHL, A.E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat. **Plant Physiology**, v.102, p.1077-1084, 1993.

WEGENER, D.; STEINECKE, P.; HERGET, T.; PETEREIT, I., PHILIPP, C.; SCHREIER, P.H. Expression of a reporter gene is reduced by a ribozyme in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, v.245, p.465-470, 1994.

WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1735-1745, 1996.

WILLIANS, S.; FRIEDRICH, L.; DINCHER, S.; CAROZZI, N.; KESSMAN, E.; WARD, E.; RYALS, J. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta endo-toxin expression in transgenic plants. **Bio/Technology**, v.7, p.194-200, 1993.

WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. **Environmental Entomology**, v.24, p.52-57, 1995.

YAMAMOTO, Y.T.; CHENG, C.; CONKLING, M.A. Root-especific genes from tobacco and *Arabidopsis* homologous to an evolutionary conserved gene family of membrane channel proteins. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7449, 1990.

ZHANG, H.M.; YANG, H.; RECH, E.L.; GOLDS, T.J.; DAVIS, A.S.; MULLIGAN, B.J.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. Transgenic rice plants produced by eletroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.7, p.379-384, 1988.

33

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLANTAS

ADILSON LEITE

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz - C.P. 6109 - CEP: 13083-970 - Campinas, SP.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante tem revolucionado o cultivo de plantas através da introdução de genes das mais diversas origens, visando principalmente o melhoramento das suas características agronômicas. Entre as modificações fenotípicas já desenvolvidas utilizando-se técnicas de engenharia genética encontram-se a resistência a vírus, bactérias, fungos, insetos, tolerância a diferentes formas de estresse, retardamento do amadurecimento de frutos, modificações em flores ornamentais e esterilidade masculina. Mais recentemente, esta tecnologia tem sido utilizada na modificação genética de plantas com o objetivo de transformá-las em biorreatores (reatores biológicos) para a produção de óleos, carboidratos e proteínas. No meio científico internacional, esta aplicação das plantas transgênicas inaugurou um novo ramo da biotecnologia, conhecido como *Plant Molecular Farming*, ou ainda, *Plant Molecular Pharming*, quando a proteína ou peptídeo produzido apresenta interesse farmacêutico. A tradução mais apropriada e que melhor define esta atividade é "Agropecuária Molecular".

2. COMPARAÇÃO COM OUTROS SISTEMAS DE EXPRESSÃO

Os sistemas empregados na expressão de proteínas heterólogas baseiam-se preferencialmente na utilização de bactérias, leveduras, cultura de células de insetos e mamíferos. O sistema mais utilizado é o bacteriano, sendo também aquele que apresenta o maior rendimento de produção de proteína recombinante. Entretanto, este sistema apresenta várias desvantagens. As proteínas expressas em bactérias geralmente retêm o resíduo de metionina na extremidade amino-terminal. A metionina é derivada do resíduo de formil-metionina adicionado durante o processo de iniciação de tradução. O radical formil é eficientemente removido, porém o mesmo não ocorre com o resíduo de metionina. A eficiência de remoção da metionina amino-terminal depende da natureza do segundo resíduo. A presença de resíduos de aminoácidos pequenos e desprovidos de carga na segunda posição facilita a remoção, enquanto que resíduos maiores dificultam o processamento da metionina (Sherman *et al.*, 1985). A expressão de altos níveis de proteína recombinante provoca também a saturação do processo, determinando uma acentuada diminuição da eficiência de remoção, independente da natureza do aminoácido vizinho.

A remoção da metionina pode ser catalisada *in vitro* pela metionil-aminopeptidase (Miller *et al.*, 1987), ou ainda, através da expressão conjunta desta enzima (Bem-Bassat *et al.*, 1987). Com a finalidade de evitar esta dificuldade foram desenvolvidas estratégias alternativas, como a adição na extremidade amídica de seqüências conhecidas como líderes de secreção. Estas seqüências possibilitam o direcionamento da proteína recombinante para o espaço periplásmico, permitindo a remoção simultânea do fragmento adicional. Uma segunda estratégia, consiste na utilização de proteínas portadoras na extremidade amídica. Após a expressão tais

inclusões são removidas da proteína quimérica. Dentre as proteínas mais utilizadas como portadoras destacam-se a β-galactosidase (Ruther & Müller-Hill, 1983), proteína A (Nilsson *et al.*, 1985), proteína ligante de maltose (Maina *et al.*, 1988), glutationa S-transferase (Smith & Johnson, 1988), e tireodoxina (La Vallie *et al.*, 1993). Entretanto, os processos de remoção da metionina, assim como as diferentes estratégias de obtenção de proteínas livres deste aminoácido resultam em um sensível decréscimo no rendimento de produção da proteína recombinante.

Altos níveis de expressão em *Escherichia coli* geralmente resultam na formação de agregados constituídos de proteínas desnaturadas denominados corpúsculos de inclusão (Miller *et al.*, 1987). Apesar desta estrutura ocasionalmente proteger as proteínas da ação de proteases e facilitar sua purificação, sua formação apresenta a desvantajosa necessidade de extração na presença de agentes desnaturantes. A solubilização dos agregados e a recuperação da estrutura da proteína nativa requer etapas adicionais de processamento.

Os sistemas eucarióticos de expressão, ao contrário dos sistemas bacterianos, permitem a modificação e o processamento dos produtos (Bradley, 1990). A expressão em leveduras, o mais antigo e mais utilizado dos sistemas de expressão eucariótico, foi baseada inicialmente na utilização da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisae* (Romanos *et al.*, 1992). Atualmente, esta levedura vem sendo substituída pela *Pichia pastoris*, uma levedura que apresenta melhores rendimentos de produção de proteína (Ratner, 1989). Embora os sistemas baseados em leveduras sejam tão econômicos quanto os bacterianos, as proteínas produzidas freqüentemente são hiperglicosiladas e, quando produzidas em altos níveis, são instáveis e insolúveis (Higgins, 1995).

A cultura de células de insetos infectadas por baculovírus representa outro sistema eucariótico muito empregado na expressão de proteínas heterólogas. Baseia-se na infecção de células de insetos em cultivo por um vírus recombinante que apresenta o gene codificador da proteína de interesse controlado por um potente promotor viral (Fraser, 1992). Também já foram desenvolvidos sistemas similares para células de mamíferos (Kaufman, 1990). As propriedades destes sistemas incluem a capacidade de secretar proteínas corretamente enoveladas e a habilidade de promover modificações pós-traducionais como glicosilação e γ-carboxilação (Jenkis *et al.*, 1996; Velander *et al.*, 1997). Estas propriedades, conseqüentemente, favorecem sua utilização na produção de glicoproteínas de interesse clínico como antígenos virais, hormônios, fatores de crescimento e coagulação sangüínea (Gray, 1995). O requerimento de meios de cultura complexos e de condições especiais para a manutenção das células, aliado à necessidade do emprego de reatores sofisticados, constituem as principais desvantagens da utilização dos sistemas de expressão baseados em células de insetos e de mamíferos.

Recentemente, eucariotos superiores têm sido apontados como possíveis reatores para a produção de proteínas de interesse farmacêutico. Um dos sistema descritos baseia-se na secreção de proteínas recombinantes no leite de caprinos, ovinos e bovinos. Neste sistema, a expressão de proteínas é controlada por promotores que restringem a expressão às células de glândulas mamárias. Entre os fármacos protéicos produzidos por este sistema incluem-se o ativador do plasminogênio tecidual (Gordon *et al.*, 1987; Pittius *et al.*, 1988), o fator IX de coagulação (Clark *et al.*, 1989) e a

uroquinase (Meade *et al.*, 1990). A utilização do leite como fonte de proteínas heterólogas restringe a produção em fêmeas em fase de lactação. Com o intuito de evitar esta inconveniência Kerr *et al.* (1998) propuseram a utilização da bexiga de animais transgênicos como biorreatores. Os autores demonstraram esta possibilidade utilizando um promotor específico do endotélio da bexiga para dirigir a expressão do hormônio de crescimento humano para a urina de camundongos transgênicos. Os sistemas de expressão baseados em animais transgênicos são caracterizados pela capacidade de produção de proteínas ativas de alta qualidade. Entretanto, sua aplicação em larga escala é prejudicada principalmente pelo alto custo de produção.

As plantas, assim como os demais sistemas eucarióticos de expressão, apresentam sistemas de modificação e processamento pós-traducionais. Esta propriedade, aliada ao baixo custo de obtenção de biomassa vegetal, indicam que as plantas apresentam elevado potencial para a produção de grandes quantidades de proteínas com estrutura e função idênticas às das proteínas nativas relacionadas.

Devido à manutenção da estrutura nativa nas proteínas recombinantes, as plantas constituem um sistema de expressão de grande interesse para a produção de proteínas e peptídeos de interesse farmacêutico e industrial (Whitelam *et al.*, 1993; Austin *et al.*, 1994; Goddijn & Pen, 1995; Kusnadi *et al.*, 1997; Moloney & Holbrook, 1997). Plantas transgênicas estão sendo testadas para a produção de anticorpos (Smith, 1996), antígenos vacinais (Mason & Arntzen, 1995; Mor *et al.*, 1998), hormônios (Vandekerckhove *et al.*, 1989; Matsumoto *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 2000), soroalbumina humana (Sijmmons *et al.*, 1990), peptídeos anticoagulantes (Parmenter *et al.*, 1995) e enzimas (Cramer *et al.*, 1996).

3. ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM PLANTAS

A produção de proteínas recombinantes em plantas pode ser realizada utilizando-se duas estratégias diferentes. Na primeira delas, o gene que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma, e a expressão da proteína recombinante depende dos sistemas de transcrição e tradução da planta (Kusnadi *et al.*, 1997). A integração estável permite a expressão permanente da proteína e a transferência desta característica à progênie da planta transformada. A Figura 1 mostra as diferentes etapas envolvidas na obtenção de plantas transgênicas visando a expressão de proteínas heterólogas.

A segunda estratégia baseia-se na utilização de vírus de RNA fita-simples, que ocorrem naturalmente nas plantas. Neste caso, o fragmento de ácido nucléico que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma do vírus, geralmente fusionado à região estrutural de um dos genes que codifica uma das proteínas da capa viral. Após a infecção da planta, o vírus promove sua auto-replicação e expressão de seus genes, incluindo o gene codificador da proteína recombinante (Figura 2). Trata-se de uma expressão transitória, pois neste sistema não ocorre integração estável do gene. A planta funciona apenas como um veículo para a amplificação das partículas virais. A proteína recombinante pode ser recuperada através do processamento da proteína da capa viral purificada a partir de extratos dos tecidos infectados. Opcionalmente, as partículas virais quiméricas purificadas podem ser utilizadas diretamente na formulação de vacinas orais e nasais (Beachy *et al.*, 1996).

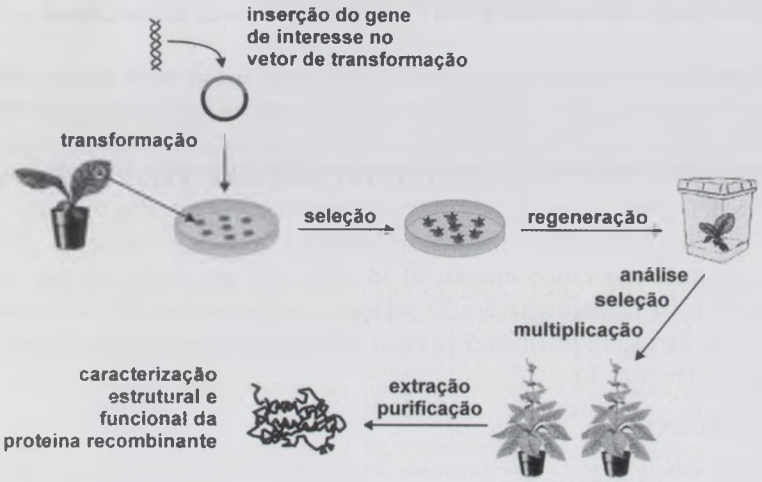


FIGURA 1. Expressão de genes integrados ao genoma da planta. O gene que codifica a proteína de interesse é inserido em um vetor apropriado, que depende do método de transformação utilizado. Geralmente, além do gene de interesse, é transferido também um gene de seleção, codificador de uma proteína que confere resistência a um antibiótico ou a um herbicida. Na fase de seleção, a utilização de meio de cultura contendo o agente seletivo limitará o desenvolvimento de células não transformadas. A partir do tecido selecionado são regeneradas plantas onde a presença do gene de interesse é avaliada através de análises moleculares, utilizando-se técnicas de PCR e hibridação (*Southern blot*) com sondas específicas (Register III, 1997). A presença do produto da expressão do gene de interesse é, então, investigada através de testes bioquímicos e imunoensaios específicos nos diversos tecidos das plantas transgênicas. Estas análises permitem selecionar a linhagem que apresenta maior rendimento, a qual será multiplicada para extração, purificação e caracterização estrutural e funcional.

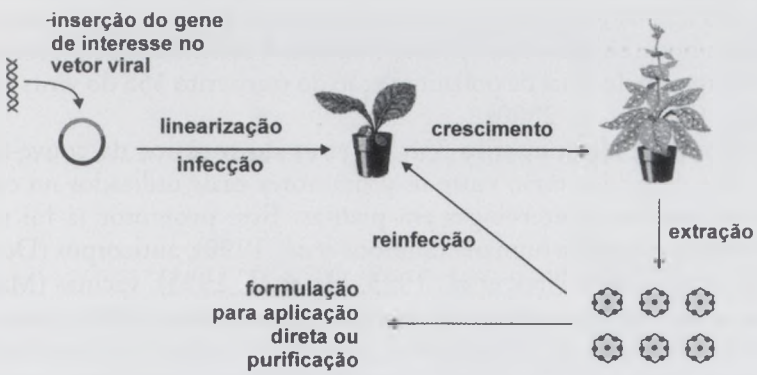


FIGURA 2. Expressão de genes inseridos em vírus portadores. O gene que codifica a proteína de interesse é inserido em um vetor viral, que é utilizado na infecção de plantas. Após o desenvolvimento das plantas, os tecidos infectados são utilizados como fontes para a extração de vírus recombinantes. Os extratos virais, por sua vez, podem ser utilizados para a amplificação da produção, através da reinfecção de novas plantas. Estes podem, ainda, ser utilizados diretamente na formulação de produtos ou submetidos a processos de purificação e processamento da proteína recombinante.

4. EXPRESSÃO DE GENES INTEGRADOS AO GENOMA

Apesar da estratégia de expressão de genes integrados ao genoma ser mais trabalhosa e demorada que a mediada por vírus, a mesma apresenta maior versatilidade. Nos sistemas virais, a produção da proteína recombinante ocorre obrigatoriamente nas folhas, enquanto que a expressão de genes integrados pode ser facilmente dirigida para os diversos órgãos, tecidos e compartimentos celulares das plantas.

A produção de proteínas recombinantes através do sistema de integração pode ser dividida em cinco etapas: a) inserção do gene de interesse no vetor de transformação; b) transformação; c) seleção e regeneração; d) análise das plantas regeneradas; e) extração, purificação e caracterização estrutural e funcional da proteína recombinante (Figura 1).

4.1 PROMOTORES

Geralmente o gene de interesse é incluído em um cassete de expressão que contém um promotor seguido da seqüência codificadora da proteína, e de uma seqüência contendo sinal e sítio de poliadenilação. A região promotora, além de conter a seqüência de DNA responsável pela ligação da RNA polimerase no início da transcrição, apresenta também sítios de ligação para diversos fatores que regulam o processo de transcrição. Estes elementos reguladores são responsáveis pela ativação ou inibição da expressão em resposta a diversos estímulos, sendo portanto capazes de controlar os níveis de expressão em função da natureza do tecido e do seu estágio de desenvolvimento. Portanto, a escolha de um promotor adequado representa uma importante etapa para o sucesso da expressão de proteínas heterólogas em plantas. Atualmente, existe um grande número de promotores de plantas disponíveis, sendo que a opção dependerá da estratégia a ser empregada na produção da proteína recombinante. Os níveis de expressão e o local do acúmulo da proteína recombinante são os principais fatores a serem levados em conta na escolha do promotor. A Figura 3a exemplifica a construção de um cassete de expressão, onde a transcrição do gene que codifica o hormônio do crescimento humano é controlada pelo promotor de γ-kafirina de sorgo e pelo sinal de poliadenilação do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Leite *et al.*, 2000).

O promotor do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (P35S CaMV) e seus derivados estão entre os promotores mais utilizados no controle da expressão de proteínas heterólogas em plantas. Este promotor já foi testado na expressão de soroalbumina humana (Sijmons *et al.*, 1990), anticorpos (During *et al.*, 1990; Hiatt *et al.*, 1989; Firek *et al.*, 1993, Ma *et al.*, 1995), vacinas (Mason *et al.*, 1992; Haq *et al.*, 1995) e eritropoietina (Matsumoto *et al.*, 1995). Apesar de ser considerado um promotor constitutivo, capaz de promover a expressão de forma generalizada na planta, o P35S CaMV apresenta atividade variável nos diversos tecidos, sendo mais ativo em folhas (De Clerq *et al.*, 1989).

As folhas não constituem órgãos adequados para o armazenamento de proteínas recombinantes, pois seus tecidos apresentam grande quantidade de água e alta atividade hidrolítica, resultando em baixa estabilidade da proteína produzida. No entanto, as sementes apresentam tecidos especializados capazes de armazenar proteínas de forma eficiente durante longos períodos. Ao contrário das folhas, devido

ao seu baixo conteúdo de água, as sementes não requerem condições especiais de conservação. Apesar desta vantagem, até o momento poucos sistemas baseados na expressão específica em sementes foram descritos. A utilização do promotor do gene constitutivo que codifica ubiquitina em milho resultou no acúmulo de altos níveis de avidina (Hood *et al.*, 1997), β-glicoronidase (Witcher *et al.*, 1998) e aprotinina (Zhong *et al.*, 1999) em embriões de milho.

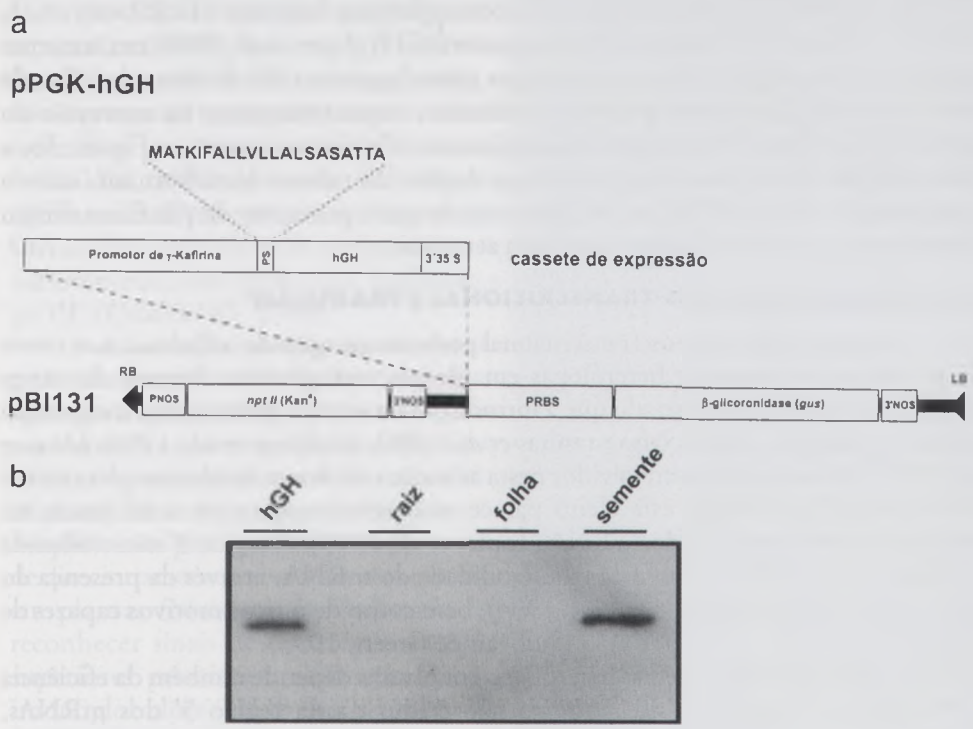


FIGURA 3. Expressão de hGH em tabaco transgênico. (a) O cassete de expressão utilizado na expressão de hGH recombinante em sementes de tabaco é mostrado como um inserto da região de T-DNA do vetor binário pBI131 (Clontech). O vetor contendo o cassete de expressão foi transferido para *Agrobacterium tumefaciens*. As agrobactérias transformadas foram utilizadas no processo de transformação de discos foliares (Leite *et al.*, 2000). No vetor, o gene seletivo *np tII* (neomicina-fosfotransferase II), que promove resistência ao antibiótico kanamicina, e o gene repórter *gus* (β-glucoronidase), são controlados pelos promotores PNOS (nopalina sintase) e PRBS (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase), respectivamente. As bordas direita e esquerda do T-DNA estão representadas por RB e LB, respectivamente. A região 3' do gene da nopalina-sintase (3'NOS), contendo sinal e sítio de poliadenilação, flanqueia os genes *nptII* e *gus*, enquanto uma região similar do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor flanqueia o gene hGH. A seqüência primária do peptídeo sinal de *Coix* inserido na extremidade amino-terminal do hGH é mostrada como um inserto no cassete de expressão. (b) *Western blot* de extratos protéicos de diferentes tecidos de tabaco transgênico mostrando o acúmulo de hGH especificamente em sementes. Alíquotas dos diversos extratos, contendo 50 μg de proteína solúvel, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 14% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana, onde a presença de hGH foi revelada utilizando-se anticorpo específico (Leite *et al.*, 1999). Para indicar a posição da migração do hormônio, foram utilizados 50 ng de Saizen* (hGH), hormônio comercial da Serono.

As proteínas de reserva acumulam-se em grandes quantidades nas sementes, onde constituem fonte de nitrogênio e enxofre a ser utilizada nos primeiros estágios do desenvolvimento das plântulas (Shewry *et al.*, 1995). Devido aos altos níveis de expressão proporcionado por seus promotores, os genes que codificam proteínas de reserva de sementes representam excelente fonte de promotores específicos de sementes. Este tipo de promotor foi utilizado na expressão de um anticorpo modificado (Fiedler & Conrad, 1995), de um antígeno do citomegalovírus humano (Tackaberry *et al.*, 1999), e do hormônio de crescimento humano (hGH) (Leite *et al.*, 2000) em sementes de tabaco transgênico. Os promotores dos genes legumina B4 de fava, glutelina de arroz e de γ-kafirina de sorgo foram utilizados, respectivamente, na expressão do anticorpo, antígeno e hormônio recombinantes. Conforme mostra a Figura 3b, a análise de extratos protéicos de diversos órgãos de tabaco transformado com o plasmídeo pPGK-hGH (Figura 3a), demonstrou que o promotor de γ-kafirina dirigiu a produção de hGH exclusivamente para sementes.

4.2 PROCESSAMENTO PÓS-TRANSCRICIONAL E TRADUÇÃO

O processamento pós-transcricional pode exercer grande influência nos níveis de produção de proteínas heterólogas em plantas transgênicas. Através de vários exemplos têm sido demonstrado que a introdução de introns potencializa a expressão gênica (Callis *et al.*, 1987; Mascarenhas *et al.*, 1990; McElroy *et al.*, 1990; Maas *et al.*, 1991). Os mecanismos envolvidos nesta ativação não foram ainda completamente esclarecidos. No entanto, este efeito parece estar relacionado com a eficiência do processamento e estabilidade do RNA (Topfer *et al.*, 1993). A região 3' não traduzida também exerce grande influência na estabilidade do mRNA, através da presença do sinal e sítio de poliadenilação (Hunt, 1994), bem como de outros motivos capazes de estimular ou inibir sua degradação (Sullivan & Green, 1993).

A produção de proteínas heterólogas em plantas depende também da eficiência da tradução. A seqüência nucleotídica não traduzida da região 5' dos mRNAs, conhecida como seqüência líder, exerce forte influência na etapa de iniciação da tradução (Gallie, 1996). Um grande número de vetores utilizados na transformação de plantas incorporam seqüências líderes virais e a região consenso de iniciação de tradução de vertebrados AACAATGG (Kosak, 1987). Após a iniciação, a velocidade da tradução pode ser limitada pela privação de tRNAs específicos. Este problema pode ser contornado, como demonstrado na expressão da proteína inseticida CrylA (Perlak *et al.*, 1991) e de uma toxina recombinante de *Escherichia coli* (Mason *et al.*, 1998), através da substituição dos códons originais pelos mais freqüentes na espécie transformada (Murray *et al.*, 1989).

4.3 PROCESSAMENTO PÓS-TRADUCIONAL

As modificações pós-traducionais representam uma importante etapa na produção de proteínas em eucariotos. Em muitos casos, a atividade e o endereçamento das proteínas para os diversos compartimentos celulares dependem das modificações pós-traducionais. As modificações pós-traducionais mais freqüentes são: o processamento proteolítico e a adição de carboidratos (glicosilação), fosfatos (fosforilação) e grupos acil (acilação).

4.4 ENDEREÇAMENTO E PROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO

Com exceção de um pequeno número de proteínas produzidas nos cloroplastos e mitocôndrias, a maioria das proteínas presentes nas organelas celulares é sintetizada por ribossomos livres no citoplasma ou ligados a membranas do retículo endoplasmático (RE). Tanto em animais quanto em plantas, o RE constitui a porta de entrada para o sistema de secreção. Nas plantas as proteínas são transportadas, a partir do RE, através do complexo de Golgi e vesículas secretoras, para vacúolos especializados ou para o espaço extracelular (apoplasto) (Figura 4). O transporte, a distribuição, bem como a retenção das proteínas sintetizadas no RE dependem de sinais presentes na seqüência ou estrutura da proteína, como também de receptores específicos presentes tanto no ribossomo quanto no RE (Chrispeels, 1991; Bednarek & Raikhel, 1992; Moloney & Holbrook, 1997; Galili *et al.*, 1998). Já a estrutura tridimensional das proteínas depende principalmente de interações entre as cadeias laterais de seus resíduos de aminoácidos. Apesar do enovelamento das proteínas ocorrer naturalmente, este processo é facilitado e acelerado por diversas proteínas presentes no RE (Galili *et al.*, 1998).

A secreção em plantas oferece uma série de vantagens para a produção de proteínas recombinantes. O sistema de secreção das plantas encontra-se devidamente aparelhado para assistir o correto enovelamento da proteína e promover modificações pós-traducionais essenciais para a produção de proteínas recombinantes funcionais. O direcionamento das proteínas recombinantes para determinados compartimentos celulares, além de proporcionar proteção contra a ação de proteases, pode também simplificar os processos de extração e purificação destas proteínas. Diversas estratégias de direcionamento subcelular têm sido empregadas em diferentes sistemas de expressão em plantas (Moloney & Holbrook, 1997). A capacidade das células vegetais de reconhecer sinais de endereçamento para o RE provenientes de outros eucariotos superiores permitiu a utilização de peptídeos sinais nativos para a produção de imunoglobulina (Hiatt *et al.*, 1989) e de eritropoietina humana (Matsumoto *et al.*, 1995). Com a mesma finalidade já foram também utilizados peptídeos sinais originários de proteínas diferentes daquelas expressas. Peptídeos sinais de proteínas relacionadas com a patogênese de viroses em plantas foram empregados na expressão de soroalbumina humana em batata e tabaco (Sijmons *et al.*, 1990), α-amilase de *Bacillus licheniformis* em tabaco (Pen *et al.*, 1992), imunoglobulinas em tabaco (Firek *et al.*, 1993), e fitase de *Aspergillus niger* em tabaco (Pen *et al*, 1993). Os peptídeos sinais da α-amilase de cevada (Ma *et al.*, 1995) e leguminina de *Vicia faba* (Fiedler & Conrad, 1995) foram utilizados na secreção de imunoglobulinas. O peptídeo sinal de uma proteína de reserva de *Coix lacryma-jobi* foi utilizado na produção de hormônio do crescimento humano (Figura 3a) (Leite *et al.*, 2000). Estes sinais promovem simultaneamente a tradução e a interiorização das proteínas recombinantes, que são posteriormente direcionadas, através da via padrão de secreção, à região apoplástica. A retenção das proteínas no RE depende da presença de sinais específicos. Em eucariotos, tem sido demonstrado que os tetrapeptídeos KDEL e HDEL, presentes na extremidade carboxílica de proteínas residentes no retículo endoplasmático de eucariotos funcionam como sinais de retenção (Bednarek & Raikhel, 1992). Esta propriedade foi explorada na expressão da subunidade B da

enterotoxina LT de *E. coli* em tabaco e batata (Haq *et al.*, 1995), para a qual os autores adicionaram à região terminal carboxílica do polipeptídeo o sinal de retenção SEKDEL.

As dificuldades do processamento, extração e purificação podem representar sérias limitações para a produção em larga escala de proteínas recombinantes em plantas. Estas dificuldades têm sido superadas, principalmente através do desenvolvimento de sistemas de expressão baseados em meios alternativos de secreção. Um destes sistemas baseia-se na inserção do polipeptídeo de interesse em uma proteína portadora. Neste caso, a orientação para o direcionamento da proteína expressa é realizada por sinais presentes na proteína portadora. Esta estratégia foi utilizada na expressão de encefalina inserida na albumina 2S de *Arabidopsis thaliana* (Vandekerckhove *et al.*, 1989), e do anticoagulante hirudina inserido em oleosina (Parmenter *et al.*, 1995), direcionados respectivamente para corpúsculos protéicos e lipídicos. Oleosinas são proteínas pequenas (15-26 kDa) associadas à membrana dos corpúsculos lipídicos em sementes (Huang, 1992). Estas proteínas apresentam uma região central hidrofóbica conservada flanqueada por regiões variáveis, uma delas relativamente polar, na extremidade carboxílica e a outra anfipática, na extremidade amídica. Enquanto a região central encontra-se mergulhada na camada de fosfolipídios da membrana do corpúsculo lipídico, as extremidades estão expostas ao citossol. Neste sistema de expressão, as proteínas de interesse são fusionadas às oleosinas. A grande vantagem deste sistema reside no fato de que os corpúsculos lipídicos e as proteínas associadas são facilmente purificados por flotação durante centrifugação. Os resultados obtidos com a produção da hirudina em sementes de *Brassica napus* indicam a eliminação de mais de 90% das proteínas contaminantes em um simples procedimento de centrifugação (Parmenter *et al.*, 1995).

A secreção de proteínas recombinantes em exsudatos de raízes (rizosecreção) constitui outro exemplo de sistema de expressão de proteínas heterólogas em plantas. Neste caso, são utilizados promotores de genes específicos de raízes, e a secreção da proteína recombinante depende da adição de um peptídeo sinal capaz de endereçar a proteína para o RE. Borisjuk *et al.* (1999) demonstraram a eficiência deste sistema produzindo altos níveis de GFP (proteína fluorescente de água viva), fosfatase alcalina de placenta humana e de uma xilanase bacteriana no meio hidropônico em que plantas transgênicas de tabaco foram cultivadas.

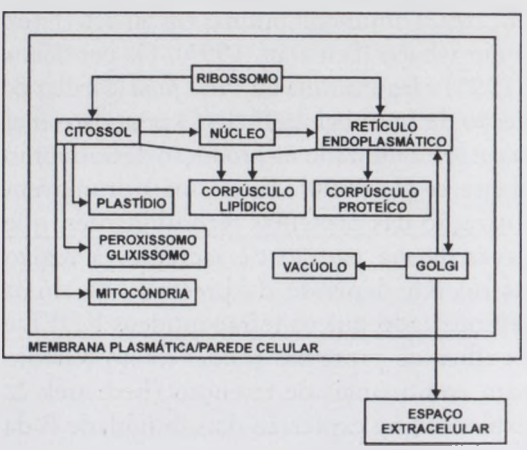


FIGURA 4. Direcionamento das proteínas aos diversos compartimentos celulares em plantas. Exceto algumas proteínas sintetizadas nos cloroplastos e mitocôndrias, a maioria das proteínas é sintetizada por ribossomos presentes no citossol ou ligados ao RE. Nestes casos, o transporte e o direcionamento das proteínas dependem de sinais específicos presentes nas proteínas nascentes. O RE apresenta um importante papel no direcionamento, pois é a porta de entrada das proteínas destinadas à membrana, e também daquelas a serem secretadas para o espaço extracelular.

4.5 GLICOSILAÇÃO

A adição de carboidratos constitui uma das principais modificações das proteínas em eucariotos. A maioria das proteínas solúveis e de membrana produzidas no retículo endoplasmático, destinadas às diversas organelas ou secretadas no espaço extracelular, são glicoproteínas. A adição do resíduo de açúcar à cadeia polipeptídica pode ocorrer através de ligações glicosídicas com o grupo amino da cadeia lateral de um resíduo de asparagina (N-glicosilação), ou com a hidroxila da cadeia lateral de resíduos de serina e treonina (O-glicosilação). Enquanto a N-glicosilação ocorre no interior do RE, a O-glicosilação ocorre depois que a proteína abandonou este compartimento.

Com o advento da utilização de plantas como reatores biológicos, a caracterização da N-glicosilação das proteínas recombinantes produzidas adquiriu grande importância, principalmente em sistemas que exploram o direcionamento das proteínas para o RE. Esta caracterização apresenta ainda maior interesse na produção de proteínas em alimentos e para uso clínico. Como as proteínas humanas de interesse farmacêutico, na sua maioria, são glicoproteínas, um padrão diferente de glicosilação pode causar desativação do produto, ou ainda, devido ao caráter imunogênico dos oligossacarídeos, sua utilização pode resultar em uma resposta imune indesejável. Nos alimentos, a glicosilação pode resultar na produção de novos alergênios. Nas plantas, assim como nos demais eucariotos, a N-glicosilação está envolvida nos processos de direcionamento, reconhecimento protéico, adesão celular, prevenção de degradação através de proteólise e no correto enovelamento das proteínas. Portanto, a presença de N-glicanos tem grande influência na estabilidade, conformação estrutural e atividade biológica das proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas.

Aparentemente, o único requerimento estrutural para a formação da ligação N-glicosídica é a presença do resíduo asparagina inserido em uma região com a seqüência Asn-X-Ser/Thr, onde X representa um aminoácido qualquer exceto prolina e ácido aspártico (Kornfeld & Kornfeld, 1985). A N-glicosilação das proteínas ocorre precocemente durante sua síntese no interior do RE, através da transferência de um oligossacarídeo precursor a partir de um lipídio carreador presente na membrana. Após a transferência do oligossacarídeo precursor $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (Figura 5a), este sofre uma série de processamentos seqüenciais que se iniciam no RE e se completam durante o deslocamento da proteína através dos diversos compartimentos do aparelho de Golgi (Lerouge *et al.*, 1998; Galili *et al.*, 1998). Análises estruturais de glicoproteínas de plantas revelaram uma grande heterogeneidade dos N-glicanos, resultante de diversas substituições no oligossacarídeo precursor. De acordo com as substituições, os N-glicanos de plantas são classificados em quatro grupos: ricos em manose, complexos, paucinomanosídicos e híbridos (Figura 5) (Lerouge *et al.*, 1998).

Os N-glicanos ricos em manose de plantas apresentam estruturas contendo um número variável de resíduos de manose ($Man_5GlcNAc_2$ a $Man_9GlcNAc_2$) (Figura 5b). Assim como nos demais eucariotos resultam da retirada, ainda no lume do RE, dos resíduos de glicose e de um número variável de resíduos de manose do oligossacarídeo precurssor. Os N-glicanos complexos originam-se através do processamento dos N-glicanos ricos em manose no aparelho de Golgi, e são

caracterizados pela presença de resíduos de fucose e xilose ligados, respectivamente, aos resíduos de N-acetil-glicosamina e manose proximais. Este tipo de glicano apresenta, ainda, resíduos adicionais de N-acetil-glicosamina ligados aos resíduos de manose (Figura 5c). Outra versão de N-glicano complexo apresenta adições de resíduos de fucose e galactose em unidades terminais de N-acetil-glicosamina (Figura 5d). As extremidades livres destes glicanos são conhecidas como antígenos de Lewis^a, geralmente encontrados em glicoproteínas de superfície em mamíferos. A presença destes antígenos na superfície de células de plantas sugere, como nos animais, seu provável envolvimento em interações entre células e com patógenos (Fitchette-Lainé *et al.*, 1997). Os N-glicanos do tipo paucinomanosídico, inicialmente descritos como fitohematoglutininas, são glicanos típicos de proteínas de vacúolos e originam-se através da eliminação dos resíduos terminais de glicanos complexos (Figura 5e). O processamento incompleto converte N-glicanos complexos em glicanos intermediários, denominados híbridos (Figura 5f).

A primeira etapa da glicosilação que determina a produção de N-glicanos complexos no RE de plantas é idêntica à dos demais eucariotos superiores. Entretanto, o processamento que ocorre durante o transporte através do aparelho de Golgi resulta na produção de N-glicanos complexos diferentes dos encontrados em glicoproteínas de mamíferos. Nas plantas, assim como nos mamíferos, os glicanos complexos apresentam um resíduo de fucose ligado à GlcNAc proximal. Entretanto, nas plantas a ligação glicosídica é do tipo $\alpha(1,3)$, enquanto que nos mamíferos esta mesma ligação é do tipo $\alpha(1,6)$. Outra diferença importante dos N-glicanos complexos de plantas e mamíferos reside nas diferentes adições que ocorrem aos resíduos GlcNAc terminais. Enquanto nas plantas estes resíduos são decorados com fucose e galactose, em mamíferos eles recebem apenas a adição de ácido N-acetil-neuramínico (NANA ou ácido siálico) (Lerouge *et al.*, 1998). As conseqüências destas diferenças têm sido analisadas principalmente na produção de anticorpos em plantas transgênicas.

Os anticorpos apresentam tanto O- quanto N-glicosilação, sendo que várias de suas propriedades dependem destas modificações (Kim *et al.*, 1994; Wright & Morrison, 1997). Cabanes-Macheteau *et al.* (1999) analisaram o padrão de N-glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido em tabaco transgênico. O anticorpo estudado apresenta dois sítios de N-glicosilação na cadeia pesada, um deles na região Fc, conservado nas demais imunoglobulinas, e um segundo localizado na região Fab. Os autores observaram um grande número de diferentes N-glicanos ricos em manose e complexos característicos de plantas. Apesar da maior diversidade de glicosilação encontrada nos anticorpos produzidos em plantas transgênicas, estas foram capazes de produzir anticorpos solúveis e ativos. A presença dos N-glicanos complexos de plantas em anticorpos não deve limitar sua aplicação clínica, principalmente para uso tópico, pois estes possíveis antígenos são comuns em plantas comestíveis. Entretanto, a utilização de anticorpos produzidos em plantas em terapias que exigem exposição prolongada ou uso parenteral pode resultar em sensibilização a estes antígenos.

Outro exemplo do efeito da glicosilação em uma glicoproteína recombinante produzida em planta transgênica foi demonstrado em eritropoietina humana produzida em cultura de células de tabaco (Matsumoto *et al.*, 1995). A eritropoietina,

um dos principais fatores reguladores da produção de hemácias em mamíferos, produzida pelo rim (Krantz, 1991), é considerada um fármaco essencial na terapia de pacientes com falência renal. A eritropoietina recombinante produzida em cultura de células de plantas apresentou apenas atividade biológica *in vitro*. Os testes realizados com a proteína recombinante produzida em planta indicam que a ausência de atividade biológica *in vivo* deve-se ao seu diferente padrão de glicosilação (Matsumoto *et al.*, 1995). A eritropoietina natural apresenta três N-glicanos e um O-glicano, que correspondem a aproximadamente 40% de seu peso molecular de 30,4 kDa (Krantz, 1991). A correta glicosilação da eritropoietina é necessária para sua secreção e manutenção no sistema circulatório. A ausência de ácido siálico nos resíduos terminais de N-glicanos complexos, predominante em mamíferos mas ausente em plantas, determina a rápida remoção da eritropoietina pelo fígado através da ação de receptores que reconhecem especificamente glicoproteínas desprovidas deste resíduo (Drickamer, 1991). O mesmo efeito provavelmente deverá ocorrer com outras glicoproteínas humanas produzidas em plantas. Com o objetivo de minimizar este efeito, diferentes estratégias têm sido propostas: a prevenção da formação de N-glicanos complexos, ou ainda, a introdução de genes que codifiquem enzimas modificadoras que permitam um padrão de glicosilação similar ao de mamíferos (Ma *et al.*, 1995; Lerouge *et al.*, 1998).

A seguir, para exemplificar a utilização de sistemas de expressão de proteínas heterólogas em plantas, descrevemos sua aplicação na produção de duas importantes classes de fármacos protéicos: anticorpos e vacinas.

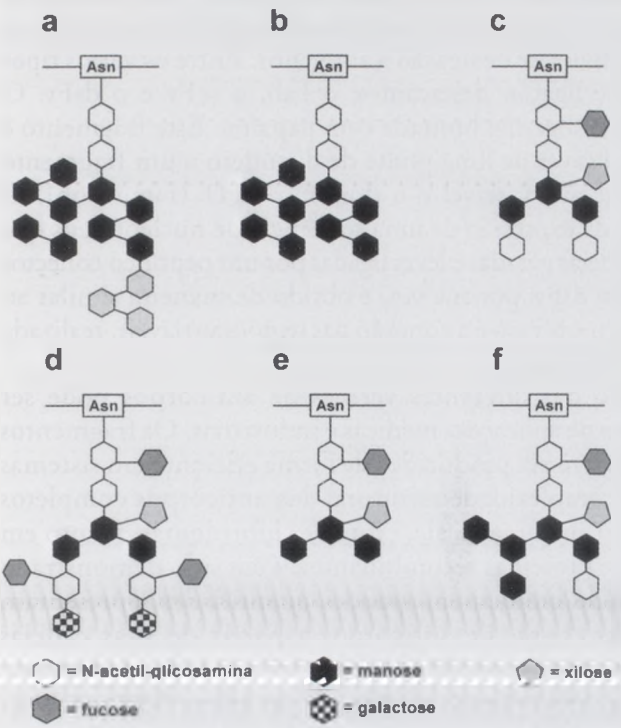


FIGURA 5. Representação esquemática das estruturas dos N-glicanos de plantas. (a) $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, oligossacarídeo precursor; (b) $Man_9GlcNAc_2$, N-glicano rico em manose; (c) $GlcNAc_2Man_3(Xil)GlcNAc_2(Fuc)$ e (d) $Gal_2GlcNAc_2(Fuc)_2Man_3(Xil)GlcNAc_2(Fuc)$, N-glicanos complexos; (e) $Man_3(Xil)GlcNAc_2(Fuc)$, N-glicano do tipo paucino-manosídico; (f) $GlcNacMan_5(Xil)GlcNAc_2(Fuc)$, N-glicano do tipo híbrido. Glc, Man, GlcNAc, Xil, Fuc e Gal representam resíduos de glicose, manose, N-acetil-glicosamina, xilose, fucose e galactose, respectivamente. Os índices representam o número de resíduos presentes nos oligossacarídeos.

5. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS

Os anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas multiméricas complexas cuja função primária é o reconhecimento e ligação a antígenos. O reconhecimento específico mediado pelos anticorpos constitui a base da identificação molecular no sistema imune dos animais. A unidade básica de um anticorpo, conforme mostra a estrutura de um anticorpo do tipo IgG representado na Figura 6a, é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, idênticas entre si, ligadas por pontes de dissulfeto. Cada um dos polipeptídeos é enovelado em uma série de pequenos domínios, estabilizados também por pontes de dissulfeto. Nos animais superiores existem cinco classes principais de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, sendo cada um deles caracterizado pela presença de cadeias pesadas específicas. As propriedades que caracterizam as diferentes classes dos anticorpos dependem principalmente das regiões Fc e da região flexível que separa a região Fc do restante da cadeia pesada.

Nos anticorpos, o reconhecimento do antígeno é mediado por regiões de alta variabilidade na seqüência e no número de aminoácidos, conhecidas como CDRs (regiões determinantes de complementaridade). Estas regiões estão localizadas nas extremidades amino-terminais das cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L). Além da região variável, as diferentes classes de anticorpos apresentam uma série de domínios que apresentam seqüências conservadas de aminoácidos (C_H e C_L). Estas regiões são específicas para cada espécie animal, e estão envolvidas com a fixação do complemento e a ligação a diferentes células do sistema imune (Figura 6a). Os domínios constantes são dispensáveis para o reconhecimento e ligação ao antígeno. Fragmentos de anticorpos gerados por proteólise ou técnicas de recombinação gênica, que incluem os domínios variáveis, mantêm atividade de ligação a antígenos. Entre os vários tipos de fragmentos com atividade de ligação destacam-se o Fab, o scFv e o dsFv. O fragmento Fab é obtido através da digestão limitada com papaína. Este fragmento é composto da cadeia leve ligada através de uma ponte de dissulfeto a um fragmento da cadeia pesada que inclui a região variável e o domínio CH1 (Figura 6b). O fragmento scFv é obtido através da expressão de uma seqüência de nucleotídeos que codifica as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves ligadas por um peptídeo conector flexível (Figura 6c). O fragmento dsFv, por sua vez, é obtido de maneira similar ao scFv, sendo que a única diferença neste caso é a conexão das regiões variáveis, realizada por uma ponte de dissulfeto (Figura 6d).

A capacidade de ligação das diferentes versões de anticorpos pode ser explorada em um grande número de aplicações médicas e industriais. Os fragmentos recombinantes de anticorpos podem ser produzidos de forma eficiente em sistemas bacterianos. Entretanto, a alta complexidade estrutural dos anticorpos completos impõe limites para sua produção em larga escala, tanto em hibridomas quanto em diversos sistemas de expressão de proteínas recombinantes. Têm sido demonstrado que plantas transgênicas, além de produzirem grandes quantidades, apresentam capacidade de montar diversas classes de anticorpos a partir de suas cadeias básicas (Hiatt *et al.*, 1989; Hiatt, 1990; Conrad & Fiedler, 1994; Fiedler & Conrad, 1995; Whitelam & Cockburn, 1996; Smith, 1996; Ma & Hein, 1995; 1996).

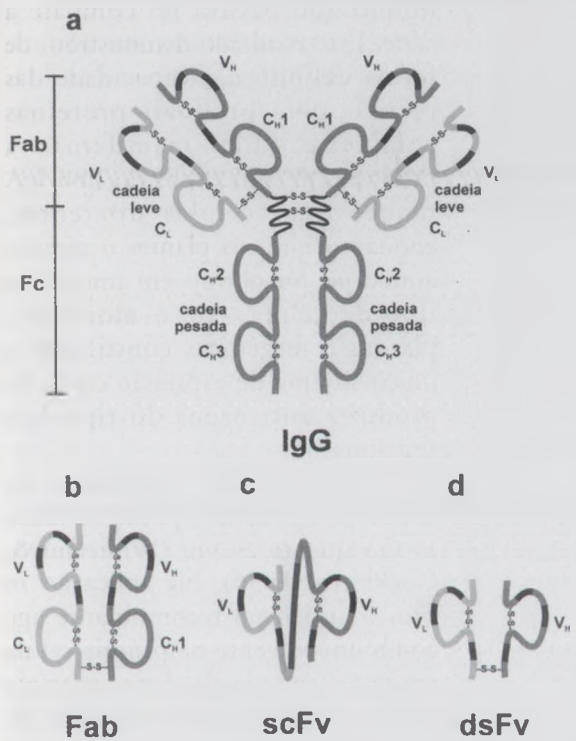


FIGURA 6. Domínios estruturais dos anticorpos e de fragmentos de anticorpos. (a) um anticorpo típico representado por uma imunoglobulina do tipo G (IgG). Estão indicadas as posições das regiões constantes (C) e variáveis (V) das cadeias leves (L) e pesadas (H). As posições dos três domínios CDRs (*complementary determining regions*), hipervariáveis, presentes nas extremidades N-terminais das regiões variáveis dos dois tipos de cadeias estão representadas em preto. (b) fragmento Fab, obtido através de digestão limitada com papaína. (c) fragmento scFv, obtido através da expressão das regiões variáveis das cadeias pesada e leve ligadas por um peptídeo conector. (d) fragmento dsFv, obtido através da expressão das regiões variáveis das cadeias pesada e leve ligadas por uma ponte de dissulfeto.

Este fato foi comprovado através da produção de um anticorpo do tipo IgA em plantas de tabaco (Ma *et al.*, 1995). Imunoglobulinas do tipo IgA correspondem à principal classe de anticorpos presentes em secreções como a saliva, a lágrima, o leite e secreções do sistema respiratório e intestinal. Apresentam estrutura dimérica, onde duas moléculas de imunoglobulina são ligadas por um peptídeo conector (peptídeo J), e apresentam adicionalmente um peptídeo relacionado com o sistema de secreção (componente de secreção, CS) (Figura 7a). Estes anticorpos apresentam maior estabilidade e resistência a proteólise que os anticorpos do tipo IgG e IgM, presentes no soro. Para a produção da IgA em tabaco, Ma *et al.* (1995) obtiveram quatro linhagens de plantas transgênicas (Figura 7b). A primeira, expressando um gene quimérico que codifica a cadeia pesada de um anticorpo monoclonal de camundongo, onde os domínios da região Fc do tipo IgG foram substituídos por domínios do tipo IgA, produzindo uma cadeia pesada híbrida IgA-G. Uma segunda linhagem, expressando o gene que codifica a cadeia leve do mesmo anticorpo monoclonal, e duas outras linhagens expressando genes que codificam o peptídeo conector (J) e o componente secretor (CS) de camundongo e coelho, respectivamente. Os cruzamentos sucessivos destas linhagens produziram uma progênie expressando simultaneamente os quatros genes. Os autores demonstraram que a progênie resultante dos cruzamentos foi capaz de montar os quatro polipeptídeos, produzindo um anticorpo do tipo IgA funcional. Uma vez que o anticorpo monoclonal original reconhecia a adesina de *Streptococcus mutans*, o agente causal mais freqüente da cárie, o anticorpo do tipo IgA produzido em tabaco poderá ser utilizado como aditivo de dentifrício para a

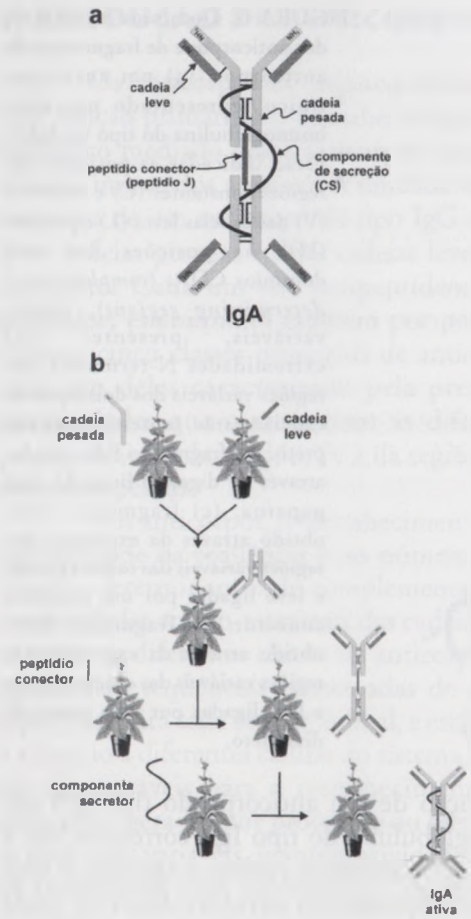


FIGURA 7. Produção de imunoglobulina do tipo IgA em tabaco transgênico. (a) representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina do tipo IgA. Estão indicadas as posições relativas dos diversos componentes. (b) estratégia de polinização utilizada na produção, em tabaco, de um anticorpo do tipo IgA completo que reconhece a adesina de *Streptococcus mutans* (Ma *et al.*, 1995). Os componentes ou produtos sintetizados encontram-se representados à esquerda ou à direita de cada linhagem.

imunização passiva no combate à cárie. Este resultado demonstrou, de forma definitiva, a capacidade das plantas para produzir proteínas complexas. Em mamíferos, a produção de anticorpos do tipo IgA requer duas células diferentes, enquanto que em plantas o mesmo anticorpo foi obtido em um único tipo de célula. Até o momento, plantas transgênicas constituem o único sistema de expressão capaz de produzir anticorpos do tipo IgA funcionais.

Em plantas, a produção de anticorpos pode ter aplicações tanto *in situ* quanto *ex situ* (Whitelam & Cockburn, 1996). Na aplicação *in situ*, o anticorpo recombinante age como um reagente na própria célula em que é sintetizado. Esta estratégia pode ser utilizada com o objetivo de modificar a atividade *in vivo* de um determinado antígeno. Owen *et al.* (1992), os primeiros a utilizar a estratégia de modulação através da expressão *in situ* de anticorpos, produziram um fragmento de anticorpo do tipo scFv anti-fitocromo em tabaco. As sementes derivadas das plantas transgênicas apresentaram alterações no controle de germinação pela luz. Por sua vez, Artsaenko *et al.* (1995) obtiveram plantas de tabaco transgênico com fenótipo similar a mutantes deficientes em ácido abcísico (ABA), um hormônio de planta, através da expressão de um gene que codifica um scFv anti-ABA. A estratégia de produção de anticorpos *in situ* pode ser também explorada como uma forma de promover imunização intracelular. Com o propósito de promover resistência viral, Tavladoraki *et al.* (1993) expressaram um gene que codifica um scFv que reconhece um vírus de alcachofra em tabaco. Apesar do mecanismo de proteção não ter sido completamente elucidado, as plantas transgênicas apresentaram maior resistência a infecção viral e, também, retardamento no aparecimento de sintomas. Outro exemplo de imunização intracelular foi descrito

por Voss *et al.* (1995), que demonstraram redução de sensibilidade a infecção pelo vírus TMV em tabaco transgênico expressando um anticorpo completo anti-TMV. Até o momento, esta estratégia foi utilizada direcionando os anticorpos para proteínas de capsídeos de vírus. Entretanto, proteínas não-estruturais, tais como polimerases virais e proteínas envolvidas na transmissão dos vírus representam possíveis alvos para este tipo de imunização. Possivelmente, estratégias similares poderão ser aplicadas no combate a outros patógenos de plantas como bactérias e fungos, e inclusive no combate a insetos e nematóides.

A Tabela 1 mostra que a produção de anticorpos em plantas transgênicas para uso *ex situ* compreende uma grande variedade de aplicações. Para estas aplicações, os anticorpos recombinantes são purificados e utilizados como reagentes específicos. A maioria delas requer apenas a atividade de ligação, e portanto podem ser utilizados fragmentos dos tipos scFv ou dsFv. A maioria das aplicações dos anticorpos requer grandes quantidades de anticorpos, sendo portanto limitadas pelos sistemas de produção. Entretanto, a produção em plantas transgênicas tem dado novo estímulo ao emprego de anticorpos recombinantes. Conforme descrito anteriormente, as plantas são capazes de sintetizar de forma eficiente diferentes versões de anticorpos. Destaca-se, ainda, que a produção de anticorpos em larga escala pelas plantas poderá representar, no futuro, uma alternativa barata para a retirada de poluentes orgânicos (biorremediação) de água e solo (Harris, 1999; Longstaff *et al.*, 1999). Para as aplicações médicas, além da produção econômica em larga escala, o emprego de plantas como biorreatores permite a produção de anticorpos completos ativos. O anticorpo completo é essencial nos casos em que, além da atividade de ligação, sua aplicação depende das funções efetoras, como a ativação do complemento e a interação com diferentes linhagens celulares. A utilização de anticorpos completos é também vantajosa nos casos de uso tópico em mucosas, onde os mesmos estão sujeitos ao ataque por proteases. Mucosas como a gastrointestinal, respiratória e urogenital constituem porta de entrada para um grande número de infecções. Já foi demonstrado que o uso tópico de anticorpos é capaz de prevenir a colonização de bactérias ou ainda modificar especificamente a flora residente (Bessen & Fischetti, 1988; Ma *et al.*, 1990). Portanto, a utilização de anticorpos para a imunização passiva poderá tornar-se, no futuro, uma importante medida profilática no combate a infecções bacterianas, virais e fúngicas. Entretanto, para esta aplicação específica, os anticorpos que apresentam melhores resultados são os do tipo IgA. Conforme descrito anteriormente, estes anticorpos apresentam estrutura dimérica, resultando em ligações polivalentes com os antígenos, propiciando maior eficiência de agregação e maior resistência a proteólise.

A imunoterapia do câncer, outra importante aplicação envolvendo o uso de anticorpos, poderá ser beneficiada com a utilização de sistemas de expressão baseados em plantas. Neste tipo de terapia, fragmentos de anticorpo do tipo scFv, que reconhecem antígenos específicos de células cancerosas, são fusionados com formas truncadas de potentes toxinas bacterianas ou vegetais que apresentam atividade citotóxica. Alternativamente, na técnica de radioimunoterapia a citotoxidade é mediada por radioisótopos incorporados aos anticorpos (Reiter & Pastan, 1998). A utilização de plantas é especialmente interessante para a produção de imunotoxinas, que requer a expressão de um gene quimérico capaz de expressar uma proteína recombinante complexa.

TABELA 1. Possíveis aplicações para anticorpos e fragmentos de anticorpos produzidos em plantas.

Aplicações *in situ*:
Estudos de imunomodulação in vivo
Resistência a patógenos e pragas
Aplicações *ex situ*:
1. Indústria de alimentos:
Inibidores de enzimas que degradam alimentos
Proteção de motivos sensíveis durante o processamento
Reagentes para intensificação de sabores e odores
Preservativos antimicrobianos
2. Cosméticos:
Antibacterianos e antifúngicos para creme dental e anti-sépticos bucais
Inibidores de enzimas que causam odores
Agente anticaspa
3. Detergentes:
Proteção de motivos sensíveis durante o processamento
Agentes removedores de corantes
4. Síntese industrial:
Separação de produtos intermediários
5. Proteção do meio ambiente:
Remoção de microrganismos e vírus da água
Remoção de poluentes da água e do solo
6. Sensores
Monitoramento de poluição química ambiental
Monitoramento de contaminação microbiana
Monitoramento de degradação de alimentos
7. Saúde
Reagentes para diagnóstico
Soros contra toxinas e venenos
Inibidores de infecções e infestações (imunização passiva)
Contraceptivo
Imunoterapia do câncer

6. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS VACINAIS

A maioria dos patógenos humanos inicia os processos infecciosos na superfície de mucosas. As mucosas apresentam mecanismos de defesa do tipo celular (mediados por linfócitos T) e humoral (mediados por anticorpos). O sistema imune das mucosas apresenta uma série de particularidades que o diferenciam do sistema imune sistêmico, principalmente com relação aos mecanismos de apresentação de antígenos e produção de anticorpos (Lamm, 1997). Anticorpos secretados pelas mucosas são principalmente do tipo IgA, que têm capacidade de se ligar aos micróbios, inibindo sua penetração na superfície da mucosa, e representam a primeira barreira contra a infecção. Logo, vacinas contra patógenos que infectam inicialmente mucosas, principalmente do sistema respiratório e gastrointestinal, deveriam idealmente, além de estimular imunidade sistêmica, promover resposta imune de mucosas. As vacinas parenterais geralmente impedem a propagação dos patógenos, porém são inócuas na prevenção de infecção de mucosas (Walker, 1994). As vacinas orais e nasais, além de estimularem as defesas de mucosas, geralmente apresentam redução dos efeitos adversos quando comparadas com vacinas equivalentes parenterais (Staats *et al.*, 1994). Adicionalmente,

estas formas de inoculação vacinal requerem meios menos sofisticados de administração, determinando sensível redução no número e treinamento de pessoal envolvido em campanhas de vacinação em massa. Tais vantagens melhoraram a aceitação das vacinas e podem ainda determinar um sensível aumento do acesso às vacinas, fator de grande importância principalmente em países subdesenvolvidos. Várias estratégias têm sido testadas para a produção de vacinas orais, tais como, vacinas vivas contendo linhagens atenuadas ou mutantes de bactérias e vírus, vacinas contendo microrganismos inativos, e utilização direta de antígenos. Entretanto, várias destas tentativas tiveram sucesso limitado. A utilização de vacinas vivas apresenta um risco óbvio, e a eficácia da utilização direta de antígenos é prejudicada pela acidez e presença de enzimas proteolíticas no sistema digestivo. Os antígenos isolados podem ser estabilizados e protegidos da ação do trato gastrointestinal através do emprego de partículas portadoras, como os lipossomos, ou encapsulados em microesferas produzidas a partir de outros polímeros sintéticos (Walker, 1994).

Plantas transgênicas expressando antígenos microbianos apresentam grandes vantagens no custo de produção, e no caso de plantas comestíveis, permitem a inoculação da vacina através da ingestão direta sem a necessidade de purificação e processamento prévio. Assim como ocorre com os lipossomos e com as microcápsulas, as células de plantas podem proteger os antígenos vacinais da ação do suco gástrico. A idéia de vacinas comestíveis recebeu grande impulso em 1990 com o lançamento de uma campanha da Organização Mundial de Saúde (OMS). Com o objetivo de assegurar a vacinação de crianças em países subdesenvolvidos, a campanha incentivou o desenvolvimento de vacinas orais, seguras e estáveis. Mason *et al.* (1992) inauguraram este campo de aplicação das plantas transgênicas divulgando os resultados da produção do antígeno HBsAg em tabaco. HBsAg constitui o principal antígeno de superfície do vírus da hepatite B, uma das mais importantes viroses crônicas humanas. Os autores demonstraram que o antígeno recombinante agregava-se, produzindo partículas virais similares às encontradas no soro de pessoas infectadas ou imunizadas com vacinas comerciais. No entanto, o baixo rendimento de produção do antígeno e a presença de alcalóides nos extratos das plantas transgênicas impediram a realização de testes de imunização através de ingestão direta. Posteriormente, Thanavala *et al.* (1995) demonstraram que o antígeno HBsAg purificado a partir de plantas é capaz de promover resposta imune em camundongo de forma idêntica à promovida pelo antígeno recombinante produzido em leveduras. Baseada nestes resultados, a empresa inglesa *Axis Genetics* iniciou em 1999 a fase I de testes clínicos de uma vacina oral contra a hepatite B, utilizando batatas transgênicas. A empresa preconiza a utilização de seu produto como dose de reforço para pessoas que receberam imunização primária.

Os resultados obtidos com o antígeno do vírus da hepatite B demonstraram que as plantas são capazes de produzir estruturas similares aos capsídeos a partir da expressão dos principais antígenos de superfície dos vírus. Os capsídeos virais vazios, denominados VLPs (*virus-like particles*), além de não serem infecciosos, constituem excelentes vacinas com ação em mucosas (Lomonossoff & Johnson, 1996). Estes fatores estimularam o estudo e o desenvolvimento de diversas vacinas orais baseadas em VLPs: contra o vírus HIV, agente da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Jong *et al.*, 1996); vírus da raiva (Modelska *et al.*, 1998); vírus do FMDV (*foot-and-mouth disease virus*) (Carrilo *et*

al., 1998), doença de importância econômica que afeta a produção de carne e leite animal; vírus Norwalk (Mason *et al.*, 1996), principal agente causal de gastroenterite não-bacteriana; e citomegalovírus humano (Tackaberry *et al.*, 1999).

A capacidade que as partículas virais do tipo VLP têm de intensificar a resposta imune pode ser também explorada alternativamente através da produção de proteínas virais quiméricas. Nesta estratégia, a partícula viral atua como portadora do antígeno vacinal, que se encontra fusionado à proteína da capa viral (CP – *capside protein*). Além de vírus de bactérias e de animais, tem sido proposto o uso de vírus de plantas como agentes apresentadores de antígenos (Lomonossoff & Johnson, 1996; Porta & Lomonossoff, 1998). Os vírus de plantas apresentam vantagens devido à facilidade de produção e alta estabilidade. Vírus recombinantes do mosaico do tabaco (TMV), mosaico do feijão-de-corda (CMV), mosaico da alfafa (AIMV), e vírus X de batata (PVX), encontram-se entre os vírus de plantas mais explorados na expressão de diversos determinantes antigênicos de patógenos humanos e de animais (Usha *et al.*, 1993; Kumagai *et al.*, 1993; Porta *et al.*, 1994; Sugiyama *et al.*, 1995; Turpen *et al.*, 1995; McLain *et al.*, 1996; Beachy *et al.*, 1996; Dalsgaard *et al.*, 1997; Yusibov *et al.*, 1997; Mor *et al.*, 1998; Meloen *et al.*, 1998; Brennan *et al.*, 1999a, b, c).

O vírus do mosaico do tabaco, um dos vírus usados como portadores mais bem caracterizados, apresenta o genoma constituído por uma molécula de RNA de aproximadamente 6,5 kb, empacotada por uma hélice formada por cerca de 2130 subunidades da proteína CP (Figura 8). Como a infectividade dos vírus depende da estabilidade e da capacidade de agregação das proteínas CP, sua utilização como portadoras permite a expressão de determinantes antigênicos contendo em média 20 resíduos de aminoácidos. As seqüências nucleotídicas codificadoras destes peptídeos devem ser inseridas em regiões que não perturbem as interações entre as proteínas formadoras da capa viral. No TMV, as principais regiões de inserção estão localizadas nas extremidades amino- e carboxi-terminal, e também, em uma alça interna. A Figura 8 mostra que estas regiões encontram-se expostas na superfície do vírus, diminuindo desta forma a possibilidade de desestabilização do capsídeo, e aumentando a eficácia do sistema de apresentação de antígeno. Mesmo assim, em alguns casos a produção de CP recombinante interfere sensivelmente no empacotamento do vírus. Para minimizar este efeito na infectividade viral, geralmente adota-se a estratégia de produção de capsídeos mistos compostos de CPs nativas e recombinantes (Figura 8). Os capsídeos mistos apresentam maior eficiência de agregação e podem ser obtidos através da utilização de dois vírus mutantes, um deles codificando a CP recombinante e o segundo apresentando mutação no gene que codifica a proteína responsável pela translocação do vírus na planta (Beachy *et al.*, 1996). A expressão conjunta dos genes dos dois vírus determina a formação de partículas virais mistas. Alternativamente, os capsídeos mistos podem ser também obtidos utilizando-se um único vírus que apresenta no gene que codifica a CP recombinante um sinal de terminação de tradução antecedendo a região de inserção. Neste vírus, o códon de terminação UAG encontra-se em um contexto que permite ao sistema de tradução decodificar de forma aleatória o sinal de terminação introduzindo um resíduo de tirosina, possibilitando assim a produção de uma mistura de CPs contendo ou não o inserto (Skuzeski *et al.*, 1991). Esta estratégia foi utilizada na expressão de determinantes antigênicos da malária (Turpen *et al.*, 1995), de um vírus da gripe e do HIV-I (Sugiyama *et al.*, 1995).

As plantas transgênicas, ao contrário do sistema de expressão mediado por vírus, não apresentam limitação de tamanho para a proteína recombinante, podendo portanto serem utilizadas na produção de antígenos de maior complexidade. Deste modo, foram expressos antígenos bacterianos vacinais como a toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enteropatogênica (Haq *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1998; Tacket *et al.*, 1998), e a toxina colérica de *Vibrio cholerae* (CT) (Hein *et al.*, 1996; Arakawa *et al.*, 1998). Estas bactérias colonizam o intestino delgado, produzindo diarréia aguda. As toxinas LT e CT apresentam estrutura e função similares. São proteínas hexaméricas constituídas por uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade A, de aproximadamente 27 kDa, apresenta atividade tóxica de ADP ribosil transferase. Esta subunidade associa-se, por intermédio de ligações não covalentes, à estrutura em forma de argola formada pelo pentâmero resultante da associação das cinco subunidades do tipo B (Figura 9). As toxinas LT e CT ligam-se através de interações específicas entre as moléculas da subunidade B e o gangliosídeo GM1, presente nas células superficiais do epitélio intestinal (Sprangler, 1992). Haq *et al.* (1995) demonstraram a formação espontânea de estruturas pentaméricas de LT-B em batatas transgênicas. Mostraram também que camundongos alimentados com a batata transgênica apresentavam uma fraca resposta imune. Posteriormente, o mesmo grupo produziu uma linhagem de batata transgênica que apresentava maiores níveis do antígeno LT-B. Esta nova linhagem de batata foi capaz de estimular forte resposta imune e promover proteção parcial em camundongos (Mason *et al.*, 1998) e humanos (Tacket *et al.*, 1998).

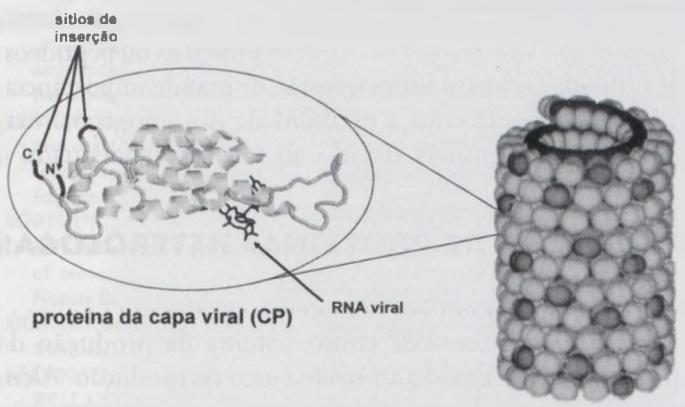


FIGURA 8. Vírus do mosaico do tabaco como portador de antígenos vacinais. À direita encontra-se representada a estrutura de um TMV onde o RNA está empacotado por um capsídeo misto, constituído por proteínas formadoras da capa viral (CP – *capside protein*) nativas e recombinantes. À esquerda encontra-se representada a estrutura de uma CP nativa, onde encontram-se apontados os sítios preferênciais de inserção dos peptídeos antigênicos, e a região que interage diretamente com o RNA viral. Encontram-se também indicadas as posições das extremidades amino (N) e carboxílica (C) da CP. A estrutura foi obtida através das coordenadas atômicas descritas na entrada 2TMV do *Protein Data Bank* (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) (Namba *et al.*, 1989).

O principal propósito da produção de vacinas em plantas comestíveis ou através da utilização de portadores virais é permitir a inoculação pela ingestão direta ou inalação, sem a necessidade do envolvimento de métodos complexos

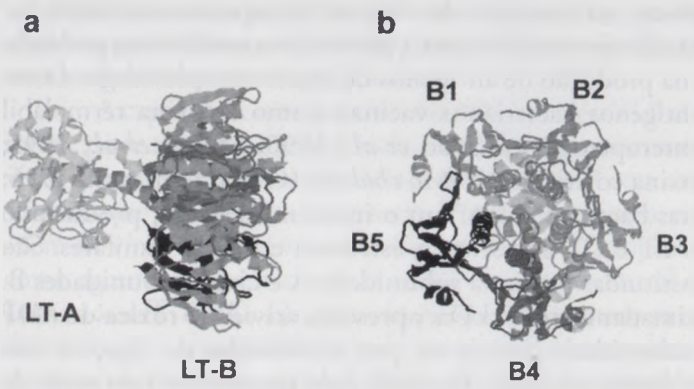


FIGURA 9. Estrutura tridimensional da enterotoxina LT de *E. coli* enteropatogênica. (a) estrutura hexamérica da LT, mostrando a interação entre a subunidade A e o conjunto das cinco subunidades B. (b) estrutura pentamérica formada pela interação das cinco subunidade do tipo B. As estruturas foram obtidas a partir das coordenadas atômicas da entrada 1LTS do *Protein Data Bank* (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) (Sixma *et al.*, 1993).

de purificação e processamento. Entretanto, um grande número de questões deve ser clarificado antes que a eficiência de tais produtos seja assegurada. Muitos dos antígenos vacinais são glicoproteínas que requerem a ação de glicosidases, proteases e chaperoninas específicas para a obtenção de uma proteína com estrutura e função corretas. Portanto, pequenas modificações pós-traducionais podem afetar a potência imunizante destas proteínas ou peptídeos. A avaliação da dosagem a ser utilizada constitui outra questão de grande importância. Esta questão está relacionada não somente com a estabilidade dos antígenos, mas também com a possível indução de tolerância devido ao seu uso inadequado e excessivo.

7. VANTAGENS DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLANTAS

As plantas apresentam grande potencial como sistema de produção de proteínas recombinantes, principalmente devido ao baixo custo de produção. Além de representarem a biomassa de menor custo da natureza, geralmente não apresentam proteínas homólogas às dos animais, permitindo a utilização de processos menos complexos e dispendiosos na purificação de proteínas recombinantes para uso clínico humano e veterinário. Apesar das diferenças no processamento pós-traducional em relação aos animais, as plantas representam uma interessante alternativa para a produção de proteínas que demandam processamento específico. Possivelmente, os sistemas de processamento das plantas poderão, no futuro, através de modificações genéticas, serem adaptados para promover modificações similares às dos animais. Devido ao desconhecimento de patógenos de plantas com capacidade de infectar animais, ao contrário do que ocorre com os sistemas de expressão baseados em cultura de células de mamíferos ou animais transgênicos, a utilização de plantas na produção de proteínas de interesse farmacêutico apresenta baixo risco de contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAWA, T.; CHONG, D.K.X.; LANGRIDGE, W.H.R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. **Nature Biotechnology**, v.16, p.292-297, 1998.

ARTSAENKO, O.; PEISKER, M.; ZUR NIDEN, U.; FIEDLER, U.; WEILER, E.W.; MUNTZ, K.; CONRAD, U. Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco. **Plant Journal**, v.8, p.745-750, 1995.

AUSTIN, S.; BINGHAM, E.T.; KOEGEL, R.G.; MATHEWS, D.E.; SHAHAN, M.N.; STRAUB, R.J.; BURGESS, R.R. An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfafa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.721, p.235-244, 1994.

BEACHY, R.N.; FITCHEN, J.H.; HEIN, M.B. Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.796, p.43-49, 1996.

BEDNAREK, S.Y.; RAIKHEL, N.V. Intracellular trafficking of secretory proteins. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.133-150, 1992.

BEM-BASSAT, A.; BAUER, K.; CHANG, S.-Y.; MYAMBO, K.; BOOSMAN, A.; CHANG, S. Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.751-757, 1987.

BESSEN, D.; FISCHETTI, V.A. Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, p.1945-1950, 1988.

BORISJUK, N.V.; BORISJUK, L.G.; LOGENDRA, S.; PETERSEN, F.; GLEBA, Y.; RASKIN, I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. **Nature Biotechnology**, v.17, p.466-469,1999.

BRADLEY, M.K. Overexpression of proteins in eukaryotes. **Methods in Enzymology**, v.182, p.112-143, 1990.

BRENNAN, F.R.; JONES, T.D.; GILLELAND, L.B.; BELLABY, T.; XU, F.; NORTH, P.C.; THOMPSON, A.; STACZEK, J.; LIN, T.; JOHNSON, J.E.; HAMILTON, W.D.O.; GILLELAND, H.E. *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. **Microbiology**, v.145, p.211-220, 1999a.

BRENNAN, F.R.; BELLABY, T.; HELLIWELL, S.M.; JONES, T.D.; KAMSTRUP, S.; DALSGAARD, K.; FLOCK, J.-I.; HAMILTON, W.D.O. Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune response in mice. **Journal of Virology**, v.73, p.930-938, 1999b.

BRENNAN, F.R.; JONES, T.D.; LONGSTAFF, M.; CHAPMAN, S.; BELLABY, T.; SMITH, H.; XU, F.; HAMILTON, W.D.O.; FLOCK, J.-I. Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. **Vaccine**, v.17, p.1846-1857, 1999c.

CABANES-MACHETEAU, M.; FICHETTE-LAINE, A.C.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; LANGE, C.; VINE, N.D.; MA, J.K.; LEROUGE, P.; FAYE, L. N-glycosilation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco. **Glycobiology**, v.9, p.365-372, 1999.

CALLIS, J.; FROMM, M.; WALBOT, V. Introns increase gene expression in cultured maize cells. **Genes Development**, v.1, p.1183-1200, 1987.

CARRILO,C.; WIGDOROVITZ, A.; OLIVEROS, J.C.; ZAMORANO, P.I.; SADIR, A.M.; GÓMES, N.; SALINAS, J.; ESCRIBANO, J.M.; BORCA, M.V. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. **Journal of Virology**, v.72, p.1688-1690, 1998.

CHRISPEELS, M.J. Sorting of proteins in the secretory system. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.21-53, 1991.

CLARK, A.J.; ARCHIBALD, A.L.; BESSOS, H.; HARRIS, S.; McCLENAGHAN, M.; PROWSE C, SIMONS, J.P.; WHITELAW. The molecular manipulation of milk composition. **Genome**, v.31, p.950-955, 1989.

CRAMER, C.; WEISSENBORN, D.L.; OISHI, K.K.; GRABAU, E.A.; BENNETT, S.; PONCE, E.; GRABOWSKI, G.A.; RADIN, D.N. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.796, p.62-71, 1996.

CONRAD, U.; FIEDLER, U Expression of engineered antibodies in plant cells. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1023-1030, 1994.

DALSGAARD, K.; UTTENTHAL, A.; JONES, T.D.; XU, F.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W.D.O.; LANGEVELD, J.P.M.; BOSHUIZEN, R.S.; KAMSTRUP, S.; LOMONOSSOF, G.P.; PORTA, C.; VELA, C.; CASAL, J.I.; MELOEN, R.H.; RODGERS, P.B. Plant derived vaccine protects target animals against a virus disease. **Nature Biotechnology**, v.15, p.248-252, 1997.

DE CLERQ, A.; VANDEWIELE, M.; DE RYCKE, R.; VAN DAMME, J.; VAN MONTAGU, M.; KREBBERS, E.; VANDKERCKHOVE, J. Expression and processing of an *Arabidopsis* 2S albumin in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v.92, p.899-907, 1989.

DRICKAMER, K. Clearing up glycoprotein hormones. **Cell**, v.67, p.1029-1032, 1991.

DURING, K.; HIPPER, S.; KREUZALER, F.; SCHELL, J. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Molecular Biology**, v.15, p.281-293, 1990.

FIEDLER, U.; CONRAD, U. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. **Bio/Techonology**, v.13, p.1090-1093, 1995.

FIREK, S.; DRAPER, J.; OWEN, M.R.L.; GANDECHA, A.; COCKBURN, W.; WHITELAM, G.C. Secrection of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, v.23, p.861-870, 1993.

FITCHETTE-LAINÉ, A.C.; GOMORD, V.; CABANES-MACHETEAU, M.; MICHALSKI, J.C.; SAINT-MACARY, M.; FOUCHER, B.; CAVELIER, B.; HAWES, C.; LEROUGE,. FAYE, L. N-glycans harboring the Lewis^a epitope are expressed at surface of plant cells. **Plant Journal**, v.12, p.1411-1417, 1997.

FRASER, M.J. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.158, p.131-172, 1992.

GALILI, G.; SENGUPTA-GOPALAN, C.; CERIOTTI, A. The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.1-29, 1998.

GALLIE, D.R. Translational control of cellular and viral mRNAs. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.145-158, 1996.

GODDIJN, J.M.; PEN, J. Plant as bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v.13, p. 379-387, 1995.

GORDON, K.; LEE, E.; VITALE, J.A.; SMITH, A.E.; WESTPHAL, H.; HENNIGHAUSEN, L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. **Bio/Technology**, v.5, p.1183-1187, 1987.

GRAY, D. Overview of protein expression by mammalian cells. In: COLIGAN, J.E, DUNN, B.M.; PLOEGH, H.L.; SPEICHER, D.W.; WINGFIELD, P.T. (Ed.) **Current protocols in protein science**. Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.5.9.1-5.9.18

HAQ, T.A.; MASON, H.S.; CLEMENTS, J.D.; ARNTZEN, C.J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. **Science**, v.268, p.714-716, 1995.

HARRIS, B. Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.290-296, 1999.

HEIN, M.B.; YEQ, T.-C.; WANG, F.; SUTURTEVANT, A. Expression of cholera toxin subunits in plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.796, p.50-61, 1996.

HIATT, A. Antibodies produced in plants. **Nature**, v. 344, p.469-470, 1990.

HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, v.342, p.76-78, 1989.

HIGGINS, D.R. Overview of protein expression in Pichia pastoris. In: COLIGAN, J.E.; DUNN, B.M.; PLOEGH, H.L.; SPEICHER, D.W.; WINGFIELD, P.T. (Ed.) **Current Protocols in Protein Science**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p.5.7.1-5.7.16

HOOD, E.E.; WITCHER, D.R.; MADDOCK, S.; MEYER, T.; BASZCSZYNSKI, C.; BAILEY, M.; FLYNN, P.; REGISTER, J.; MARSHALL, L.; KULISEK, E.; KUSNADI, A.; EVANGELISTA, R.; NIKOLOV, Z.; WOOGE, C.; MEHIGH, R.J.; HERNAN, R.; KAPPEL, W.K.; RITLAND, D.; LI, C.P.; HOWARD J.A. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. **Molecular Breeding**, v.3, p.291-306, 1997.

HUANG, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.177-200, 1992.

HUNT, A.G. Messenger RNA 3' end formation in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.47-60, 1994.

JENKINS, N.; PAREKH, R.B.; JAMES, D.C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, v.14, p.975-981, 1996.

JONG, J.J.; BAAN, E.; GOUDSMIT, J.; ARNTZEN, C.J.; MASON, H.S. Expression of the *gag* gene of HIV-1 in potato plants. In: BROWN, F.; NORRBY, E.; BURTON, D.; MEKALANOS, J. (Ed.) **Vaccines 96: Molecular approaches to the control of infectious diseases**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 195p.

KAUFMAN, R.J. Vectors used for expression in mammalian cells. **Methods in Enzymology**, v.185, p.537-566, 1990.

KERR, D.E.; LIANG, F.; BONDIOLI, K.R.; ZHAO, H.; KREIBICH, G.; WALL, R.J.; SUN, T.-T. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. **Nature Biotechnology**, v.16, p.75-79, 1998.

KIM, H.; YAMAGUCHI, Y.; MASUDA, K.; MATSUNAGA, C.; YAMAMOTO, K.; IRIMURA, T.; TAKAHASHI, N.; KATO, K.; ARATA, Y. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.12345-12350, 1994.

KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v.54, p.631-664, 1985.

KOSAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messengers RNAs. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.8125-8148, 1987.

KRANTZ, S.B. Erythropoietin. **Blood**, v.77, p.419-434, 1991.

KUMAGAI, M.K.; TURPEN, T.H.; WEINZETTL, N.; DELLA-CIOPPA, G.; TURPEN, A.M.; DONSON, J.; HILF, M.E.; GRANTHAM, G.L.; DAWSON, W.O.; CHOW, T.P.; PIATAK, M.; GRILL, L.K. Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.427-430, 1993.

KUSNADI, A.R.; NIKOLOV, Z.L.; HOWARD, J.A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, p.473-484, 1997.

LA VALLIE, E.R.; DIBLISIO, E.A.; KOVACIC, S.; GRANT, K.L.; SCHENDEL, P.F.; MCCOY, J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Bio/Technology**, v.11, p.187-193, 1993.

LAMM, M.E. Interactions of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.311-340, 1997.

LEITE, A.; KEMPER, E.L.; DA SILVA, M.J.; LUCHESSI, A.D.; SILOTO, R.M.P.; BONACCORSI, E.D.; EL-DORRY, H.F.; ARRUDA, P. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. **Molecular Breeding**, v.6, p.47-53, 2000.

LEROUG, P.; CABANES-MACHETEAU, M.; CATHERINE, R.; FISCHETTE-LAINÉ, A.-C.; GOMORD, V.; FAYE, L. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.31-48, 1998.

LOMONOSSOFF, G.P.; JOHNSON, J.E. Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. **Current Opinion in Structural Biology**, v.6, p.176-182, 1996.

LONGSTAFF, M.; NEWELL, C.A.; BOONSTRA, B.; STRACHAN, G.; LEARMONTH, D.; HARRIS, W.J.; PORTER, A.J.; HAMILTON, W.D.O. Expression and characterization of single-chain antibody fragments produced in transgenic plants against the organic herbicides atrazine and paraquat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1281, p.147-160, 1999.

MA, J.K.-C.; HUNJAN, M.; SMITH, R.; KELLY, C.; LEHNER, T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. **Infectology and Immunology**, v.58, p.3407-3414, 1990.

MA, J.K.-C.; HEIN, M.B. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.522-527, 1995.

MA, J.K.-C.; HEIN, M.B. Antibody production and engineering in plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.796, p.72-81, 1996.

MA, J.K.-C.; HIATT, A.; HEIN, M.; VINE, N.D.; WANG, F.; STABILA, P.; VAN DOLLEWEERD, C.; MOSTOV, K.; LEHNER, T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. **Science** v.268, p.716-719, 1995.

MAINA, C.V.; RIGGS, P.D.; GRANDEA, A.G.; SLATKO, B.E.; MORAN, L.S.; TAGLIAMONTE, J.A.; MCREYNOLDS, L.A.; GUAN, C. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. **Gene**, v.74, p.365-373, 1988.

MASCARENHAS, D.; METTLER, L.J.; PIERCE, D. A.; LOWE, H. W. Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. **Plant Molecular Biology**, v.15, p.913-920, 1990.

MASON H.S.; LAM, D.M.-K.; ARNTZEN, C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.11745-11749, 1992.

MASON, H.S.; ARNTZEN, C.J. Transgenic plants as vaccine production systems. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.388-392, 1995.

MASON, H.S.; BALL, J.M.; SHI, J.-J.; JIANG, X.; ESTES, M.K.; ARNTZEN, C.J. Expression of Norwalk virus capsid protein transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.5335-5340, 1996.

MASON, H.S., HAQ, T.A.; CLEMENTS, J.D.; ARNTZEN, C.J. Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. **Vaccine**, v.16, p.1336-1343, 1998.

MAAS, C.; LAUFS, J.; GRANT, S.; KORGHAGE, C.; WERR,W. The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. **Plant Molecular Biology**, v.16, p.199-207, 1991.

MATSUMOTO, S.; IKURA, K.; UEDA, M.; SASAKI, R. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.1163-1172, 1995.

McELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, v.2, p.163-171, 1990.

McLAIN, L.; DURRANI, Z.; WISNIEWSKI, L.A.; PORTA, C.; LOMONOSSOFF, G.P.; DIMMOCK, N.J. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. **Vaccine**, v.14, p.799-810, 1996.

MEADE, J.; GATES, L.; LACY, E.; LONBERG, N. Bovine alpha-S1-casein gene-sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. **Bio/Technology**, v.8, p.443-446, 1990.

MELOEN, R.H.; HAMILTON, W.D.O.; CASAL, J.I.; DALSGAARD, K.; LANGEVELD, J.P.M. Edible vaccines. **Veterinary Quaterly**, v.20, p.S92-S95, 1998.

MILLER, C.G.; STRAUCH, K.L.; KURRAL, A.M.; MILLER, J.L.; WINGFIELD, P.T.; MAZZEI, G.J.; WERLEN, R.C.; GRABER, P.; MOVVA, N.R. N-terminal methionine-specific peptidase in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84, p.2718-2722, 1987.

MODELSKA, A.; DIETZSCHOLD, B.; SLEYSH, N.; FU, A.F.; STEPLEWSKI, K.; HOOPER, C.; KOPOWSKI, H.; YUSIBOV, V. Immunization against rabies with plant-derived antigen. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.95, p.2481-2485, 1998.

MOLONEY, M.M.; HOLBROOK, L.A. Subcellular targeting and purification of recombinant proteins in plant production systems. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.14, p.321-336, 1997.

MOR, T.S.; GÓMEZ-LIM, M.A.; PALMER, K.E. Perspective: edible vaccines: a concept coming of age. **Trends in Microbiology**, v.6, p.449-453, 1998.

MURRAY, E.E.; LOTZER, J.; EBERLE, M. Codon usage in plant genes. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.477-498, 1989.

NAMBA, K.; PATTANAYEK, R.; STUBBS, G. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 angstroms resolution by X-ray fiber diffraction. **Journal of Molecular Biology**, v.208, p.307-325, 1989.

NILSSON, B.; ABRAHMSEN, L.; UHLEN, M. Immobilization and purification of enzymes with staphylococcal protein-A gene fusion vectors. **EMBO Journal**, v.4, p.1075-1080, 1985.

OWEN, M.; GANDECHA, A.; COCKBURN, B.; WHITELAM, G. Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. **Bio/Technology**, v.10, p.790-794, 1992.

PARMENTER, D.L.; BOOTHE, J.G.; VAN ROOIJEN, G.J.H.; YEUNG, E.C.; MOLONEY, M.M. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.1167-1180, 1995.

PEN, J.; MOLENDIJK, L.; QUAX, W.J.; SIJMONS, P.C.; VAN OOYEN, A.J.J., VAN DEN ELZEN, P.J.M.; RIETVERD, K.; KOEKEMA, A. Production of active bacillus-licheniformis alpha–amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. **Bio/Technology**, v.10, p.292-296, 1992.

PEN, J.; VERWOERD, T.C.; VAN PARIDON, P.A.; BEUDEKER, R.F.; VAN DEN HELZEN, P.J.M.; GEERSE, K.; VAN DER KLIS, J.A.; VERTEEGH, H.A.H., VAN OOYEN, A.J.J.; HOEKEMA, A. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. **Bio/Technology**, v.11, p.811-814, 1993.

PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.F.; McPHERSON, S.L.; FISCHOFF, D.A. Modification of the coding sequences enhances plant expression of insect control protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.3324-3328, 1991.

PITTIUS, C.W.; HENNIGHAUSE, L.; LEE, E.; WESTPHAL, H.; NICOLS, E.; VITALE, J.; GORDON, K. A milk protein gene promoter directs the expression of human-tissue plasminogen-activator cDNA to the mammary-gland in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.5874-5878, 1988.

PORTA, C.; LOMONOSSOFF, G.P. Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens. **Reviews in Medical Virology**, v.8, p.25-41, 1998.

PORTA, C.; SPALL, V.E.; LOVELAND, J.; JOHNSON, J.E.; BARKER, P.J.; LOMONOSSOFF, G.P. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. **Virology**, v.202, p.949-955, 1994.

RATNER, M. Protein expression in yeast. **Bio/Technology**, v.7, p.1129-1133, 1989.

REGISTER III, J.C. Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.141-146, 1997.

REITER, Y.; PASTAN, I. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.513-520, 1998.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v.8, p.423-488, 1992.

RUTHER, U.; MÜLLER-HILL,B. Easy identification of cDNA clones. **EMBO Journal**, v.2, p.1791-1794, 1983.

SKUZESKI, J.M.; NICHOLS, L.M.; GESTELAND, R.F.; ATKINS, J.F. The signal for a leaky UAG stop condon in several plant viruses includes the two dowstream codons. **Journal of Molecular Biology**, v.218, p.365-373, 1991.

SHERMAN, F.; STEWART, J.W.; TSUNASAWA, S. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. **Bioessays**, v.3, p.27-31, 1985.

SHEWRY, P.R.; NAPPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v.7, p.945-956, 1995.

SIXMA, T.K.; VAN ZANTEN, B.A.M.; DAUTER, Z.; HOL, W.G.J. Refined structure of *E. coli* heat labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **Journal of Molecular Biology**, v.230, p.890-918, 1993.

SIJMONS, P.C.; PETER, C.S.; DEKKER, B.M.M.; SCHRAMMEIJER, B.; VERWOERD, T.C.. VAN DEN ELZEN, P.J.M.; HOEKEMA, A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. **Bio/Technology**, v.8, p.217-221, 1990.

SMITH, D.B.; JOHNSON, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. **Gene**, v.67, p.31-40, 1988.

SMITH, M.D. Antibody production in plants. **Biotechnology Advances**, v.14, p. 267-281, 1996.

SPRANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Microbiology Reviews**, v.56, p.622-647, 1992.

STAATS, H.F.; JACKSON, R.J.; MARINARO, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current Opinion in Immunology**, v.6, p.572-583, 1994.

SUGIYAMA, Y.; HAMAMOTO, H.; TAKEMOTO, S.; WATANABE, Y.; OKADA, Y. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. **FEBS Letters**, v.359, p.247-250, 1995.

SULLIVAN, M.L.; GREEN, P.J. Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants: the roles of mRNA stability and translation. **Plant Molecular Biology**, v.23, p.1091-1104, 1993.

TACKABERRY, E.S.; DUDANI, A.K.; PRIOR, F.; TOCCHI, M.; SARDANA, R.; ALTOSAAR, I.; GANZ, P.R. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. **Vaccine**, v.17, p.3020-3029, 1999.

TACKET, C.O.; MASON, H.S.; LOSONSKY, G.; CLEMENTS, J.D.; LEVINE, M.M.; ARNTZEN, C. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. **Nature Medicine**, v.4, p.607-609, 1998.

THANAVALA, Y.; YANG, Y.-F.; LYONS, P.; MASON, H.S.; ARNTZEN, C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.3358-3361, 1995.

TAVLADORAKI, P.; BENVENUTO, E.; TRINCA, S.; DE MARTINIS, D.; CATTANEO, A.; GLAEFFI, P. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. **Nature**, v.366, p.469-472, 1993.

TOPFER, R.; MASS, C.; HORICKE-GRANDPIERRE, C.; SCHELL, J.; STEINBISS, H.H. Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. **Methods in Enzymology**, v.217, p.66-79, 1993.

TURPEN, T.H.; REINI, S.J.; CHAROENVIT, Y.; HOFFMAN, S.L.; FALLARME, V.; GRILL, L.K. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. **Bio/Technology**, v.13, p.53-57, 1995.

USHA, R.; ROHLL, J.B.; SPALL, V.E.; SHANKS, M.; MAULE, A.J.; JOHNSON, J.E.; LOMONOSSOFF, G.P. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. **Virology**, v.97, p.366-374, 1993.

VANDEKERCKHOVE, J.; VAN DAMME, J.; VAN LIJSEBETTENS, M.; BOTTERMAN, J.; DE BLOCK, M.; VANDEWIELE, M.; DE CLERCQ, A.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; KREBBERS, E. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. **Bio/Technology**, v.7, p.929-932, 1989.

VELANDER, W.H.; LUBON, H.; DROHAN, W. Transgenic livestock as drug factors. **Scientific American**, v.276, p.70-74, 1997.

VOSS, A.; NIERSBACH, M.; HIRSCH, H.J.; LIAO, Y.C.; REUZALER, F.; FISCHER, R. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. **Molecular Breeding**, v.1, p.39-50, 1995.

YUSIBOV, V.; MODELSKA, A.; STEPLEWSKI, K.; AGADJANYAN, M.; WEINER, D.; HOOPER, D.C.; KOPROWSKI, H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies and HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.5784-5788, 1997.

WALKER, R.I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. **Vaccine**, v.12, p.387-400, 1994.

WHITELAM, G.C.; COCKBURN, W. Antibody expression in transgenic plants. **Trends in Plant Science**, v.1, p.268-272, 1996.

WHITELAM, G.C.; COCKBURN, B.; GANDECHA, A.R.; OWEN, M.R.L. Heterologous protein production in transgenic plants. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.11, p.1-29, 1993.

WITCHER, D,R.; HOOD, E.E.; PETERSON, D.; BAILEY, M.; BOND, D.; KUSNADI, A.; EVANGELISTA, R.; NIKOLOV, Z.; WOOGE, C.; MEHIGH, R.; KAPPE, W.; REGISTER, J.; HOWARD, J.A. Commercial production of β-glucoronidase (GUS): a model system for the production of protein in plants. **Molecular Breeding**, v.4, p.301-312,1998.

WRIGHT A.; MORRISON, S.L. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.26-32, 1997.

ZHONG, G.-Y.; PETERSON, D.; DELANEY, D.E.; BAILEY, M.; WITCHER, D.R.; REGISTER III, J.C.; BOND, D.; LI, C.P.; MARSHALL, L.; KULISEK, E.; RITLAND, D.; MEYER, T.; HOOD, E.E.; HOWARD, J.A. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. **Molecular Breeding**, v.5, p.345-356, 1999.

34

A INFORMÁTICA NO MELHORAMENTO GENÉTICO

COSME DAMIÃO CRUZ

Depto. de Biologia Geral - UFV - CEP: 36571-000 - Viçosa, MG.

1. HISTÓRICO

A computação estuda os métodos de obtenção de soluções para problemas de cálculo. Apresentou grande evolução a partir do aparecimento do computador, uma máquina que contém componentes eletrônicos com capacidade para efetuar operações aritméticas e lógicas com grande velocidade, e sem a intervenção humana. O computador é hoje instrumento indispensável, para realizar as mais diversas tarefas, dentre elas, auxiliar o pesquisador em trabalhos científicos, pois reúne qualidades básicas que o torna instrumento fundamental na análise e processamento de dados. Além da alta velocidade no processamento das informações, é possível o armazenamento de grande volume de dados e, por meio do desenvolvimento de programas, é possível executar um conjunto enorme de procedimentos estabelecidos pelo programador.

A necessidade de se realizar cálculos é tão antiga quanto a própria história da humanidade, mas somente a partir da invenção de instrumentos básicos é que se teve início ao processamento moderno. As primeiras máquinas de calcular, com princípios de mecânica, foram inventadas no início do século XVII. É relatado que a primeira calculadora surgiu em 1617, com invento do cientista Napier, sendo aperfeiçoada em 1642, por Blaise Pascal. Um dos grandes passos, também ocorrido nesta época, para o avanço do processamento foi a introdução do sistema binário, que permite representar todos os números, usando apenas os algarismos 0 e 1. Este sistema constitui hoje a base de toda a linguagem de computadores.

Os computadores de hoje, idealizados por Charles Babagge e Herman Hollerit, datam do século XIX, onde os equipamentos disponíveis já podiam ser controlados por programas determinados pelo homem. Posteriormente, com o advento da Segunda Guerra Mundial, foi desenvolvido, na Universidade de Harvard, nos EUA, o primeiro computador com componentes eletrônicos, denominado MARK I. Em 1945 foi inaugurado o computador ENIAC, mais veloz, contando com 1,5 mil reles, 18.000 válvulas e consumia 200 mil Watts de calor. Sete anos depois este equipamento já era obsoleto.

Na década de 50 ocorreu uma grande revolução tecnológica, dando origem a primeira geração de computadores, baseados em válvulas eletrônicas. O grande entrave, além das características da própria máquina, estava associada ao fato de que a programação tinha que ser realizada em linguagem de máquina, ou seja, pela manipulação dos dígitos 0 e 1. Iniciando a década de 60, deram início a produção de computadores nos quais as válvulas foram substituídas por transistores, reduzindo consideravelmente o tamanho da máquina. A linguagem de programação foi bastante simplificada por comandos alfabéticos abreviados (mneumônicos), dando origem a linguagem *Assembler*.

No Brasil, o primeiro computador foi adquirido pela Universidade Católica do Rio de Janeiro, em 1960. Tratava-se do Burroughs B-25, equipamento considerado de primeira geração.

A partir da década de 70 surgiram os computadores considerados de quarta geração, cuja característica principal é a miniaturização. Assim os minúsculos circuitos

integrados substituíram os transistores na constituição principal do computador. Todos os componentes eletrônicos foram fundidos num único cristal de dimensões microscópicas, denominados *chips*. Atualmente, com os intensos investimentos em tecnologia e formação de profissionais da área, aliado à própria ambição humana, é difícil predizer os limites das máquinas, suas opções funcionais, seus desempenhos e suas aplicações. Procura-se desenvolver poderosos cérebros eletrônicos capazes de resolver desde problemas caseiros até os mais inquietantes problemas da raça humana. O computador é hoje um objeto indispensável igualando-se aos eletrodomésticos de uso cotidiano. É capaz de administrar o lar, a microempresa, a indústria, as instituições públicas, privadas e governamentais. É pouco provável que se possa ter uma aproximação razoável da previsão da potencialidade e uso de computadores, mesmo num pequeno período de tempo, digamos de três a cinco anos.

2. LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO

É por meio da linguagem de programação que podemos estabelecer comunicação com o computador, e fazer ser entendido por ele, de tal forma que nossos dados sejam convenientemente analisados. A linguagem é um conjunto de códigos, regras e vocabulários que fará com que o computador entenda nossa instrução. Existem três tipos de linguagem. A linguagem de máquina, que é aquela em que a programação é feita diretamente na forma binária, usando a estrutura lógica do computador. Outra linguagem é a simbólica, na qual as instruções, ou comandos, são convertidos para linguagem de máquina por outro programa. Surgiu daí a linguagem *Assembler*, que apesar de ser mais simples, ainda é dependente da estrutura do equipamento. Por fim, têm-se as linguagens de alto nível, em que os programas são desenvolvidos com características mais amigáveis, e que podem ser repassados entre equipamentos. Existem inúmeras linguagens de alto nível, tais como FORTRAN, COBOL, PASCAL, BASIC, dentre outras.

Outro aspecto a ser levado em consideração é o ambiente operacional, sob o qual o programa estará sendo executado. Grande parte dos usuários tem utilizado o sistema *windows*, cuja versão 3.0, a primeira de maior aceitação no mercado, foi introduzida em 1990. A partir desta época, foi incorporado, entre os programadores, o objetivo adicional de desenvolver programas com interface gráfica mais agradável do que, até então, a apresentada no sistema operacional DOS. Como os princípios básicos de programação para ambientes *windows* diferem completamente daqueles adotados no sistema DOS, houve a necessidade de grandes investimentos em conhecimento e adaptação dos programas disponíveis.

Atualmente dispõe-se de várias linguagens de programação orientadas para objetos, tais como o *Visual Basic* e o *Delphi*, tornando o desenvolvimento de procedimentos totalmente gráfico e, conseqüentemente, a linguagem de programação mantém muito pouco da adotada pelos primeiros interpretadores. Aplicativos desenvolvidos neste sistema melhoram o espaço de endereço e as capacidades de gerenciamento do sistema operacional. Por esta razão eles são mais rápidos, mais robustos e mais fáceis de trabalhar em um ambiente de multitarefa do que os aplicativos tradicionais, além de apresentar padrão de qualidade compatível com a exigência e necessidade dos pesquisadores da área.

3. A INFORMÁTICA E A INFORMAÇÃO

Dos grandes fatos que marcaram a evolução da humanidade, citam-se a Revolução Agrícola e a Revolução Industrial. Gradativamente as novas tecnologias foram sendo implementadas promovendo, ao longo de anos, profundas transformações na sociedade, na sua forma de pensar e agir. Tem-se atualmente um novo fator, que para muitos delimita uma nova era. Trata-se da revolução da informação, em que uma quantidade incalculável de informações e de recursos tecnológicos são disponibilizados para cientistas, técnicos, e, principalmente, para o cidadão comum. A era da globalização dá a sensação de que ao não se absorver as informações pode-se ficar, em pouco tempo, ultrapassado. Televisão, vídeo, *cd-rom* e, principalmente os microcomputadores com suas potencialidades, dentre elas o acesso à *internet*, são companheiros diários, em tarefas comerciais, científicas e de lazer.

Constata-se que o uso de recursos computacionais tem sido cada vez mais intenso em todas as atividades do ser humano. Grande parte das dificuldades proporcionadas pela pequena disponibilidade de equipamentos tem sido superada, em particular no meio científico. O computador tem sido equipamento presente em laboratórios de pesquisa, permitindo o pronto processamento, gerenciamento de bancos de dados e edição de textos, gráficos e imagens. Tem sido um instrumento que permite, de forma dinâmica, levar conhecimentos a público, permitindo tanto o ensino como o aprendizado de forma interativa e agradável.

Apesar dos grandes benefícios proporcionados pelos modernos equipamentos e pelas sofisticadas tecnologias, o processo de globalização da informação, fruto deste avanço tecnológico, também está preocupando educadores e pesquisadores. As chamadas novas tecnologias têm colocado os métodos tradicionais em cheque. Uma empresa ou um pesquisador deve sempre se questionar sobre continuar utilizando antigos métodos de trabalho ou aderir às inovações tecnológicas. Muitas vezes o treinamento recém-adquirido, ou a especialização realizada, pode ficar ultrapassada se o indivíduo não tiver atento às inovações.

Os geneticistas, de modo especial, devem estar sempre atentos às mudanças e aos avanços técnicos que se apresentam na atualidade, pois atuam numa área da ciência que desperta grande interesse por tratar de temas que estão diretamente relacionados com a vida do homem. Na genética são enfatizados temas relativos à evolução, à hereditariedade e ao melhoramento e, é possível que muitos dos avanços da humanidade para esse milênio, certamente virão de descobertas e aplicações de princípios genéticos. Apesar da grande motivação e interesse de sempre se incorporar estes novos conhecimentos e estas facilidades operacionais no trabalho do melhorista, os educadores e formadores de especialistas e profissionais, nos diversos níveis, têm razão de terem preocupação adicional sobre estes temas.

O ensino de genética, nos mais diversos níveis de formação acadêmica, não tem sido tarefa fácil, talvez porque a genética abrange várias áreas e associa princípios probabilísticos e conceitos fundamentais de biologia. Adicionalmente, encontra-se na Genética grande diversidade de temas ou de especialização, destacando as áreas de citogenética, mutagênese, evolução, genética molecular, quantitativa e de populações.

Estas áreas motivam, os discentes de diferentes formas, ou são vistas de diferentes maneiras em função da aptidão do discente. Neste contexto, é fundamental que se disponha de mecanismos que permitam levar os conhecimentos, de forma agradável e eficaz, para todos, inclusive para aqueles que, a princípio, não demonstram grande interesse pelo assunto. Verifica-se, que apesar de escassos, os aplicativos computacionais educativos, que gradativamente estão surgindo, serão ferramentas indispensáveis na educação, tornando o seu desenvolvimento uma área promissora entre os profissionais de genética e de informática.

Com estes recursos disponíveis, o problema da formação acadêmica torna-se mais amplo, atingindo o usuário e o educador. Para sua solução e definição de estratégias de ensino, o educador deve considerar que atualmente recebe-se tanta informação fora da escola, por meio das mais diversas mídias e com velocidades alucinantes, que está cada vez mais difícil prender a atenção dos alunos em aulas convencionais. Assim, surge a necessidade de remodelar cursos e métodos de ensino, que existem em função de facilitar a árdua missão de educar além de motivar. Tratando-se de um assunto atual, opiniões diversas ocorrem. Alguns propõem mudanças radicais no meio acadêmico. Outros resistem, com total aversão ao "desconhecido", não gostam nem de falar sobre alterações curriculares, que diria se render à multimídia ou telemática. Do que foi considerado, não há dúvidas de que os recursos audiovisuais, computadores e *internet*, queiram ou não, já são realidades em inúmeras instituições acadêmicas e que estas vias didáticas estão disponíveis. A globalização e a tecnologia disponível revelam que cada vez mais os docentes não devem ser os únicos retentores do conhecimento mas sim um guia para se chegar a ele, pelas diferentes vias.

Apesar das grandes preocupações, verifica-se que, atualmente, há disponibilidade de literatura ampla, a maioria bem ilustrada e com inúmeros exemplos em qualquer espécie de trabalho e, de forma mais abrangente, na espécie humana. Todos estes recursos, considerados aqui como tradicionais, têm atraído leitores e contribuído para que o conhecimento seja repassado aos iniciantes na área. Entretanto, este tipo de abordagem apresentada em livros e artigos se caracteriza por ainda ser feita de forma estática e pouco interativa. Torna-se difícil descrever processos dinâmicos como, por exemplo, a divisão celular ou a síntese de proteínas, em textos ou recursos audiovisuais de uso mais rotineiros, como *slides*, transparências e painéis. Certos exemplos também tornam-se restritos pela dimensão ou dificuldade de cálculo como por exemplo, predição de genótipos e fenótipos envolvendo vários genes segregantes. Assim, acredita-se que além do processamento de dados, rapidez no acesso a informações e todas as outras facilidades atualmente contempladas nos recursos computacionais, aplicativos específicos poderiam vir a complementar esta abordagem tradicional, tendo portanto uso educacional, até então pouco explorado pelos programadores. Acredita-se que programas computacionais educacionais permitirão superar grande parte dos entraves encontrados no ensino e aprendizagem da Genética. A apresentação de ilustrações, fotos, animações e de situações simuladas e aleatorizadas certamente permitirá superar muitos dos entraves para o ensino e aprendizagem de temas de Genética, tornando esta atividade simples, agradável e atraente.

4. A INFORMÁTICA NA GENÉTICA

Para a obtenção de materiais genéticos superiores é necessário que os indivíduos selecionados reúnam, simultaneamente, uma série de atributos favoráveis que lhes confiram rendimento comparativamente mais elevado e que satisfaça às exigências do consumidor. Os princípios teóricos desenvolvidos por inúmeros pesquisadores têm permitido o planejamento e a execução mais eficiente de programas de melhoramento genético e, principalmente, a predição das conseqüências das diferentes estratégias adotadas por melhoristas.

Para que o programa de melhoramento obtenha sucesso, deve-se ter, no contexto de genética quantitativa, uma série de informações da espécie a ser melhorada, dos métodos de melhoramento e das metodologias de análises genético-biométricas disponíveis.

É importante também a realização de experimentos fidedignos, dos quais é obtido grande volume de dados experimentais. Por meio do processamento adequado destes dados os parâmetros genéticos são estimados e os fenômenos biológicos são interpretados. Nesta etapa de análise e interpretação de resultados é fundamental a existência de recursos computacionais e aplicativos eficientes à disposição do pesquisador.

De maneira geral constata-se que na área científica há disponibilidade de vários *softwares* destinados ao processamento de dados segundo variados modelos estatísticos. Esses aplicativos, tanto os desenvolvidos em nosso país quanto no exterior, permitem uma gama de análises que auxiliam de forma considerável o pesquisador por permitir uma condensação de seus dados sem perda de informações indispensáveis à sua pesquisa. Entretanto, quando há necessidade de análises por meio de modelos bioestatísticos, como aqueles usualmente empregados na Genética, tais aplicativos são deficientes por não apresentarem as opções desejadas ou por apresentá-las com informações de certa forma limitadas.

O desenvolvimento de aplicativos na área de Genética e Melhoramento torna-se fundamental pela escassez dos mesmos, tanto no Brasil quanto no exterior. Sua disponibilidade visa atender a uma demanda crescente de usuários nas diversas instituições de pesquisa, que manipulam um grande volume de dados, os quais requerem um processamento adequado, para que parâmetros estatísticos e biológicos sejam convenientemente estimados. Apesar de serem de grande importância, a carência em aplicativos computacionais ocorre, apesar de que, atualmente, há menores limitações quanto à disponibilidade de equipamentos, ambientes e linguagens de programação. Isto ocorre em razão de se ter poucos profissionais que reúnam conhecimentos indispensáveis para identificar os problemas específicos da área de genética e formular soluções computacionais adequadas. O que se verifica é que profissionais da área de informática têm pouco conhecimento dos problemas da área de genética, que apresentam certa complexidade por tratar de fenômenos biológicos e envolver princípios e, de certa forma, complexas distribuições probabilísticas na sua análise. Por outro lado, são raros os geneticistas com conhecimento e aptidão para atuarem na área de informática. Entretanto, com o melhoramento intensivo de muitas espécies, as tomadas de decisões a partir do

processamento de dados tornam fundamentais e, cada vez mais, indispensáveis para nortearem o uso de estratégias que garantam o êxito do programa de melhoramento.

Nas diversas etapas do melhoramento os melhoristas têm a necessidade de utilizar informações, expressas em parâmetros de modelos biométricos, que normalmente não estão disponíveis nas saídas da maioria dos *softwares* disponíveis para a área científica. Assim, por exemplo, metodologias de análises dialélicas, para escolha de genitores para hibridações e formação de populações base para seleção, de avaliação da estabilidade e adaptabilidade, para recomendação de cultivares, de estimação de parâmetros genéticos tais como herdabilidade, correlações etc., para avaliar e direcionar programas de melhoramento, não são geralmente encontradas nos aplicativos difundidos em nossa comunidade científica.

Programas destinados à área de Genética devem ser desenvolvidos atendendo a finalidade básica de análise e processamento de dados, com base em modelos biométricos. Estes programas, com os padrões sofisticados de interface entre usuário e máquina, têm de ser de fácil manuseio, objetivos e abrangentes, atendendo prontamente as exigências do usuário. Adicionalmente, sua compatibilidade com os sistemas operacionais disponíveis e a característica amigável com as planilhas e os editores mais utilizados, são fundamentais na difusão e adoção do aplicativo na comunidade científica.

Alguns aplicativos eficientes e aplicáveis à área de Genética e Melhoramento estão disponibilizados. Entretanto, é fácil de perceber a necessidade de investimentos contínuos na área de programação, em que se têm ciclos bem definidos de avanços, demanda e uso. Cada vez que novos procedimentos são disponibilizados, novas alternativas surgem, em conseqüência de estudos diversificados e possibilidade de análise e interpretação de dados. A escassez que existia de recursos computacionais e de programas para análise, tornavam o uso de certas metodologias restrito, predominando somente algumas poucas por motivos diversos, tais como eficiência, simplicidade, divulgação ou mesmo modismo. Algumas destas metodologias ainda continuam sendo utilizadas, mesmo apresentando problemas ou que não satisfaziam completamente, por falhas de pressuposição, conceitos e adequação.

Exemplos de diversificações de metodologias que são empregadas em estudos ou pesquisas, em função da existência de programas computacionais, são encontrados em várias áreas. Nas metodologias para análise de estabilidade e adaptabilidade, por exemplo, verifica-se que na década de 80 a 90, o uso da metodologia baseada em regressão era rotineira. Procedimentos como o de Eberhart & Russell (1966) eram utilizados tanto em trabalhos científicos como rotineiramente em trabalhos de melhoramento, apesar de existirem na literatura vários outros métodos, alguns complementares outros alternativos. Atualmente, os *softwares* já dispõem de várias metodologias, de modo que o melhorista tem maior flexibilidade, e o fenômeno biológico estudado é mais eficientemente interpretado. O mesmo raciocínio se estende para índice de seleção, cuja eficiência já é comprovada na literatura, mas seu uso é limitado pela dificuldade de se ter dados prontamente disponíveis para o processamento.

A difusão de técnicas multivariadas é outro exemplo evidente do papel fundamental dos programas computacionais. Estas técnicas permitem interpretação simultânea de caracteres, sendo fundamentais em estudos de diversidade genética, seleção simultânea, relação entre caracteres, dentre outros. Alguns *softwares* podem ser considerados como instrumentos fundamentais por viabilizarem o uso destas técnicas, promovendo melhoria da qualidade da informação científica por permitirem o processamento adequado dos dados.

Ainda outro aspecto digno de destaque é a determinação da própria conduta no processamento dos dados. Sabe-se que a qualidade das informações depende da qualidade dos dados experimentais disponíveis e, em outros casos, mesmo com bons dados, o processamento pode ser inadequado por questões de pressuposições. Como exemplo cita-se os problemas danosos e resultados absurdos encontrados em análises de regressão, análise de trilha, correlações canônicas, índice de seleção, quando existem problemas de multicolinearidade. Pesquisadores sem conhecimento mais apropriado usam indiscriminadamente seus dados em certos procedimentos, gerando resultados equivocados. O diagnóstico de multicolinearidade, possível de ser realizado em alguns aplicativos computacionais, tem dado contribuição significativa na avaliação da qualidade e adequação dos dados a análises específicas.

5. PROCESSAMENTO DE DADOS

Geralmente o geneticista realiza suas pesquisas, em diferentes áreas, gerando informações ou dados a respeito de seus estudos biológicos. Essas informações quando quantificáveis, ou seja quando podem ser convertidas numa quantidade bem definida, poderá ser processada para análise e interpretação.

O processamento permite converter um conjunto complexo de dados em outros ordenados, simplificados e fáceis de serem interpretados. Ele pode ser feito de forma manual, quando exclusivamente realizado pelo pesquisador, semi-automático, quando se lança mão de qualquer instrumento de cálculo para auxiliar as tarefas de processamento, e automático, quando a transformação dos dados de entrada em solução, ou saída, é feita exclusivamente pela máquina. Neste caso, a máquina que tem realizado tarefas prolongadas, rápidas e eficientes, é o computador.

O computador é capaz de realizar o processamento, com base em um modelo biológico definido, porque é instruído de programas, onde há uma seqüência de instruções claras e lógicas. Vários pesquisadores têm-se dedicado ao desenvolvimento destes programas ou aplicativos computacionais, com rotinas específicas a serem utilizados em cada área da ciência. A velocidade do processamento e a plataforma amigável são características da máquina que processa os dados, mas a adequação do aplicativo, sua eficácia e qualidade são de responsabilidade da equipe que desenvolve os programas. Assim, é importante que não se atribua ao computador a qualidade de "máquina inteligente", aquela que diferencia o certo do errado. O computador, na verdade, é um eficiente seguidor de instruções, com a vantagem de repetir qualquer seqüência, quantas vezes for necessário, sem o perigo de errar por fadiga (Trevisam, 1986). Na verdade o computador tem pouca inteligência, pois não toma decisões por si só, apenas executa uma série de instruções fornecidas por um programador. Se as instruções forem bem estabelecidas, lógicas e corretas, o computador executará o

processamento com sucesso, caso contrário poderá ter seu processamento interrompido por algum tipo de erro, ou proporcionar uma resposta incorreta, algumas vezes absurda e outras imperceptíveis, provocando conseqüências danosas. Atribuir erros de análise ao computador não é coerente, pois o erro, em essência, é do programador que estabeleceu o programa, e outras vezes é do usuário que não soube operar convenientemente o programa ou fornecer os dados atendendo às particularidades do programa, estando atento para não ultrapassar os limites ou deixar de atender as restrições do aplicativo.

Quando se realiza um estudo e há necessidade do processamento dos dados deve-se ter algumas preocupações básicas. Assim, deve-se considerar a qualidade dos dados disponíveis e a adequação dos mesmos ao modelo biométrico a ser empregado. A qualidade dos dados, depende do cuidado do pesquisador, de seu zelo em garantir que a informação obtida reflita exatamente o fenômeno estudado, e que seu experimento seja implantado e conduzido adotando-se estratégias que permitam minimizar as influências de fatores externos, conduzindo a menores erros experimentais. Algumas vezes a análise é comprometida por erros grosseiros de coleta de dados, pela falta de controle ambiental, inerente ao delineamento utilizado, ou pelo mal planejamento dos ensaios.

As preocupações mencionadas anteriormente advêm de situações interessantes que têm sido verificadas em alguns processamentos de dados e presente em trabalhos científicos. Serão destacados, a seguir, alguns resultados incoerentes no contexto biológico, mas presentes em muitos estudos, como conseqüência de vários fatores, muitos deles inerentes à obtenção e ao processamento de dados. Serão feitas, como ilustrações, abordagens sobre a ocorrência de estimativas negativas de variância genética, de correlações com valores absolutos maiores que a unidade, e resultados aparentemente absurdos, dentre outras.

Trataremos inicialmente do componente de variância genético que, como tal, é por definição sempre positivo. Entretanto, não são raras às vezes em que se estimam componentes de variância negativos que, por si, já são estranhos e, quando utilizados *per se* ou na estimação de outros parâmetros, proporcionam sérios inconvenientes, como, por exemplo, herdabilidades negativas. A obtenção de valores negativos pode ocorrer devido às propriedades de estimadores não-tendenciosos, de um valor real que seja igual ou próximo de zero, levando-se a assumir que o valor negativo encontrado representa a estimativa do valor real zero. Entretanto, quando conjuntos de dados, obtidos de uma mesma população, são analisados e apresentam, em sua maioria, estimativas negativas do valor paramétrico supostamente positivo, deve-se concluir que o método de estimação não é apropriado ou o modelo adotado é inadequado (Kempthorne,1968). Na prática torna-se difícil avaliar a causa da ocorrência destes valores e tomar decisões quanto ao seu significado.

Como ilustração será considerado um exemplo hipotético em que se avaliaram três tratamentos, em ensaio no delineamento inteiramente ao acaso com três repetições (Tabela 1). O resultado da análise de variância é apresentado na Tabela 2.

O que é ilustrado neste exemplo é o fato das variações consideradas residuais, devidas ao acaso, serem maiores do que aquelas verificadas entre tratamentos. O valor da estatística F é inferior a 1 e, caso os tratamentos representassem efeitos aleatórios de genótipos, ter-se-ia componente de variância genético negativo. Dentre

TABELA 1. Exemplo de um ensaio no delineamento inteiramente ao acaso com três repetições.

Tratamentos	Repetições			Médias
T1	3,0	6,0	9,0	6,0
T2	5,4	6,0	6,0	5,8
T3	5,3	12,0	7,6	8,3

TABELA 2. Análise de variância do ensaio no delineamento inteiramente ao acaso.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	11,58	5,7900	0,8387 ns
Resíduo	6	41,42	6,9033	
Média: 6,70	CV(%): 39,21			

outras razões, este valor pode ter ocorrido devido a um padrão característico da variável analisada, ou ter sido conseqüência de um planejamento inadequado, envolvendo a definição de repetição, o controle ambiental, o tamanho da parcela, o próprio número de repetições e a tomada dos dados, dentre outros. Algumas alternativas para contornar o problema de obtenção destes valores negativos são encontradas na literatura. Uma delas é tomar a estimativa negativa como indicação do emprego do modelo inadequado, refazendo as análises sob um novo modelo. Ou ainda, adotar outros métodos de estimação que forneçam apenas estimativas não-negativas, como os métodos Bayesianos ou os de máxima verossimilhança. Searle (1971) recomenda considerar a estimativa negativa como indicativa de dados insuficientes; sugerindo que sejam coletados mais dados e, então, realizar nova análise.

Algumas vezes o próprio pesquisador tende a tomar certas providências, algumas delas improcedentes, ou que levam a resultados que podem não ser de interesse. Assim, como ilustração será considerada a transformação de dados, que muitas vezes é alternativa recomendável, para que pressuposições sejam atendidas e as análises estatísticas tenham validade. No presente caso, a transformação logarítmica destes dados levaria às seguintes médias:

Tratamentos	Média original	Média dos dados transformados
T1	6,0	1,6958
T2	5,8	1,7566
T3	8,3	2,0602

O alerta que se faz, apenas a título de ilustração, sem uma abordagem aprofundada sobre as necessidades ou não de transformações, é o fato de que a mudança de escala pode alterar valores, e a interpretação dos dados. Aqui a transformação alterou a posição relativa das médias. Em outras situações têm sido verificada sua influência sobre a magnitude de interações, tornando-as significativas ou não-significativas, dependendo do caso.

Problemas básicos inerentes à escolha de modelo surgem com freqüência na literatura. O princípio básico é o de que o processamento e a análise dos dados dependem de um modelo, sobre o qual serão constituídas hipóteses. Sob o modelo considerado, estas hipóteses poderão ser avaliadas ou testadas, permitindo a interpretação dos dados.

O modelo deve representar a medida mensurada em um indivíduo, família, ou população, devendo contemplar todas as causas conhecidas e controláveis que influenciam a determinação daquela observação. O modelo experimental jamais é perfeito. Dada a grande complexidade dos fenômenos, principalmente os de natureza biológica, um modelo perfeito, deveria ser igualmente complexo, de difícil análise, processamento e interpretação. Assim, utilizam-se modelos simplificados, limitados e sujeitos a determinadas premissas. Adicionalmente, como todas as causas que atuam são desconhecidas, cada modelo é influenciado por uma fração estabelecida por causas desconhecidas, incontroláveis e de efeito aleatório.

Segundo Silva (1982) o estabelecimento do modelo depende das informações que se dispõe a respeito dos dados que serão utilizados e dos objetivos da análise. Assim, por exemplo, o estudo de um conjunto de genitores e de suas combinações híbridas, avaliados em um experimento em blocos ao acaso, poderia ser realizado segundo o modelo estatístico:

$$Y_{(ij)k} = \mu + T_{ij} + B_k + \varepsilon_{(ij)k}$$

em que $Y_{(ij)k}$ é o valor mensurado no tratamento ij (genitor, se i = j, ou híbrido se i≠j), μ é a média geral; T_{ij} é o efeito de tratamentos; B_k é o efeito de blocos e $\varepsilon_{(ij)k}$ é o efeito do erro aleatório. Neste caso o modelo permite avaliar a existência de diferenças entre os tratamentos avaliados. Estas mesmas observações poderiam estar sujeitas a outro modelo, se o interesse fosse o de avaliar a capacidade combinatória dos genitores estudados. Assim, adotar-se-ia o modelo:

$$Y_{(ij)k} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + B_k + \varepsilon_{(ij)k}$$

sendo g_i e g_j os efeitos da capacidade geral de combinação dos genitores i e j, respectivamente e s_{ij} o efeito da capacidade específica de combinação (Griffing, 1956).

A área de modelos biométricos tem proporcionado grande contribuição para a genética e melhoramento, procurando descrever os dados experimentais, por meio de diferentes parâmetros genéticos. O mesmo conjunto de dados apresentado anteriormente, poderia ser analisado sobre outra ótica, considerando agora o interesse em estudar a manifestação heterótica manifestada nos híbridos. Neste caso utilizar-se-ia o seguinte modelo (Gardner & Eberhart, 1966):

$$Y_{(ij)k} = \mu + \frac{1}{2}(v_i + v_j) + \theta(\bar{h} + h_i + h_j + s_{ij}) + B_k + \varepsilon_{(ij)k}$$

Procura-se agora definir o modelo com base nos efeitos de variedade e da heterose. Neste modelo v_i e v_j são efeitos dos genitores i e j; $\bar{h}$ é o efeito da heterose média; h_i e h_j são os efeitos de heterose varietal e s_{ij} é o efeito da heterose específica.

Assim, verifica-se que o processamento de um conjunto de dados pode, sem nenhuma limitação computacional, ser realizado sob diversos modelos. Caberá ao usuário identificar aquele que é mais pertinente aos seus dados. A restrição de um, ou adequação de outro modelo, dependerá exclusivamente dos conhecimentos do pesquisador e não do aplicativo computacional, cuja função será o de apenas processar com precisão e rapidez os dados que lhe foram fornecidos.

Outra situação que será abordada aqui, diz respeito à necessidade do pesquisador de sempre estar atento à natureza dos dados que estão disponíveis. Isto torna-se evidente em estudos da influência de componentes primários sobre a produção de grãos, realizado em muitos vegetais, por meio da análise de trilha. Como ilustração, será considerada a produção de cultivares de feijão (Y), expressa em g/planta, sendo determinada pelo número de vagens/planta (P_1), número de grãos/vagens (P_2) e peso médio do grão (P_3). Neste caso, tem-se:

$$Y = P_1 \times P_2 \times P_3$$

Ao se processar os dados, segundo modelos de análise de trilha ou de regressão múltipla, verifica-se que o coeficiente de determinação (R^2) é inferior a 100%, podendo indicar, erroneamente, que outras variáveis não consideradas teriam influência sobre a produção, apesar de se estar considerando todos os componentes da produção. Este erro ocorre uma vez que a relação entre as variáveis explicativas (P_1 , P_2 e P_3) e a variável básica (Y) é estruturalmente multiplicativa, e os procedimentos adotados pressupõem natureza aditiva. Assim, para contornar o problema, o apropriado é processar os dados transformados para escala logarítmica, de modo que seja obtida a determinação completa, conforme ilustra a relação apresentada a seguir:

$$\log(Y) = \log(P_1) + \log(P_2) + \log(P_3)$$

Algumas vezes o modelo adotado, bem como o processamento de dados, é adequado, mas a interpretação dos resultados é equivocada. Como ilustração é considerada a análise de um conjunto de genótipos, avaliados em blocos ao acaso, proporcionando o resultado apresentado na Tabela 3.

A questão aqui apresentada é de natureza interpretativa pois, sendo o conjunto de genótipos de natureza aleatória a estimativa do componente de variância genética σ^2_g é de 11,71, sendo de natureza fixa, o componente quadrático que expressa a variabilidade genotípica (ϕ_g) assume o mesmo valor (11,71). Entretanto, testam-se hipóteses diferentes nas duas situações. No primeiro caso, em que se considera o efeito aleatório o interesse é fazer inferência sobre a população da qual os genótipos estudados representam amostras, e a estimativa apresentada representa a variância nesta população. No segundo caso, em que o efeito é considerado fixo, o interesse é o de estimar e testar a hipótese de funções lineares do conjunto de g's disponíveis. Conseqüentemente, mesmo que a análise tenha sido realizada com aplicativo de reconhecida qualidade, as interpretações podem não ser as mais apropriadas pela falta de conhecimento do usuário em tratar e interpretar os resultados obtidos. Ainda

TABELA 3. Análise de variância de um conjunto de genótipos em blocos ao acaso.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	3	74,00		
Genótipos	99	5320,00	53,74	7,79**
Resíduo	297	2049,30	6,90	

**significativo a 1% de probabilidade.

neste contexto, pode-se dizer que não existem regras específicas para estabelecer se o modelo é fixo ou aleatório. Searle (1971) recomenda que o estabelecimento da natureza fixa ou aleatória do efeito deve se basear no bom senso e no conhecimento dos dados e dos objetivos da pesquisa para qual se deseja tirar conclusões.

Dependendo dos efeitos que estão presentes no modelo, este pode ser classificado como fixo, aleatório ou misto. O modelo é dito fixo quando todos os efeitos, exceto o erro experimental, são fixos. O modelo aleatório é aquele em que todos os efeitos, exceto a média (ou constante do modelo), são considerados aleatórios. Quando incluir efeitos fixos e aleatórios, exceto a média e o erro experimental, ele é classificado como misto.

Conhecimento sobre a natureza dos efeitos do modelo é também fundamental para que os componentes de variância sejam corretamente estimados e para que os testes de hipóteses sejam realizados de forma apropriada. Muitos aplicativos computacionais, que realizam a análise de variância não levam em consideração a natureza aleatória ou fixa dos efeitos do modelo, admitindo-se que todos são fixos, e realizando-se testes de significância tomando como estatística F, a relação entre o quadrado médio da fonte de variação e o quadrado médio do resíduo. Assim, se o usuário não faz as devidas correções poderá estar interpretando erroneamente sobre a significância ou não dos efeitos estudados. Como ilustração será considerado o estudo de um conjunto de genótipos avaliados em vários ambientes, no delineamento em blocos ao acaso. O modelo estatístico que descreve as observações mensuradas é:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + A_j + GA_{ij} + B/A_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

em que :

μ: constante inerente a todas as observações;
G_i : efeito do i-ésimo genótipo (i = 1 ,2, ...,g);
A_j : efeito do j-ésimo ambiente (j = 1,2, ... ,a);
GA_{ij} : efeito da interação do i-ésimo genótipo com o j-ésimo ambiente;
B/A_{jk} : efeito do k-ésimo bloco dentro do j-ésimo ambiente (k = 1,2,..., r);
ε_{ijk} : erro aleatório.

As esperanças dos quadrados médios para as fontes de variações descritas no modelo anterior são apresentadas na Tabela 4.

Conhecidas as esperanças dos quadrados médios, os componentes de variância associados aos efeitos aleatórios e os componentes quadráticos associados aos efeitos fixos são facilmente estimados. Além da estimação dos componentes de variância ou componentes quadráticos, o pesquisador normalmente tem interesse nos testes de significância, e, para isto, as expressões das E(QM) são de grande utilidade, por indicar, para determinadas hipóteses, qual o denominador apropriado para o teste F.

Na Tabela 5 são apresentadas algumas hipóteses avaliadas com o teste F apropriado, com os seus respectivos graus de liberdade, considerando como ilustração o esquema da análise para o caso em que os efeitos de genótipos são fixos.

Verifica-se, portanto que, em função da hipótese que se deseja testar tem-se uma estatística F apropriada. Utilizar apenas o quadrado médio do resíduo como denominador, como alguns aplicativos utilizam, pode não estar correto e, portanto, não realizar os testes de hipótese de interesse do melhorista. Situações ainda mais complexas ocorrem quando há necessidade de se compor o numerador e denominador da estatística F, utilizando-se vários quadrados médios, como ocorre, por exemplo, no caso em que todos os efeitos do modelo são aleatórios, conforme ilustrado na Tabela 6.

Os graus de liberdade n_1 e n_2 devem ser obtidos pela fórmula de Satterthwaite, que, neste caso, têm a seguinte expressão:

$$n_1 = \frac{(QMA + QMR)^2}{\frac{(QMA)^2}{a-1} + \frac{(QMR)^2}{a(r-1)(g-1)}} \quad e \quad n_2 = \frac{(QMB + QMGA)^2}{\frac{(QMB)^2}{a(r-1)} + \frac{(QMGA)^2}{(a-1)(g-1)}}$$

TABELA 4. Esperanças dos quadrados médios para as fontes de variação de um modelo para análise conjunta, em blocos casualizados, com interação de primeira ordem.

FV	QM	Aleatório	G e A fixos	A fixo	G fixo
Blocos/ Amb.	QMB	$\sigma^2 + g\sigma^2_b$	$\sigma^2 + g\sigma^2_b$	$\sigma^2 + g\sigma^2_b$	$\sigma^2 + g\sigma^2_b$
Ambientes (A)	QMA	$\sigma^2 + r\sigma^2_{ga} + g\sigma^2_b + gr\sigma^2_a$	$\sigma^2 + g\sigma^2_b + gr\phi_a$	$\sigma^2 + r\ell\sigma^2_{ga} + g\sigma^2_b + gr\phi_a$	$\sigma^2 + g\sigma^2_b + gr\sigma^2_a$
Genótipos (G)	QMG	$\sigma^2 + r\sigma^2_{ga} + ar\sigma^2_g$	$\sigma^2 + ar\phi_g$	$\sigma^2 + ar\sigma^2_g$	$\sigma^2 + r\alpha\sigma^2_{ga} + ar\phi_g$
G x A	QMGA	$\sigma^2 + r\sigma^2_{ga}$	$\sigma^2 + r\phi_{ga}$	$\sigma^2 + r\ell\sigma^2_{ga}$	$\sigma^2 + r\alpha\sigma^2_{ga}$
Resíduo	QMR	σ^2	σ^2	σ^2	σ^2

$\ell = a/(a-1) \quad \alpha = g/g(g-1)$

$\phi_g = \sum_i G_i^2/(g-1); \phi_a = \sum_j A_j^2/(a-1); e \phi_{ga} = \sum_i \sum_j GA_{ij}^2/(a-1)(g-1)$

TABELA 5. Estatística F e graus de liberdade para quando os efeitos de genótipos são fixos.

Hipótese (Ho)*	Estatística F	Graus de Liberdade
$H_{o1}: \sigma^2_a = 0$	F_{01} = QMA / QMB	(a-1),a(r-1)
$H_{o2}: G_i = 0$ para todo i	F_{02} = QMG / QMGA	(g-1),(a-1)(g-1)
$H_{o3}: \sigma^2_{ga} = 0$	F_{03} = QMGA / QMR	(a-1)(g-1),a(r-1)(g-1)

(*) No caso de H_{o2} a restrição $\sum_i G_i = 0$ é parte integrante do modelo.

TABELA 6. Estatística F e graus de liberdade quando todos os efeitos do modelo são aleatórios.

Hipótese (Ho)*	Estatística F	Graus de liberdade
$H_{o1}: \sigma^2_a = 0$	$F_{01} = \frac{QMA + QMR}{QMB + QMGA}$	n_1, n_2
$H_{o2}: \sigma^2_g = 0$	F_{02} = QMG / QMGA	(g-1),(a-1)(g-1)
$H_{o3}: \sigma^2_{ga} = 0$	F_{03} = QMGA / QMR	(a-1)(g-1),a(r-1)(g-1)

Outros exemplos de geração de resultados aparentemente absurdos ocorrem em função da utilização de dados já processados, que incluem erros, a partir dos quais são obtidas estimativas de parâmetros, que são aproveitados em análises posteriores. Uma ilustração, comum de ser encontrada, é o estudo baseado nas informações de matrizes de correlações, tais como correlações parciais, análise de trilha e correlações canônicas.

Resultados incoerentes podem surgir quando se trabalha com as correlações de natureza genotípica, em que os problemas inerentes à estimação de componentes de variância e covariância, bem como a precisão destas estimativas, podem conduzir a valores discrepantes dos limites teóricos esperados. Sabemos que as correlações são medidas de associações lineares entre caracteres, estando limitada entre os valores –1 e +1. Entretanto, coeficientes de correlação genética maiores que o valor absoluto 1 podem ocorrer em conseqüência de problemas ligados à amostragem populacional, distribuição das variáveis ou ao modelo usado na estimação das variâncias e da covariância, que determinam a correlação. Algumas vezes as correlações estão dentro dos limites esperados, porém são pouco informativas por estarem associadas a elevado erro-padrão, serem estimadas a partir de número insuficiente de dados, envolverem variáveis com distribuições desconhecidas e muitas vezes, por não refletirem as relações de causa e efeito.

No contexto de processamento de dados, deve-se ter a preocupação de avaliar as propriedades da matriz de correlações quando as mesmas são tomadas em conjunto. Segundo Searle (1971), uma matriz de correlação é positiva definida ou não-negativa definida. Será positiva definida quando todos seus autovalores são positivos, e portanto seu determinante é também positivo, e não-negativa definida quando todos os seus autovalores são não-negativos, ou seja, são positivos ou nulos. Havendo um autovalor nulo, a matriz torna-se singular, e muitas vezes inadequadas para certos estudos, pois não admite inversa comum. Estes casos são freqüentes quando existem problemas graves de multicolinearidade.

O erro que pode existir no processamento de dados ocorre quando se toma uma suposta matriz de correlação, que em razão dos problemas na estimação de cada um de seus valores, pode descaracterizá-la. Esta matriz torna-se, portanto, inadequada a qualquer tipo de análise. Como exemplo será considerada uma suposta matriz de correlação genotípica obtida entre quatro características A, B, C e D.

$$R = \begin{bmatrix} 1 & 0,5 & 0,8 & 0,3 \\ 0,5 & 1 & 0,4 & 0,9 \\ 0,8 & 0,4 & 1 & 0,6 \\ 0,3 & 0,9 & 0,6 & 1 \end{bmatrix}$$

O pesquisador poderia interpretar cada associação envolvendo os pares de características estudados, admitindo certo grau de confiabilidade uma vez que seus valores individuais estão dentro dos limites da correlação. Porém, teria grande surpresa se esta matriz fosse utilizada, por exemplo, para cálculo de correlações parciais. Veja

como ilustração as correlações entre pares de variáveis removendo a influência das outras duas não consideradas na associação:

Caracteres	Correlação
A e B	-1,6466
A e C	-1,3558
A e D	1,6270
B e C	1,7516
B e D	-1,1677
C e D	-1,500

Tem-se portanto um conjunto de resultados sem significado, umas vez que todos os valores ultrapassam os limites teóricos da correlação. Isto ocorre, pois na verdade a matriz não é de correlação, um vez que apresenta determinante negativo (-0,054) e pelo menos um autovalor negativo (λ_1= 2,7534; λ_2= 0,9552; λ_3= 0,3499 e λ_4 = -0,0587).

Outro problema que tem passado despercebido em algumas análises de dados, em certos procedimentos biométricos, é a existência de multicolinearidade entre os caracteres estudados. Quando as variáveis estão correlacionadas entre si, diz-se que há inter-relação ou muticolinearidade entre elas. Algumas vezes o termo multicolinearidade é utilizado apenas nos casos em que a correlação entre as variáveis é muito alta ou perfeita (Neter & Wasserman, 1974). Os problemas causados pela multicolinearidade não são devidos simplesmente a sua presença, mas sim ao grau que manifesta. Existindo multicolinearidade, em níveis considerados moderados a severos, entre um conjunto de variáveis explicativas, torna-se difícil avaliar a influência das mesmas sobre a resposta na variável principal, e ignorar seus efeitos, pode provocar resultados danosos ou absurdos. Desta forma, diagnósticos de multicolinearidade devem ser feitos, de tal forma a viabilizar certos estudos. Carvalho (1995) ressalta a importância deste estudo, quando se tem objetivo de realizar análise de regressões, análise de trilha, estimar índice de seleção, correlações parciais e canônicas, dentre outros.

Em presença de multicolinearidade, moderada a severa, as variâncias associadas a certos estimadores, como por exemplo dos coeficientes de trilha que medem efeitos diretos de variáveis explicativas sobre uma principal, podem atingir valores demasiadamente elevados, tornando-os pouco confiáveis. Adicionalmente, as estimativas dos parâmetros podem assumir valores absurdos ou sem nenhuma coerência com o fenômeno biológico estudado. Shrivastava & Sharma (1976), por exemplo, relatando seus estudos baseados na análise de trilha envolvendo componentes primários da produção de arroz, encontraram efeito direto negativo na produtividade para os caracteres número de perfilhos, número de grãos, peso de grãos e comprimento da panícula. Sendo componentes primários, fica difícil explicar estes valores negativos encontrados.

Em muitos casos, quando é envolvido um grande número de variáveis ou não há conhecimento prévio da associação entre as mesmas, resultados inapropriados, gerados pela multicolinearidade, podem ser interpretados levando a conclusões que,

não necessariamente, seriam as mais pertinentes. A solução para o problema é a de sempre fazer o diagnóstico de multicolinearidade dos dados, antes de se realizar o processamento. Para este diagnóstico adotam-se alguns procedimentos básicos, devendo-se considerar que o diagnóstico eficiente é aquele que dá informações sobre a existência da multicolinearidade, o grau de severidade e identifica as variáveis envolvidas no problema (Montgomery & Peck, 1981). Ferrari (1989) e Carvalho (1995) destacam os seguintes procedimentos, para detectar a possibilidade de problemas na estimação advindos da multicolinearidade:

a) Métodos informais. São úteis para identificar a existência de problemas proporcionados pela multicolinearidade, mas não fornecem informações sobre a sua intensidade e natureza. São baseados em algumas evidências, tais como magnitudes e sinais de estimativas de parâmetros, geralmente coeficientes de regressão, muito discrepantes, ou contrários à expectativa do pesquisador fundamentada em análise prévia. Grandes alterações nas estimativas obtidas quando se excluem, ou incluem, uma ou poucas variáveis. Grandes amplitudes para intervalos de confiança correspondentes a coeficientes de regressão que representam importantes variáveis independentes.

b) Exame do determinante da matriz de correlação. Uma matriz de correlação tem determinante que pode variar de zero a um. Será igual a um se as variáveis consideradas são ortogonais e igual a zero se existir uma dependência linear completa entre estas variáveis. À medida que o determinante aproxima-se de zero, a multicolinearidade torna-se mais intensa e seus efeitos mais danosos ao processo de estimação, pelos mínimos quadrados ordinários. Este processo, apesar de grande utilidade, baseia-se em informações disponíveis nos dados, mas que não identifica as variáveis causadoras da multicolinearidade.

c) Análise dos elementos da matriz de correlação. Este processo consiste na análise dos elementos não-diagonais da matriz. Se existirem variáveis com quase total dependência linear, então o valor da correlação será próximo de 1. Valores de correlações altos indicam a existência de efeitos danosos da multicolinearidade. Porém, esta condição é suficiente, mas não necessária, o que significa que há possibilidade de ausência de correlação alta entre quaisquer pares de variáveis considerados, mas com problemas sérios de multicolinearidade, principalmente quando está envolvido um grande número de variáveis.

d) Análise dos autovalores e autovetores. Existindo uma ou mais dependências lineares total ou aproximada, um ou mais autovalores (λ_1, λ_2,... λ_p, para p variáveis) serão nulos ou muito pequenos. Montgomery & Peck (1981) propõem a avaliação do número de condições (NC) da matriz de correlação. Dada a simetria desta matriz, o número de condição consiste na razão entre o maior e o menor autovalor. Estes autores consideram que se NC é inferior a 100, a multicolinearidade não constitui problema sério. Se $100 < NC < 1.000$, a multicolinearidade é moderada a forte, e $NC > 1.000$ há indício de multicolinearidade severa. Nesta análise, os elementos dos autovetores correspondentes são de grande utilidade, por identificar as variáveis que estão em associação e que, portanto, estão provocando os problemas de

multicolinearidade. Tem sido adotado o procedimento de identificar a variável que provoca maiores problemas de multicolinearidade, como sendo aquela associada ao maior elemento do autovetor cujo autovalor é de menor magnitude.

Uma vez detectada a existência de multicolinearidade forte a severa, no conjunto de dados a ser processado, é necessário tomar algumas providências. Assim, para contornar os efeitos adversos da multicolinearidade, pode-se realizar a eliminação de variáveis do modelo de regressão. Shrivastava & Sharma (1976), no estudo já relatado, verificaram que ao excluir o comprimento da panícula da análise, todas as outras variáveis passavam apresentar contribuição positiva para a produção de arroz. Os autores propõem, portanto, que se faça uma seleção cuidadosa das variáveis para o estudo e que se tenha cautela no uso desta técnica. Além da eliminação de variáveis, encontra-se também na literatura a possibilidade de se empregar metodologias alternativas à dos quadrados mínimos, em certos estudos genéticos como o de análise de trilha e índice de seleção, como as proposta por Carvalho (1995), que permitem a estimação de parâmetros, associado a todas as variáveis, mesmo na presença de multicolinearidade.

6. SIMULAÇÃO

Uma das grandes contribuições da informática é viabilizar o estudo de fenômenos, por meio da simulação de uma situação complexa, em que são estabelecidos parâmetros e restrições, de tal forma que o efeito de certos fatores controláveis possam ser convenientemente estudados. A simulação tem sido definida como a maneira de imitar, por meio de recursos computacionais, o comportamento de um sistema real, para estudar seu funcionamento em condições alternativas (Dachs, 1988), envolvendo certos tipos de modelos lógicos, que permitam descrever, da melhor forma possível, o sistema natural (Naylor *et al.*, 1971).

Quando se faz estudos baseados em simulação é necessário considerar que nenhuma parte do universo é tão simples que possa ser compreendida e controlada sem abstração. A abstração, segundo os autores, consiste em substituir a parte do universo por um modelo semelhante, porém com estrutura mais simples. Portanto, outro aspecto importante na simulação é a modelagem. O modelo deve ser suficientemente simples para ser operacionalizado e interpretado adequadamente, mas seu desempenho deve ser comparável com o modelo real e, se a defasagem for grande, ele deve ser eliminado ou refinado. McNitt (1985) lembra que a simulação envolve modelos que representam a entidade a ser investigada, porém é mais que um simples modelo, é uma metodologia para avaliação destes.

A simulação inclui modelos físicos, matemáticos, biológicos e computacionais, dentre outros. Estes modelos podem também ser classificados como estáticos ou dinâmicos. Os dinâmicos diferem dos estáticos por envolver um conjunto de mudanças, inseridas de forma discreta ou em fluxo contínuo, representando o comportamento e a evolução do fenômeno estudado em resposta às variações no tempo ou no espaço. A adoção de modelos estáticos ou dinâmicos depende do próprio objetivo da simulação.

Apesar da modelagem anteceder o computador, seu uso e sua importância têm crescido consideravelmente com a disponibilização de computadores digitais,

de alta velocidade. Atualmente a disponibilidade de recursos computacionais não está restrita a uma elite técnica ou instituição com grandes recursos financeiros. A viabilidade em termos de custo e qualidade de equipamento, têm permitido que pesquisadores tenham acesso contínuo e direto a recursos computacionais poderosos, permitindo maior prestação de serviços à área científica.

A simulação tem sido de grande utilidade em estudos genéticos sob vários contextos, incluindo estudos de populações, do indivíduo ou do próprio genoma. Ela demanda dos geneticistas o desenvolvimento de modelos biológicos adequados, que retratem da melhor forma possível os fenômenos de interesse, e dos programadores as rotinas para o processamento adequado segundo parâmetros e restrições, para que a influência de certos fatores possa ser avaliada.

Algumas vezes a simulação é realizada para encontrar uma solução ou um valor ótimo, a partir de um conjunto fixo de fatores, dentro de um modelo. Assim, pode-se estar interessado em prever o comportamento da variância genotípica, aditiva, e devido à dominância considerando um loco gênico, em populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com diferentes graus de dominância. Em outras, o objetivo pode ser o de monitorar o comportamento de um dado sistema sob condições variáveis. Os resultados destas observações permitem, em muitos casos, fazer comparações e previsões de técnicas alternativas, disponíveis em condições reais. Alguns estudos de simulação já foram realizados avaliando-se a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento, em termos de ganhos de seleção. Cada ciclo de melhoramento pode ser avaliado ou monitorado sob diferentes contextos, como mudanças na composição genotípica, na freqüência alélica, na média, na variabilidade, no tamanho efetivo, dentre outros.

Sob contexto científico distinguem-se duas linhas de simulação. A primeira é a simulação para resolução de problemas matemáticos, completamente determinísticos, normalmente utilizados para obtenção de soluções de problemas de difícil trato matemático. A segunda é a simulação baseada em conceitos probabilísticos, que envolvem geração de números aleatórios com distribuição desejada. Os modelos determinísticos, que são não-randômicos, fornecem sempre o mesmo resultado para um conjunto de dados. Os estocásticos ou probabilísticos envolvem probabilidade, estimação de parâmetros e de tendência e seu resultado é incerto, mesmo que o esperado tenha sido previamente determinado.

Equipamentos eletrônicos já dispõem de funções randômicas que permitem gerar números aleatórios. Estes números são utilizados para cálculos estatísticos e simulação de comportamento dentro de uma distribuição de probabilidade. Em alguns equipamentos é utilizada a função RND, cuja denominação é a forma abreviada da palavra *random* que, em inglês, significa casual ou aleatório, para gerar números aleatórios entre 0 e 1. A expressão:

```
Int((max - inf + 1) * Rnd + min)
```

permite gerar números inteiros (int) no intervalo delimitado pelo valor mínimo (min) e máximo (max) estabelecido pelo usuário. Assim, um programa feito em *BASIC*, para gerar 20 números entre 1 e 10, seria:

```
max =20
min =1
for i = 1 to 20
        x = int(max – min +1)*rnd + min)
        print x
next i
```

Neste programa utilizam-se os comandos de laço tipo *for ... next* e o comando de impressão *print*. Um resultado ilustrativo seria:

15 11 12 6 7 16 1 16 17 15 1 9 18 16 8 20 18 2 19 8

Outra simulação de interesse em estudos estatísticos é aquela que envolve dados com distribuição conhecida. Assim, considerando a distribuição normal, pode-se utilizar as variáveis:

$$x = \sqrt{-2\log_e(RND)V}\,Cos(2\pi RND)$$

e

$$y = \sqrt{-2\log_e(RND)V}\,Sen(2\pi RND)$$

sendo RND um número aleatório. Demonstra-se que os valores de x e y, assim obtidos, têm distribuição normal com média zero e variância V. Se o pesquisador deseja n dados com média (μ) e variância (σ^2), tem-se que cada um destes dados (z) é estimado considerando que:

$$V = 2\sigma^2$$

e, então:

$$z = \mu + \frac{1}{2\theta}\sum_{i=1}^{\theta}(x_i + y_i)$$

sendo θ a repetibilidade de cada ponto simulado. Quanto maior o valor de θ, estabelecido pelo usuário, mais precisa torna-se a simulação, porém mais lenta. Como ilustração considerou-se a opção do aplicativo GENES (Cruz,1997; 1998), no qual há o interesse em simular uma amostra de tamanho 20, com distribuição normal, apresentado média igual a 10 e variância igual a 4. Obteve-se o seguinte resultado:

12,7485	13,9989	10,0366	10,7174	9,7024	10,2029	7,5519
9,3668	4,5773	10,5817	9,0634	7,1080	14,2346	9,2527
9,1500	9,1787	9,9037	9,9404	10,8286	8,7974	

Para estes dados têm-se:

Estatística	Predita	Estimada
Média	10	9,8471
Variância	4	4,7966

Outros resultados podem ser obtidos, com novas simulações ou "rodadas" a partir dos mesmos valores paramétricos da média e da variância. Como a simulação inclui elementos aleatórios, há grande variabilidade entre as várias tentativas, considerando os mesmos valores para as variáveis externas ou as várias decisões, no exemplo, para aqueles valores estabelecidos da média e da variância. Assim, a simulação deve-se basear em várias investidas ou rodadas, além de que a dimensão amostral também deva ser adequada, pois uma pequena dimensão ou um número reduzido de rodadas poderá resultar numa grande variação de resultados, tornando-os menos confiáveis e de interpretação questionáveis. Contudo, se a dimensão for grande ou o número de rodas for muito alto, será consumido muito tempo computacional e, em algumas situações, a análise pode ser inviabilizada.

Com a mesma sistemática é possível simular não só amostras, mas delineamentos experimentais a partir de parâmetros conhecidos pelo pesquisador. Um exemplo ilustrativo pode ser apresentado considerando também o programa computacional GENES. Neste exemplo será considerado o interesse em simular um ensaio envolvendo 20 famílias em 6 blocos ao acaso, para uma determinada característica. Neste programa são requeridas apenas informações que certamente não são tão difíceis de serem estabelecidas pelo melhoristas, tais como a média, a herdabilidade e a precisão experimental. Assim, considerou-se como referência a altura da planta em milho e adotou-se uma população hipotética com média de 180 cm, herdabilidade de 70 % e precisão experimental, expressa pelo coeficiente de variação, de 10 %. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Simulação de um ensaio em blocos ao acaso pelo programa GENES.

Genótipos	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Bloco 6
1	170,7635	208,0013	171,2121	190,674	183,3639	160,5299
2	164,2344	176,4243	174,0027	163,6795	153,6287	173,7573
3	167,3521	210,8085	177,6299	201,6492	185,5585	182,4823
4	227,7741	165,8768	205,7617	173,1845	168,8169	176,5894
5	177,4231	158,9383	142,7275	158,602	159,3485	162,906
6	162,1312	162,9528	180,1771	180,3915	185,488	137,402
7	165,5523	207,9914	182,9238	177,2952	168,9616	189,5733
8	162,7975	181,6929	205,0129	202,651	159,0635	191,1985
9	142,0286	199,9953	201,8238	185,7551	160,1679	161,6452
10	215,7841	209,18400	198,0483	161,2900	180,4453	206,6822
11	189,2107	173,6167	182,2705	216,4705	167,9352	163,9818
12	150,3234	183,0024	163,662	197,3363	186,5519	166,0504
13	219,8482	183,4584	172,3983	187,0209	204,1331	186,4025
14	203,7522	205,6684	203,0778	207,6518	225,6779	198,9536
15	170,7824	174,1066	176,4327	185,5415	181,2994	189,4478
16	217,2524	181,1488	216,336	203,4458	185,949	192,9366
17	189,8959	200,2083	203,1000	204,5208	203,1361	188,0561
18	192,7221	206,7399	196,7253	194,7117	208,0497	208,5162
19	205,5500	213,7726	209,962	193,4746	190,1753	206,5130
20	175,3885	181,6945	185,7049	197,3087	181,8443	150,5391

Estes dados submetidos à análise de variância proporcionariam os resultado apresentados a seguir:

Parâmetro	Predito	Estimado
Média	180	185,2104
Herdabilidade (média)	70	74,88
CV experimental	10	8,55

Novamente verifica-se que há certa discrepância entre o predito e o simulado, porém com outras tentativas é possível obter resultados com melhor aproximação e de maior utilidade para o estudo desejado. Muitos estudos por simulação de dados têm sido aplicados em estudos de genética e melhoramento de plantas. Alguns relacionados com a estimação de parâmetros genéticos, com a comparação de estratégia de melhoramento, ou com a avaliação de metodologias biométricas (Cruz & Vencovsky, 1989; Cruz & Castoldi, 1991; Vencovsky & Cruz, 1991; Partner *et al.*, 1993; Toms *et al.*, 1994; Euclydes, 1996).

A área de simulação em genética é tão vasta que deu origem a um conjunto de *softwares*, com características específicas. O programa DIALLEL, desenvolvido por Burow & Coors (1994), permite simular e analisar dados a partir de modelos aplicados a análise dialélica. O programa MENDEL, destina-se a simulação considerando as informações ao nível de genes em indivíduos ou populações. Euclydes (1996) descreve o programa GENESYS, que permite a simulação de genomas de certa complexidade para estudos comparativos de métodos de seleção, testes de pressuposições e avaliação da eficácia de novas metodologias de seleção, inclusive daquelas assistidas por marcadores moleculares. O programa GENES permite, por simulação, estabelecer o número ótimo de famílias ou de plantas dentro de parcelas para representar uma população. O programa GQMOL permite, também por simulação, estimar o número ótimo de marcas moleculares para caracterizar a diversidade genética entre os indivíduos de uma população.

Simulações em estudos genéticos têm proporcionado resultados interessantes, permitindo avaliar e comparar a eficiência de metodologias. Uma ilustração da importância da simulação, mesmo que de natureza estática, pode ser exemplificada por meio da utilização de metodologias de análise dialélica, em que o objetivo é a comparação de estimadores do potencial de genótipos com relação ao desempenho *per se* e em combinações híbridas. Para que fosse avaliada a eficiência dos estimadores da capacidade geral de combinação, obtidos quando se aplica a metodologia proposta por Griffing(1956), em relação aos estimadores dos efeitos varietais e de heterose varietal, estimados pela metodologia de Gardner & Eberhart (1966), um dialelo envolvendo n genitores pode ser simulado. Neste caso, considera-se que cada genitor representa uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pode-se admitir um loco gênico, e que a i-ésima população apresenta genótipos AA, Aa e aa, na freqüência p_i^2 , $2p_iq_i$ e q_i^2 , respectivamente. O valor genotípico é dado por u+a, u+d e u-a, para os genótipos homozigoto dominante, heterozigoto e homozigoto recessivo, respectivamente. Neste dialelo serão considerados, como exemplo, 10 genitores, e admitido que o genitor 1, apresenta freqüência do alelo favorável, considerado A, igual a 0,1, o genitor 2, terá p = 0,2 e assim sucessivamente.

O valor que representa a média genotípica do i-ésimo genitor é dado a seguir:

$$Y_{ii} = u + a(2p_i - 1) + 2p_i(1 - p_i)d$$

A combinação híbrida resultante do acasalamento entre o i-ésimo e j'-ésimo genitor apresentará valor genotípico dado por:

$$Y_{ij} = u + a(p_i + p_j - 1) + (p_i + p_j - 2p_iq_j)d$$

Considerando o valor de u, uma constante arbitrária, igual a 10 e relações de d/a = 1,5, que expressa sobredominância, d/a=1, que expressa dominância completa e d/a=0,5, que expressa dominância parcial, têm-se os resultados apresentados na Tabela 8.

Na situação simulada verifica-se que há uma perfeita concordância entre a magnitude dos efeitos da capacidade geral de combinação e a freqüência gênica do genitor. Para os efeitos varietais esta concordância só se verifica quando se considerou dominância completa ou parcial. Os efeitos da heterose varietal não se relacionam com a superioridade da freqüência gênica do genitor, mas com a sua diversidade, expressa em termos de diferença de freqüência gênica, em relação à média do dialelo. Para estes casos é necessário que se leve em consideração, simultaneamente, os efeito de variedades (v_i) e heterose varietal (h_i).

TABELA 8. Estimativas de g_i, v_i e h_i considerando sobredominância (d/a=1,5), dominância completa d/a=1) e dominância parcial (d/a=0,5).

Genitor	d/a = 1,5			d/a = 1,0			d/a = 0,5		
	g_i	v_i	h_i	g_i	v_i	h_i	g_i	v_i	h_i
1	-4,125	-11,25	2,25	-4,25	-10,5	-10,5	-4,375	-9,75	0,75
2	-3,075	-7,15	0,75	-3,217	-7,1	-7,1	-3,358	-7,05	0,25
3	-2,075	-3,65	-0,375	-2,217	-4,1	-4,1	-2,358	-4,55	-0,125
4	-1,125	-0,75	-1,125	-1,25	-1,5	-1,5	-1,375	-2,25	-0,375
5	-0,225	1,55	-1,5	-0,317	0,7	0,7	-0,408	-0,15	-0,5
6	0,625	3,25	-1,5	0,583	2,5	2,5	0,541667	1,75	-0,5
7	1,425	4,35	-1,125	1,45	3,9	3,9	1,475	3,45	-0,375
8	2,175	4,85	-0,375	2,283	4,9	4,9	2,3917	4,95	-0,125
9	2,875	4,75	0,75	3,0833	5,5	5,5	3,2917	6,25	0,25
10	3,525	4,05	2,25	3,85	5,7	5,7	4,175	7,35	0,75

7. PROCEDIMENTOS BIOMÉTRICOS

A seguir são descritos procedimentos básicos indispensáveis ao melhorista para análise e interpretação de dados. Estes procedimentos estão disponíveis em alguns aplicativos computacionais das áreas de genética e estatística, e são fundamentais como ferramenta auxiliar para tomada de decisão nas diferentes etapas de um programa de melhoramento. Serão ressaltadas a importância de cada um deles e sua aplicabilidade em certas situações.

Apesar de muitos estudos comprovarem a eficiência de metodologias biométricas no auxílio ao melhorista em seu programa de melhoramento, verifica-se que muitos profissionais ainda apresentam certa resistência em utilizar e adotar as informações obtidas do processamento de dados, baseado nestas metodologias, mesmo que não haja nenhum custo adicional na experimentação ou na sua tomada de decisão. Isto pode ser explicado pelo caráter tanto de ciência quanto de arte que o melhoramento apresenta, em que muitas vezes o melhorista utiliza-se mais de sua intuição ou acredita mais em suas habilidades para conduzir a resultados satisfatórios. Certamente que o melhoramento obtido em muitas culturas veio deste tipo de comportamento e que, na verdade, o processo de seleção e eliminação, essencial neste processo, é anterior à própria genética.

Em outros casos, o melhorista não adota certos procedimentos pelo simples desconhecimento das potencialidades de um processo analítico de reunir informações disponíveis, ponderar fatores e apresentar soluções otimizadas. Hoje com maior número de profissionais qualificados e maior número de instituições com programas de treinamento e de aperfeiçoamento técnico-científico, com padrão de excelência, estas barreiras tendem a ser superadas. O limite passa a ser estabelecido pela disponibilidade de máquina e pela disposição do homem em operá-las. Havendo disponibilidade de equipamentos computacionais e de *softwares* de boa qualidade, é importante que o conjunto de dados estejam prontos para o processamento. Para tal, existem coletores de dados e máquinas agrícolas, que têm permitido a imediata transferência dos dados para o computador, dispensando a tediosa tarefa de digitação e conferência de dados. Feito isto, acredita-se que o processamento será prática rotineira entre os melhoristas.

7.1 ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS

Estes procedimentos proporcionam resultados básicos tais como médias, variância, coeficiente de variação, máximo e mínimo, dentre outras. Estas estatísticas descritivas têm ampla aplicação no melhoramento, por fornecerem informações básicas da população trabalhada ou do conjunto de dados disponíveis. Permitem também avaliar e detectar a existência de erros grosseiros, magnitude dos dados e fazer análise exploratória dos dados. Neste contexto, é interessante quando o procedimento computacional é acompanhado de análises gráficas baseadas em distribuição de freqüência ou dispersão gráfica em relação aos eixos cartesianos estabelecidos pelas variáveis de interesse, permitindo visualizar a tendência da distribuição de dados, pontos discrepantes, inclusive aqueles fora dos limites esperados e verificar o balanceamento ou desbalanceamento pela análise de freqüência.

7.2 INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE

Estudos sobre a interação genótipo x ambiente têm tido grande interesse em programas de melhoramento, uma vez que a manifestação fenotípica é o resultado da ação do genótipo sob influência do meio. O ambiente atua isoladamente ou em interação com os genótipos, de tal forma que, quando se considera uma série de ambientes, sua magnitude pode ser estimada e seus efeitos devem ser avaliados. A interação genótipo x ambiente influencia o êxito do melhoramento nas suas diferentes

etapas. Quando se considera o processo de recomendação de cultivares, a avaliação da interação genótipos x ambientes torna-se de grande importância, pois, no caso de sua existência, há possibilidades de o melhor genótipo em um ambiente não o ser em outro. Este fato dificulta a recomendação de cultivares com ampla adaptabilidade. Quando se considera a avaliação e condução de populações segregantes, a existência de interação pode influir consideravelmente no ganho de seleção, existindo situações em que ela pode ser capitalizada e atuar a favor dos interesses do melhorista ou, em outros casos, dificultar a obtenção de genótipos adaptados a uma larga região. Assim, segundo Cruz & Regazzi (1997), pela importância desta interação, cabe ao melhorista avaliar sua magnitude e significância, quantificar seus efeitos sobre as técnicas de melhoramento e estratégias de difusão de tecnologia e fornecer subsídios que possibilitem adotar procedimentos para sua minimização e, ou, seu aproveitamento.

Estudos sobre a interação genótipo x ambiente devem pormenorizar o comportamento tanto dos genótipos disponíveis, em estudos de adaptabilidade e estabilidade, quanto dos ambientes estudados. Quando estes ambientes referem-se a locais, estudos de estratificação ambiental têm sido de grande importância. A estratificação da região de adaptação da cultura em sub-regiões mais homogêneas tem sido objeto de estudo, porém observa-se que, mesmo com este procedimento, uma fração da interação ainda permanece, em razão da ocorrência de fatores incontroláveis dos ambientes, como temperatura, chuvas etc., contra os quais a estratificação não oferece eficácia. Por outro lado, sempre é interessante avaliar se há, entre os ambientes disponíveis, padrões de similaridades de respostas de cultivares, de tal maneira que seja possível avaliar o grau de representatividade dos ensaios da faixa de adaptação da cultura, tomar decisões com relação a descartes de ambientes, quando existem problemas técnicos ou escassez de recursos, e identificar grupos de ambientes em que a interação possa ser não-significativa para o conjunto de genótipos disponíveis.

Assim, quando se dispõe de um conjunto de dados obtidos de estudos do comportamento de um conjunto de genótipos em uma série de ambientes, recomenda-se o processamento de dados destinado a promover a estratificação dos ambientes. Alguns critérios para esta estratificação estão apresentados na literatura, mas aquele em que os grupos de locais são formados adotando-se como critério o fato da interação genótipo x ambiente ser não-significativa, tem merecido grande interesse pelos melhoristas. Questiona-se nestes agrupamentos o fato de que a interação, mesmo quando significativa, pode não causar problemas ao melhoramento quando a mesma é de natureza simples. As interações simples são proporcionadas pela diferença de variabilidade entre os genótipos quando se consideram vários ambientes, enquanto que a de natureza complexa se refere aquela em que há inversão na superioridade de desempenho dos genótipos quando se muda o ambiente. Assim, o agrupamento baseado em interação não-significativa poderia ser refinado com informações sobre o tipo de interação, conseguida pela partição da soma de quadrado da interação em partes simples e complexa.

Quando o interesse é o de predizer as conseqüências do ganho de seleção realizado em um determinado local, ou na média de locais, em qualquer outro

ambiente, é necessário o conhecimento da correlação, considerando cada caráter, para os pares de ambientes estudados. Este tipo de correlação difere da situação convencional, pois não se têm diferentes caracteres, mas um único, avaliado em diferentes ambientes. Nestes casos a covariância entre os valores fenotípicos é unicamente determinada por fatores genéticos, uma vez que os erros aleatórios, que ocorrem nos diferentes indivíduos nos pares de locais, são independentes. Surgem, por este motivo, outras medidas de correlação ou de similaridade entre ambientes, que devem ser tomadas como indicativo da eficiência ou não de se selecionar genótipos em um ambiente, com vistas a sua utilização em outro, ou outros, da região de aptidão da cultura (Cruz & Regazzi, 1997).

7.3 ESTABILIDADE E ADAPTABILIDADE

Estudos da estabilidade e adaptabilidade permitem obter informações pormenorizadas sobre o comportamento de cada genótipo frente às variações ambientais. Nestes estudos, dependendo da metodologia utilizada, é possível obter informações do ambiente, caracterizando-os como favoráveis ou desfavoráveis, e do genótipo identificando-se aqueles de comportamento previsível ou imprevisível, em termos de predição de seu comportamento linear, em razão de alterações no ambiente e da sua capacidade de resposta às variações ambientes, em condições específicas ou amplas.

Segundo Cruz & Regazzi (1997) há mais de uma dezena de metodologias de análise de adaptabilidade e estabilidade destinadas à avaliação de um grupo de materiais genotípicos testados numa série de ambientes. Essas metodologias são fundamentadas na existência de interações e distinguem-se dos conceitos de adaptabilidade e estabilidade adotados e de certos princípios estatísticos empregados. A escolha de um método de análise depende dos dados experimentais, principalmente os relacionados com o número de ambientes disponíveis, da precisão requerida e do tipo de informação desejada. Deve-se também considerar que alguns métodos são alternativos, enquanto outros são complementares, podendo ser utilizados conjuntamente. É importante que programas computacionais disponham de opções de metodologias para análise de tal forma que o pesquisador possa escolher aquela mais adequada aos seus dados e que atenda seus princípios ou conceitos de adaptabilidade e estabilidade.

7.4 CORRELAÇÕES E REGRESSÕES

O conhecimento da associação entre caracteres é de grande importância nos trabalhos de melhoramento, principalmente se a seleção em um deles apresenta dificuldades, em razão da baixa herdabilidade e, ou, tenha problemas de medição e identificação. A correlação que pode ser diretamente mensurada a partir de medidas de dois caracteres, em certo número de indivíduos da população, é a fenotípica. Esta correlação tem causas genéticas e ambientais, porém só as genéticas envolvem uma associação de natureza herdável, podendo, por conseguinte, ser utilizada na orientação de programas de melhoramento. Assim, em estudos genéticos é indispensável distinguir e quantificar o grau de associação genética e ambiental entre os caracteres.

A causa da correlação genética é, principalmente, a pleiotropia. Ligações gênicas são causas transitórias, especialmente em populações derivadas de cruzamento entre linhagens divergentes (Falconer, 1981). Se dois caracteres apresentam correlação genética favorável, é possível obter ganhos para um deles por meio da seleção indireta no outro associado. Em alguns casos, a seleção indireta, com base na resposta correlacionada, pode levar a progressos mais rápidos do que a seleção direta do caráter desejado. Entretanto, se um caráter correlacionar-se negativamente com alguns e positivamente com outros, deve-se tomar o cuidado de, ao selecionar esse, não provocar mudanças indesejáveis em outros.

O ambiente torna-se causa de correlações quando dois caracteres são influenciados pelas mesmas diferenças de condições ambientais. Valores negativos desta correlação indicam que o ambiente favorece um caráter em detrimento do outro, e valores positivos indicam que os dois caracteres são beneficiados ou prejudicados pelas mesmas causas de variações ambientais. De maneira geral, as correlações genéticas e ambientais apresentam o mesmo sinal, entretanto, nos casos em que isto não ocorre, há indicativo de que as causas da variação genética e ambiental influenciam os caracteres por meio de diferentes mecanismos fisiológicos (Falconer, 1981). Os sinais dos coeficientes de correlação fenotípica e genotípica podem, eventualmente, ser diferentes, sendo o fato, em geral, atribuído a erros de amostragem. Programas computacionais que possibilitam a obtenção de estimativas de correlações fenotípicas, genotípicas e de ambiente são, portanto, de grande importância. Estas estimativas têm grande significado *per se*, e muitas vezes são utilizadas em vários outros estudos, permitindo a obtenção de informações mais completas sobre os caracteres em estudo.

Estudos mais refinados das correlações entre caracteres são feitos por meio da análise de correlação parcial, análise de trilha e correlação canônica. Assim, considera-se que um alto ou baixo coeficiente de correlação entre duas variáveis pode ser o resultado do efeito que, sobre essas duas variáveis, tem uma terceira variável ou um grupo de variáveis. Se isto ocorre, os coeficientes de correlação simples podem produzir grandes equívocos a respeito da relação que há entre duas variáveis, podendo não ser uma medida real de causa e efeito.

Uma medida mais informativa sobre a relação entre variáveis é o coeficiente de correlação parcial, que é estimado removendo-se os efeitos de outras variáveis sobre a associação estudada. Estudos sobre o desdobramento do coeficiente de correlação são feitos pela análise de trilha desenvolvida por Wright (1921; 1923) e pormenorizada por Li (1975). Tais estudos são fundamentais pois os coeficientes de correlação, apesar de serem de grande utilidade na quantificação da magnitude e direção das influências de fatores na determinação de caracteres complexos, não dão a exata importância relativa dos efeitos diretos e indiretos destes fatores. A análise de trilha (*path analysis*) consiste no estudo dos efeitos diretos e indiretos de caracteres sobre uma variável básica, cujas estimativas são obtidas por meio de equações de regressão, em que as variáveis são previamente padronizadas. Apesar de a correlação ser uma característica intrínseca a dois caracteres em dada condição experimental, sua decomposição é dependente do conjunto de caracteres estudados, que normalmente são avaliados pelo conhecimento prévio do pesquisador de suas importâncias e de possíveis inter-relações expressas em "diagramas de trilha".

A análise de trilha, nos casos em que se considera um único modelo causal, é simplesmente uma análise de regressão parcial padronizada, sendo útil no desdobramento dos coeficientes de correlação em efeito direto e indireto. Entretanto, a análise de trilha constitui-se numa expansão da regressão múltipla, quando são envolvidas inter-relações complexas e, ou, vários diagramas causais, como é comumente encontrado em estudos de melhoramento envolvendo a produção de grãos ou frutos, os componentes primários da produção e também os caracteres secundários. Alguns programas computacionais permitem realizar a análise da inter-relação entre as variáveis, permitindo ao melhorista o entendimento da associação entre o complexo de variáveis, adotando um diagrama de causa e efeito segundo sua ótica ou experiência adquirida sobre o estudo.

Uma outra opção de análise de associação entre caracteres pode ser feita com base nas correlações canônicas que supera a limitação apresentada pela análise de trilha de considerar somente uma única variável dependente. Na análise de correlações canônicas, estima-se a máxima correlação entre dois complexos de variáveis compostos por combinações lineares dos vários caracteres que os constituem. As correlações canônicas permitem avaliar as inter-relações entre dois complexos determinados por um número arbitrário de caracteres. No melhoramento, citam-se, como possibilidade de emprego desta metodologia, os casos em que se interessa avaliar as relações entre, por exemplo, caracteres de parte aérea *versus* sistema radicular, caracteres agronômicos *versus* fisiológicos, componentes primários *versus* componentes secundários da produção etc.

A análise de correlação canônica caracteriza-se por avaliar relações entre dois complexos influenciados, cada um, por, no mínimo, dois caracteres. De maneira genérica considera-se que o primeiro complexo é estabelecido por p caracteres e o segundo, por q. O número de correlações canônicas é igual ao menor número de caracteres que constituir um dos complexos (p ou q), e sua magnitude sempre decresce com a ordem em que são estimadas. Entretanto, o primeiro coeficiente é sempre maior ou igual, em valor absoluto, a qualquer coeficiente de correlação simples ou múltipla, entre os caracteres do primeiro e do segundo grupo.

7.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

Técnicas de análise multivariada têm-se constituído em ferramentas de grande utilidade em estudos genéticos, por considerar simultaneamente um conjunto de caracteres, considerados de interesse pelo melhorista. Há grande variedade de procedimentos multivariados, destinados a análises com diferentes objetivos e aplicáveis a diferentes conjuntos de dados, incluindo os quantitativos e os binários, normalmente obtidos em estudos de genética molecular.

Alguns estudos mais utilizados são aqueles em que o interesse é o de avaliar a similaridade ou dissimilaridade entre acessos, com objetivo de recomendar intercruzamentos entre genitores divergentes em programas de hibridação, ou para administrar informações disponíveis em bancos de germoplasma. Neste caso têm sido adotadas técnicas de análise de agrupamento, de componentes principais e de variáveis canônicas.

Outros estudos multivariados de grande importância são as análises discriminantes ou classificatórias, em que são geradas funções de discriminação, de uso preditivo. Assim, é possível alocar genótipos em grupos previamente conhecidos, por meio de informações comparando-as com histórico de outros acessos já sabidamente pertencentes aos grupos estabelecidos. Ferreira *et al.* (1995) utilizaram análise discriminante para classificar genótipos de arroz, como tolerantes ou sensíveis a altos níveis de alumínio, por meio de funções discriminantes estabelecidas previamente.

Outro procedimento multivariado que vem ocupando importância em estudos genéticos é a análise de fatores, que permite agregar em um determinado complexo, características que representam uma parte comum do genoma do indivíduo, caracterizando um supercaráter, com interpretação biológica.

As técnicas multivariadas têm sua eficiência comprovada em vários estudos genéticos e, proporcionam enriquecimento das informações extraídas dos dados experimentais. Entretanto, para seu uso, é necessária a disponibilidade de equipamentos eletrônicos e *softwares*, que até pouco tempo atrás, eram escassos. Segundo Cruz (1990) a escassez de recursos computacionais não só limitou o uso como também inibiu o repasse de conhecimento de técnicas multivariadas entre os melhoristas no Brasil. Com o avanço da informática, o emprego de tais técnicas torna-se potencialmente grande e, conseqüentemente, o seu conhecimento indispensável ao melhorista. Atualmente, programas computacionais têm sido ferramentas fundamentais tanto na pesquisa quanto no ensino destas técnicas entre os melhoristas.

7.6 GANHOS POR SELEÇÃO

Uma das maiores contribuições da Genética Quantitativa é a predição dos ganhos por seleção, permitindo ao melhorista avaliar a eficiência de seu trabalho, orientá-lo na adoção da melhor estratégia, avaliar o potencial do material disponível e comparar com outros igualmente promissores. Esta é uma área em que o processamento de dados dará grandes contribuições, sendo um campo aberto à pesquisa. É necessário que recursos computacionais estejam disponíveis para agilizar o processo de coleta de dados, processamento e utilização das informações no processo de seleção.

Quando se realiza um programa de melhoramento há uma série de etapas que envolvem custos, tempo e mão-de-obra. Desde a obtenção do material experimental, implantação e condução dos ensaios, utilização de tratos culturais e colheita, há necessidade de cuidados especiais para que as informações sejam as mais corretas e as decisões sejam as mais apropriadas. Ganhos consideráveis têm sido obtidos a partir da eleição de genótipos superiores identificados por melhoristas já com grande experiência e capacidade de observação. Em outras situações, onde há bastante variabilidade, também se consegue ganhos consideráveis apenas pela discriminação entre o bom e o ruim, feita por pessoas não tão experientes ou qualificadas. Entretanto, com o melhoramento intensivo de muitas espécies, e quando se tem um grande número de experimentos a serem analisados, o processamento de dados, em que se obtém as informações genéticas pertinentes, é fundamental no processo de seleção.

Nesta fase, em que não há mais custo, ou estes são mínimos, ainda há uma série de alternativas para seleção que permitem conduzir a resultados de maior retorno. Assim, há possibilidade de se fazer seleção direta, indireta, combinada ou adotar índices de seleção. Estes procedimentos permitem predizer conseqüências, identificar unidades mais apropriadas de seleção e constitui-se numa ferramenta fundamental na distinção entre o material bom e o ótimo.

Outra importância de aplicativos computacionais com rotinas para estabelecimento de critérios de seleção, refere-se à disonibilização de metodologias para obtenção de índices. São inúmeros os trabalhos evidenciando a superioridade da técnica de índices de seleção sobre a seleção direta, ou mesmo sobre a seleção combinada em relação a entre e dentro. Alguns aplicativos contam com estas opções de análise permitindo ao melhorista confrontar resultados preditivos e escolher aquele de maior eficácia em termos de promover ganhos satisfatórios na população e conduzir a um produto final que reúna, simultaneamente, qualidades que satisfaçam o consumidor final.

7.7 ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS

A maioria das análises biométricas requer que os dados sejam submetidos a análise prévia de variância, onde hipóteses são avaliadas, precisão experimental é conhecida e muitas outras informações de relevância são geradas. Programas de computadores específicos para a área de genética, realizam análises de variâncias por meio de variados modelos estatísticos e permitem estimar os parâmetros genéticos úteis no melhoramento. Além das análises de variância é fundamental que os aplicativos, para o usuário da área de genética, forneçam as estimativas da variabilidade genética, das herdabilidades, coeficientes de variação genético e ambiental, correlações fenotípicas, genotípicas e de ambiente, dentre outras.

Estas estimativas são fundamentais para que se possa avaliar a potencialidade da população sob estudo, da viabilidade da técnica empregada e, principalmente, da acurácia do processo seletivo.

7.8 ANÁLISE DIALÉLICA

O termo dialelo tem sido utilizado para expressar um conjunto de p(p-1)/2 híbridos, resultante do acasalamento entre p genitores (linhagens, variedades, clones etc.), podendo incluir, além dos respectivos pais, os híbridos recíprocos e, ou, outras gerações relacionadas, tais como F_2's, retrocruzamentos etc. As metodologias de análise dialélica têm por finalidade analisar o delineamento genético, provendo estimativas de parâmetros úteis na seleção de genitores para hibridação e no entendimento dos efeitos genéticos envolvidos na determinação dos caracteres. Entre as metodologias mais comumente utilizadas citam-se a proposta por Griffing (1956), pela qual são estimados os efeitos e as somas de quadrados de efeitos da capacidade geral e específica de combinação; a metodologia proposta por Gardner & Eberhart (1966), na qual são avaliados os efeitos de variedades e heterose varietal; e a proposta por Hayman (1954), que dá informações sobre o mecanismo básico de herança do caráter em estudo, dos valores genéticos dos genitores utilizados e do limite de seleção.

De maneira geral, têm sido utilizados vários tipos de dialelos, cujas características são apresentadas a seguir. Os dialelos balanceados (completos ou de meia-tabela) são aqueles que incluem os híbridos F_1's entre todos os pares de combinações dos genitores, podendo adicionalmente incluir os genitores, seus híbridos recíprocos e, algumas vezes, outras gerações relacionadas, como F_2's, retrocruzamentos etc. Dialelos parciais envolvem dois grupos de genitores e seus respectivos cruzamentos, à semelhança do modelo fatorial proposto por Comstock & Robinson (1948) (Delineamento II). Adaptações do modelo de Griffing (1956) e de Gardner & Eberhart (1966), para este tipo de dialelo, têm possibilitado maximizar as informações sobre os grupos estudados com um número menor de cruzamentos do que os requeridos no dialelo balanceado. Dialelos circulantes são aqueles em que os genitores são representados, no delineamento, por um mesmo número de cruzamentos, porém inferior a p-1, como ocorre nos balanceados. Estes dialelos permitem obter informações sobre os genitores com um número menor de cruzamentos, entretanto, há perda de informações a respeito de certas combinações híbridas, que ficam ausentes. Dialelos incompletos são aqueles em que os genitores são representados por um número variável de cruzamentos. Em geral este tipo de delineamento ocorre como conseqüência de perdas de tratamentos durante a condução dos ensaios ou ausência dos mesmos por problemas diversos, tais como insuficiência de sementes, incompatibilidade de cruzamentos etc. Dialelos desbalanceados são aqueles em que todas as combinações híbridas e também as demais gerações (genitores, recíprocos etc.) estão representadas, porém em freqüência variável, em virtude do número desigual de repetições por tratamento.

8. APLICATIVOS COMPUTACIONAIS

Alguns aplicativos computacionais estão disponíveis na comunidade científica, sendo utilizados em muitos estudos da área de genética e melhoramento. Muitos programas são de uso mais restrito ou abrangem apenas certos procedimentos biométricos, mas são igualmente importantes e, por meio deles, têm sido viabilizados muitos estudos genéticos. A escolha do aplicativo depende de uma série de fatores, o principal é a qualidade do processamento, confiabilidade, e capacidade de gerar resultados de interesse para o usuário. Existem programas amplos, de padrão internacional reconhecido, que devem ser preferidos, pois além de sua qualidade, apresentam grande consistência e confiabilidade pois estão sob responsabilidade de equipe técnica qualificada. O uso destes programas, entretanto, tem sido limitado pelo custo do *software* ou mesmo pela abrangência, que de tão ampla, acaba indo além do interesse do usuário, que passa a ter certa dificuldade em reconhecer, entre as várias opções disponíveis, aquelas que seriam mais apropriadas a sua análise. É por este motivo que programas mais específicos têm ocupado lugar de importância, e o desenvolvimento de *software* constitui-se numa contribuição relevante para pesquisa, principalmente em genética e melhoramento.

• **Programa SAS**

O programa SAS é desenvolvido pelo Instituto de SAS, que é a maior companhia privada de *software* do mundo. Fundado em 1976, o Instituto de SAS

está em sua terceira década de desenvolvimento contínuo de *software*, destinado a diferentes seguimentos da sociedade, tanto empresarial, governamental quanto técnico-científico.

Com mais de 3,5 milhões de usuários, abrangendo mais de 31.000 localidades em 120 países, sendo um programa atual, e ainda com metas de ampliação de procedimentos permitindo obter soluções mais eficazes a problemas diversos. O Instituto atende uma comunidade de usuário ampla, a qual requer um compromisso extraordinário para apoio de cliente e uma presença verdadeiramente global, levando-o a ter escritórios estabelecidos, subsidiárias, e distribuidores em uns 50 países e distritos ao redor do mundo.

O Instituto SAS também desenvolve programas para soluções empresariais que são pacotes completos para consolidação financeira, análise em diversas áreas, citando-se como exemplo sua utilização em análises clínica, administração de recursos humanos, e administração de serviço; como também soluções específicas destinadas à pesquisa, indústria e comércio.

Informações adicionais sobre o programa SAS são encontradas no site http://www.sas.com/.

• **Programa SPSS**

A empresa que desenvolve o programa SPSS foi fundada em 1968, contando atualmente com mais de 40 escritórios distribuídos no mundo. Informam que mais de 250 mil organizações utilizam o programa SPSS, que se destina a análise, criação e distribuição de informações para auxiliar na tomada da melhor decisão. Tem aplicações diversas incluindo aplicações técnicas e científicas.

Informações adicionais sobre o programa SPSS são encontradas no site http://www.spss.com/.

• **Programa SAEG**

O SAEG foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, e destina-se a usuários de diferentes áreas da Ciência (Engenheiros, Biólogos, Economistas etc) que possuam conhecimento mínimo de informática e domínio razoável das análises estatísticas aplicadas em suas áreas. Portanto, para usar o SAEG, basta que o técnico saiba usar um editor de texto qualquer e, naturalmente alguns comandos básicos do sistema operacional do seu computador. Segundo o autor (Euclides, 1996), durante a década de 80, por meio de sugestões apresentadas por usuários de várias empresas e universidades do país, o SAEG foi modificado, ampliado e adaptado para atender às necessidades de análises de dados de pesquisadores e técnicos das mais diferentes áreas do conhecimento.

Atualmente, mais de 500 cópias do SAEG estão instaladas em empresas públicas, privadas e universidades brasileiras e sul-americanas. Mais de 5000 técnicos têm usado este sistema como principal ferramenta para processamento de suas análises estatísticas. O SAEG é composto de aproximadamente 70 procedimentos para análises estatísticas e para manipulação de dados.

Informações adicionais sobre o programa SAEG encontram-se disponíveis no site http://www.ufv.br/saeg/.

• **Programa GENES**

O programa GENES é constituído por cerca de 90 programas executáveis. Os procedimentos são utilizados em diversos estudos genéticos aplicados a animais de grande e pequeno porte ou de culturas de plantas em geral. Existem duas versões, desenvolvidas para serem utilizadas sob sistema operacional DOS ou *windows* 95, ou superior, ambas compatíveis com microcomputadores da linha IBM PC. O programa GENES apresenta procedimentos de análise estatística que podem ser utilizados por grande número de pesquisadores de qualquer área de pesquisa. Assim, estatísticas descritivas, análise de variância, de regressão, de correlação e testes comparativos de médias que são amplamente utilizados por pesquisadores das diversas áreas. Além deste procedimento, o GENES conta com procedimentos específicos de biometria aplicadas a dados obtidos de estudos de Genética e Melhoramento. Dados binários, normalmente obtidos de estudos de Genética Molecular, também são processados, permitindo análise de diversidade genética.

Sua utilização é facilitada, por contar com painéis globais de ajuda, em cada procedimento, e sistema de "rodapé" explicativo em cada solicitação de informação ou dimensionamento de parâmetros. A entrada de dados também é facilitada, pois o programa dá acesso ao seu próprio editor de texto/dados. O usuário também pode utilizar outros editores para inserir seus dados e, posteriormente, convertê-los na forma .txt ou .prn, para o processamento.

A distribuição do programa é gratuita. Informações adicionais e o aplicativo podem ser obtidos no endereço: http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm.

A seguir são descritos alguns *sites* considerados interessantes para pesquisadores da área de genética e melhoramento.

• **StatLib**

O site do StatLib, conta com sistema para distribuir *software* estatístico, grupos de dados, e informação por correio eletrônico, FTP e WWW. O StatLib iniciou com um serviço de *e-mail* e algumas das organizações que disponibilizam estes serviços ainda refletem a estrutura que originalmente foi apresentada. Neste *site* é possível obter algoritmos selecionados a serem transcritos da área de estatísticas aplicadas; macros, fontes de programas aplicados a área de estatística, bem como listas de endereços de outros *sites* interessantes ou de *e-mail* de estatísticos cadastrados. O endereço eletrônico é http://www.statlib@lib.stat.cmu.edu/.

• **Agrosoft**

O Agrosoft é um Núcleo Softex e tem na sua missão apoiar e fomentar o uso da informática em toda a cadeia produtiva do agronegócio. Apresenta guia completo e atualizado de *softwares* brasileiros aplicados a área de administração; animais e veterinária; lavouras e florestas; tecnologias e multimídia. Para cada título estão disponíveis informações sobre título, principais características funcionais do *software*; preço informado pelo autor ou distribuidor principal; nome da empresa distribuidora do produto e informações para contato tais como endereço, telefone, fax, *e-mail* e *home page*. O *site* da agrosoft é http://www.agrosoft.com/.

A Sociedade Brasileira para Promoção da Exportação de *Software* - SOFTEX - tem por missão transformar o Brasil em um centro de excelência na produção e exportação de *software*, tendo como objetivo permanente situar o Brasil entre os cinco maiores produtores e exportadores mundiais. O endereço do softex é http://www.softex.br/index.html.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUROW, M.D.; COORS, J.G. Diallel: a microcomputer program for the simulation and analysis of diallel crosses. **Agronomy Journal**, v.86, p.154-158,1994.

CARVALHO, S.P. Métodos alternativos de estimação de coeficientes de trilha e índices de seleção, sob multicolinaridade. Viçosa, 1995. 163p. Tese, Doutorado.

COMSTOCK,R.E., ROBINSON,H.F. The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. **Biometrics**, v.4, p.254-266,1948.

CRUZ, C.D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 188p. Tese, Doutorado.

CRUZ, C.D. **Programa GENES:** Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Ed. UFV, 1997. 442p.

CRUZ, C.D. Programa GENES: Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.135-138,1998.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: Ed.UFV, 1997. 390p.

CRUZ, C.D.; CASTOLDI, L.F. Decomposição da interação genótipo x ambientes em partes simples e complexa. **Revista Ceres**, v.38, p.422-430, 1991.

CRUZ,C.D.; VENCOVSKY,R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p.425-438,1989.

DACHS, N. **Estatística computacional**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1998. 236p.

EBERHART, S.A.; RUSSELL, W.A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, v.6, p.36-40, 1966.

EUCLYDES, R.F. Uso de sistema Genesys na avaliação de métodos de seleção clássicos e associados a marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 1996. 135p. Tese, Doutorado.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV. Imprensa Universitária,1981. 279p.

FERREIRA, F. Estimadores viesados para modelos de regressão em presença de multicolinearidade. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 127p. Tese, Doutorado.

FERREIRA, R.P.; CRUZ, C.D.; SEDIYAMA, C.S.; FAGERIA, N.K. Identificação de cultivares de arroz tolerante à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.789-795, 1995.

FINLAY, K.W.; WILKINSON, G.N. The analysis of adaptation in a plant breeding programme. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.14, p.742-754,1963.

GARDNER, C.O.; EBERHART,S.A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, v.22, p.439-452, 1966.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallell crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.9, p.463-493, 1956.

HAYMAN, B.I. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, v.39, p.789-809, 1954.

KEMPTHORNE , O. Comment on Searle's paper. **Biometrics**, v.24, p.782-784, 1968.

LI, C.C. **Path analysis:** a primer. Boxwood: Pacific Grove, 1975. 346p.

MCNITT, L.L. **Simulação em basic**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1985. 348p.

MONTGOMERY, D.C. PECK, E.A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 504p.

NAYLOR, T.H.; BALINTFY, J.L.; BURDICK, D.S.; CHU, K. **Técnicas de simulação em computadores**. São Paulo: Ed. Vozes, 1971. 401p.

NETER, J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**. Homewood: Richard D. Irwin, 1974. 842p.

PARTNER, PL.R.; SMITH, M.L.; SPOOR, W.; CLARKSON, M.I. Computer simulation of selection in a hypothetical crop species. **Computer Applications in the Biosciences**, v.9, p.597-605,1993.

SEARLE, S.R. **Linear models**. New York: John Wiley & Sons, 1971. 531p.

SHRIVASTAVA, M.N.; SHARMA, K.K. Analysis of path coefficients in rice. **Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung**, v.77, p.174-177, 1976.

SILVA, R.G. **Métodos de genética quantitativa aplicados ao melhoramento animal.** Ribeirão Preto: SBG-RBG, 1982. 162p.

TOMS, E.M.; CORNISH, M.A.; KEARSEY, M.I. Comparison of family and sib selection during selfing. **Heredity**, v.73, p.635-641,1994.

TREVISAM, J. **Curso de programação Basic**. 2.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. 229p.

WRIGHT, S. Correlation and causation. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.557-585,1921.

WRIGHT, S. The theory of path coefficients: a replay to Niles' criticism. **Genetics**,v.8, p.239-255, 1923.

VENCOVSKY, R.; CRUZ, C.D. Comparação de métodos de correção do rendimento de parcelas com estandes variados: I. Dados simulados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.647-657, 1991.

35

USO DE SIMULAÇÃO NO MELHORAMENTO

DANIEL FURTADO FERREIRA

Depto. de Ciências Exatas - UFLA, C.P. 37 - CEP: 37200-000 - Lavras, MG.

1. INTRODUÇÃO

A simulação consiste em construir um sistema que imite o funcionamento de uma realidade, com a finalidade de averiguar o que aconteceria no sistema real se alterações de interesse fossem efetuadas no seu funcionamento (Dachs, 1988). Informações valiosas podem ser extraídas desse sistema simulado, com menor custo e maior rapidez. No sistema real muitas das opções de alterações são inviáveis de serem avaliadas, seja pelos custos que podem ser elevados, pelos longos períodos de resposta ou pela incerteza da direção e sentido das respostas, fatores estes que podem conduzir a um dano irreparável a este sistema.

Ao utilizar-se de uma técnica de simulação o pesquisador deve-se precaver contra erros: sejam estes erros devidos a problemas com os levantamentos amostrais, escolha inadequada das distribuições de probabilidades nos eventos de natureza aleatória, simplificação inadequada da realidade e erros de implementação do sistema simulado. Para a garantia de sua eficiência pode-se lançar mão de processos de validação. Essa validação consiste em fazer o sistema simulado operar nas condições do sistema real e verificar através de testes de hipóteses e outras análises estatísticas, se os resultados observados na simulação condizem com os observados no sistema real.

Dentre as diversas alternativas de técnicas de simulação existentes, destaca-se o método de Monte Carlo, que considera todas as categorias de problemas ou de sistemas que têm base probabilística ou estocástica. Nas ciências agrárias, e especificamente na genética, os eventos na sua maioria possuem natureza aleatória como base. Sendo assim, os processos de simulação envolvendo o método de Monte Carlo adquirem grande importância. O método de Monte Carlo pode ser usado, por exemplo, na escolha a ser realizada pelo melhorista entre dois distintos estimadores de um parâmetro genético. A importância da obtenção de uma boa estimativa, reside no fato de que a avaliação deste parâmetro pode redirecionar o programa de melhoramento em uso ou a ser usado. Do exposto, verifica-se que estimadores com propriedades estatísticas ótimas devem ser preferidos. A simulação Monte Carlo pode ser usada nesse caso, o que permitiria fornecer informações de qual é o estimador ideal. Obviamente, o uso de simulação só se justifica se soluções analíticas não existirem ou o grau de dificuldades e o número de variáveis envolvidas não permitirem a realização de inferências adequadas sobre o problema. A simulação também pode ser usada para comparar a eficiência de um novo procedimento ou técnica em relação a outras já existentes e até mesmo consagradas. Se estes métodos são rotineiramente empregados a alguma das etapas de um programa de melhoramento, qualquer melhoria ou aumento da eficiência destas serão pertinentes. Isso porque técnicas cada vez mais refinadas são exigidas, uma vez que as diferenças a serem detectadas pelo melhoramento, tem se tornado cada vez menores.

O uso da simulação deve ser encarado pelos geneticistas e melhoristas como uma alternativa para a resolução de seus problemas, detecção e comprovação de

técnicas estatísticas mais eficientes, comparação de métodos de melhoramento, avaliação da viabilidade de uso da seleção assistida por marcadores, entre outras possibilidades. Se a solução desses problemas for obtida de forma mais rápida e com menor custo, além de facilitar a interpretação, o uso da simulação é justificável.

2. GERAÇÃO DE NÚMEROS ALEATÓRIOS E DE VARIÁVEIS ESTOCÁSTICAS

Como já foi comentado, a maioria dos problemas em genética e melhoramento de plantas possui natureza aleatória. Do exposto, na simulação de sistemas genéticos, a geração de números aleatórios adquire fundamental importância. Inúmeros programas de computador e linguagens (compiladores) de programação possuem rotinas prontas para a geração de números aleatórios. Esses números são gerados em uma seqüência que só se repete após um ciclo superior a ordem dos trilhões de algarismos. Dessa forma, os números gerados são pseudo-aleatórios. Para fins práticos, uma vez que a seqüência completa jamais será usada, esses números comportam-se como números genuinamente aleatórios. Uma seqüência completa é chamada de ciclo. Um método de geração dessas sequências, conhecido por método da congruência (Smith, 1977), está apresentado a seguir:

$$X_{i+1} = (a\,X_i + c)\ mod\ m$$

em que:

mod: operador que retorna o resto da divisão entre números inteiros;
X_i e X_{i+1}: são os números aleatórios gerados no passo i e i+1, respectivamente;
a: multiplicador;
c: incremento; e
m: módulo.

A geração adequada de uma boa seqüência de números aleatórios depende da criteriosa escolha dos valores iniciais de *a*, *c* e *m*. É conveniente salientar que um valor inicial (X_0) para o valor de *X* deve ser estabelecido "a priori". Esse valor é conhecido por semente. A fim de ilustrar a geração de números aleatórios inteiros, é apresentado a seguir todos os passos, com escolhas simplificadas dos valores usados no método da congruência:

Sejam, $a=c=7$, $m=10$ e $X_0=7$ (semente), então,

$X_1 = (7 \times 7 + 7)\ mod\ 10 = 56\ mod\ 10 = 6$

$X_2 = (7 \times 6 + 7)\ mod\ 10 = 49\ mod\ 10 = 9$

E assim por diante. A sequência obtida é:

{6, 9, 0, 7, 6, 9, 0, 7, 6, 9, ...}

Verifica-se que o ciclo é 5, ou seja, a cada cinco algarismos gerados a seqüência se repete. O valor do ciclo é em geral menor do que o módulo m. Um bom gerador de número aleatórios, possui ciclo de ordem superior aos trilhões e depende da escolha adequada dos valores do multiplicador, incremento e módulo. A linguagem FORTRAN usa os seguintes valores: $a=14^{69}$; $m=e^{31}$ -1 e c=0. A geração de números uniformes entre 0 e 1, é obtida dividindo-se o número aleatório gerado em um dado estágio pelo valor de m, ou seja,

$$u_{i+1} = \frac{X_{i+1}}{m}$$

em que, u_{i+1} é um número aleatório com distribuição uniforme entre 0 e 1, obtido no estágio i+1.

A partir da geração de números uniformes entre 0 e 1, U(0,1), é possível gerar variáveis aleatórias que sigam uma distribuição de probabilidade qualquer. Para isso, é necessário definir a função de densidade dessa variável aleatória (X) por f(x) e a função de distribuição de probabilidade por $F(x)=P(X \leq x)$. Com essas definições, e usando o teorema da probabilidade integral é possível mostrar que se U tem distribuição uniforme em 0 e 1, $U \cap U(0, 1)$, então,

$$x = F^{-1}(u)$$

tem f(x) como densidade de probabilidade (Hoel *et al.*, 1978).

A Figura 1 ilustra esse processo definido matematicamente. Verifica-se que a partir da geração de um número aleatório qualquer, denominado u_0, e apresentado na ordenada da função de distribuição de probabilidade, é possível inverter essa função e determinar o valor x_0. Se diferentes valores de u são gerados pelo processo aleatório descrito anteriormente, e se para cada valor forem obtidos os valores correspondentes de X, garante-se que esta seqüência representa uma amostra de uma variável aleatória com densidade f(x).

A seguir é apresentado um exemplo para consolidar esses resultados e teoremas. Será gerado uma amostra de n=4 elementos de uma variável X com densidade f(x)=2x, $0 \leq x \leq 1$. Pode-se observar que o domínio da variável X, consiste no intervalo fechado entre 0 e 1. Portanto, a amostra deverá conter valores de X dentro do seu domínio.

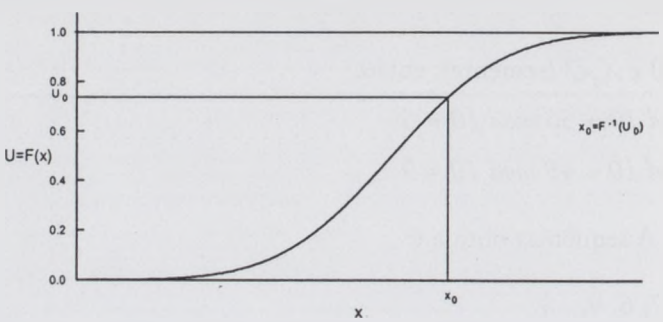


FIGURA 1. Descrição do processo de geração de uma variável aleatória X com densidade f(x) a partir da geração de números aleatórios U com distribuição uniforme (0, 1).

Da teoria probabilística sabe-se que $F(x)=P(X \leq x)$ é dado por:

$$F(x) = \int_0^x f(t)dt = \int_0^x 2tdt = x^2$$

$$F(x) = x^2$$

Usando-se o teorema apresentado, igualando-se uma variável aleatória U(0, 1) a F(x) e resolvendo em x, tem-se:

$$U = F(x) = x^2 \Rightarrow U = x^2 \Rightarrow x = \sqrt{U}$$

Pelo teorema da probabilidade integral, verifica-se que $F^{-1}(U) = \sqrt{U}$. Para gerar uma amostra com n=4 elementos, necessita-se de uma amostra de 4 valores para a variável uniforme U(0, 1). Utilizando-se um gerador de números aleatórios, semelhante ao descrito anteriormente, construiu-se a seguinte sequência:

U={0,0209; 0,0939; 0,2977; 0,9342}

Assim, os valores de X que possuem densidade f(x)=2x, dados por $x = \sqrt{U}$, são:

X={0,1446; 0,3064; 0,5456; 0,9665}

Com este simples exemplo, utilizando uma densidade também simples, procurou-se ilustrar a geração de variáveis contínuas. Obviamente, densidades mais complexas, requerem a obtenção analítica de sua função de distribuição e da inversa da função de distribuição de probabilidades. Isso nem sempre é possível de ser obtido. Felizmente, uma ampla gama de excelentes aproximações existem na literatura para as principais funções de distribuições conhecidas (Dachs, 1988; Naylor *et al.*, 1971; Morgan, 1995). Nesses livros especializados, encontram-se inversões da distribuição normal, F, Qui-quadrado e t de Student, entre outras, que foge do escopo deste material sua apresentação. É conveniente salientar, que diversos programas estatísticos apresentam rotinas para inversões de funções de distribuições de probabilidades. Merece destaque entre eles o programa SAS Institute (1995) que permite a geração de números aleatórios e de variáveis aleatórias de diversas densidades distintas.

Algumas densidades contínuas serão abordadas a seguir, pelas suas aplicações na genética e melhoramento de plantas. Serão consideradas também algumas densidades discretas de importância conhecida. No que segue, é dado ênfase a geração de valores de uma variável X, que tem densidade f(x) específica, conforme o caso.

2.1 DENSIDADE EXPONENCIAL

A densidade exponencial é definida por um único parâmetro (α), sendo que a variável aleatória (X) pode apenas ser nula ou positiva. Essa densidade é apresentada a seguir, juntamente com o seu gráfico (Figura 2) e de sua função de distribuição (Figura 3).

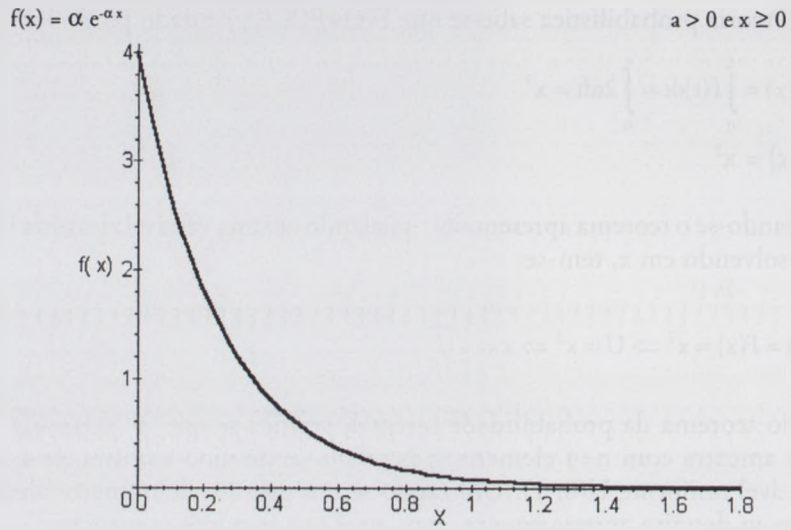


FIGURA 2. Distribuição exponencial com parâmetro α=4, para ilustrar a densidade exponencial.

Verifica-se que a variável X, com distribuição exponencial, tem média (μ) e variância (σ^2) definidos em função de α por:

$$\mu = \frac{1}{\alpha}$$

$$\sigma^2 = \frac{1}{\alpha^2}$$

A função de distribuição de probabilidade F(x), pode ser obtida analiticamente integrando f(x). O resultado dessa integral é:

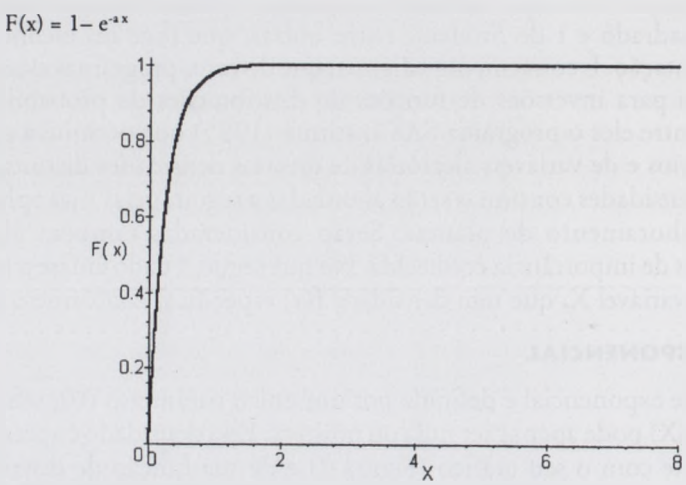


FIGURA 3. Função de distribuição exponencial, F(x), com parâmetro α=4.

Para a geração de números aleatórios que seguem a distribuição exponencial, é necessário como já descrito, igualar os valores de uma uniforme U(0,1), a F(x) e resolver em x. Assim, tem-se:

$$U = F(x) = 1 - e^{-\alpha x}$$

Resolvendo em x, obtém-se o seguinte resultado:

$$x = -\frac{1}{\alpha} \ln (1 - U)$$

Devido a simetria da distribuição exponencial é possível trocar F(x) por 1-F(x). Com isso, é possível simplificar a expressão anterior sem que se afete o resultado proposto. O resultado obtido é:

$$x = -\frac{1}{\alpha} \ln (U)$$

Como $1/\alpha$ é média (μ) da distribuição exponencial, tem-se:

$$x = -\mu \ln (1 - U)$$

em que, *ln* é o logaritmo neperiano. Os valores de x, gerados pela expressão anterior seguirão a distribuição exponencial. Essa densidade, em genética, tem sido usada muitas vezes para simular efeitos alélicos de diferentes genes, devido ao fato de algumas evidências na literatura apontarem para a existência de genes de grandes efeitos e genes de pequeno efeito no controle das características.

2.2 DENSIDADE NORMAL

A distribuição normal tem grande importância nos trabalhos que envolvem simulação. A densidade normal é:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

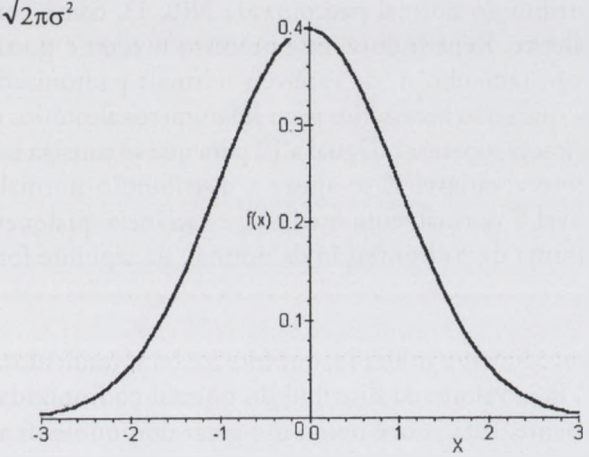


FIGURA 4. Distribuição normal com parâmetro $\mu=0$ e $\sigma^2=1$, para ilustrar a densidade normal.

Infelizmente, a função de distribuição de probabilidade da normal não pode ser explicitamente obtida. Dessa forma, processos e aproximações numéricas dessa função de distribuição são apresentados na literatura especializada (Dachs, 1988). O programa SAS Institute (1995) possui a rotina Rannor, a qual permite gerar variáveis normais padronizadas, ou seja, com $\mu=0$ e $\sigma^2=1$, N(0, 1). Outros processos podem ser implementados e serão descritos a seguir.

Com base no resultado do teorema central do limite, o qual afirma que a soma de variáveis aleatórias de qualquer distribuição converge para a distribuição normal com o aumento do número de parcelas (tamanho da amostra), foi desenvolvido o critério descrito a seguir. Se for considerada uma variável aleatória U, uniforme (0, 1), que possui média e desvio padrão:

$$\mu_u = \frac{1}{2} \quad e \quad \sigma_u = \frac{1}{\sqrt{12}}$$

Se forem geradas k variáveis uniformes U(0, 1) e em seguida for obtida a sua soma, é possível determinar a média da soma das variáveis e o seu desvio padrão. A média da soma é igual a soma das médias e a variância será igual a k vezes a variância da variável original. Definindo por X a variável resultante da soma, $X = \sum_{i=1}^{k} U_i$. Sua média e variância serão:

$$\mu_x = \frac{k}{2} \quad e \quad \sigma_x^2 = \frac{k}{12}$$

Então a variável padronizada Z, definida por:

$$Z = \frac{X - \mu_x}{\sqrt{\sigma_x^2}} = \frac{\sum_{i=1}^{k} U_i - k/2}{\sqrt{k/12}}$$

seguirá a distribuição normal padronizada N(0, 1), como conseqüência do teorema central do limite. Repetindo-se esse processo n vezes é possível gerar uma amostra aleatória, com tamanho n, de variáveis normais padronizadas N(0, 1). É conveniente enfatizar que serão necessários gerar kn números aleatórios nesse processo. É recomendável que k seja superior ou igual a 12 para que se consiga bons resultados, ou seja, que realmente a variável Z se ajuste a distribuição normal padronizada. Valores de uma variável Y normal, com média μ_y e variância qualquer σ_y^2 pode ser gerada aplicando a forma da padronização da normal, da seguinte forma:

$$Y = \sigma_y Z + \mu_y$$

Um outro procedimento utilizado, que fornece bons resultados, é apresentado a seguir. Nesse caso, dois valores da distribuição normal padronizada (Z_1 e Z_2) são gerados simultaneamente. Para isso, é necessário gerar dois números aleatórios U(0, 1), U_1 e U_2, independentes e em seguida usar as expressões:

$$Z_1 = \sqrt{-2\ln(U_1)}\ \mathrm{Cos}(2\pi U_2)$$

$$Z_2 = \sqrt{-2\ln(U_1)}\ \mathrm{Sen}(2\pi U_2)$$

Os valores de Z_1 e Z_2 seguem a distribuição normal padronizada, N(0, 1). Esses valores são despadronizados conforme procedimento descrito anteriormente.

2.3 DENSIDADES DISCRETAS

As distribuições discretas mais importantes para a genética e melhoramento são as distribuições Binomial e de Poisson. A geração de valores dessas distribuições será descrita a seguir. É conveniente salientar que os valores gerados são inteiros por se tratar de distribuições relacionadas a variáveis discretas.

a) **Binomial**

A geração de valores da distribuição binomial é o procedimento mais simples de todos os já comentados. A distribuição binomial caracteriza-se pela presença de dois eventos, sucesso ou fracasso, cuja probabilidade de sucesso é p. Pode-se exemplificar por meio de um exemplo em que se considera um gene controlando uma doença, sendo que o alelo relacionado à resistência (A) é dominante sobre o alelo da suscetibilidade (a). Numa geração de RC_2, cruzamento da F_1 com o genitor suscetível, dois fenótipos existirão: plantas suscetíveis e plantas resistentes. A probabilidade de um melhorista selecionar uma planta ao acaso e essa ser resistente é ½ (Aa). Esse valor é a probabilidade do sucesso de ocorrer o evento relacionado, ou seja, a planta RC_2 selecionada ser resistente.

Para gerar uma amostra de tamanho n, cujos elementos devem pertencer apenas a duas categorias, como no exemplo descrito anteriormente, basta dividir a escala de 0 a 1 em duas faixas correspondentes as duas categorias. A faixa, denominada de sucesso, será definida pelos valores da escala do intervalo de [0, p], e a faixa do fracasso será definida pelo intervalo de [p, 1]. O próximo passo é gerar n valores U(0, 1) e confrontar com as faixas criadas. O número de valores gerados nessa amostra que pertence a faixa de sucesso é contado e representa o valor de uma variável aleatória com distribuição binomial.

Formalmente é atribuído o valor zero a uma variável X, no passo inicial ($x_0=0$). Em seguida, é gerado um número aleatório (U_1) e se $U_1 \leq p$, então o valor de X é acrescido de 1, ou seja, $x_1=x_0+1=1$. Repete-se o processo até n, e o valor x_n representa uma variável aleatória. Define-se, então:

$$\begin{cases} x_0 = 0 \\ \text{e} \\ x_i = x_{i-1} + 1 \ \text{ se } \ U_i \leq p, \ \ i = 1, 2, \cdots, n \end{cases}$$

em que, x_i é o valor da variável aleatória binomial no estágio i.

A distribuição multinomial pode ser facilmente gerada, com a divisão da escala [0, 1] em diversas faixas, correspondentes ao número de classes dessa distribuição, cujos comprimentos dos intervalos são iguais as probabilidades de cada classe.

b) Poisson

A densidade da distribuição de Poisson é:

$$f(x) = e^{-\lambda} \frac{\lambda}{x!} \text{ com } \lambda > o$$

em que, e é o número neperiano (2,71828...), λ é o único parâmetro (média) da distribuição Poisson.

Para gerar valores com essa densidade, determina-se o valor de λ que tenha interesse prático e em seguida, gera-se números aleatórios U(0, 1). Os números aleatórios gerados num passo i qualquer (U_i) são transformados da seguinte forma:

$$t_i = -\ln(U_i)$$

Em seguida, é necessário verificar quando a relação apresentada a seguir se torna verdadeira:

$$\sum_{i=1}^{x} t_i \leq \lambda < \sum_{i=1}^{x+1} t_i \quad (x=0, 1, 2,...)$$

Se a condição não é satisfeita gera-se um novo número aleatório, e atualiza-se os somatórios. Quando a condição é satisfeita, o valor de x que a satisfaz, possui densidade de Poisson com parâmetro λ.

3. ILUSTRAÇÃO DA APLICAÇÃO DE SIMULAÇÃO EM GENÉTICA

3.1 APLICAÇÃO AO ESTUDO DE HERANÇA POR MEIO DE COMPONENTES DE MÉDIA

A herança de caracteres quantitativos tem fascinado os geneticistas quantitativos por várias décadas. Várias técnicas biométricas têm sido propostas ao longo desse período para o estudo desses caracteres. O modelo de Mather & Jinks (1984) para estudar os componentes de médias, em delineamentos genéticos envolvendo os genitores e as gerações F_1 e F_2, bem como os retrocruzamentos, têm sido empregados pelos melhoristas de plantas no estudo de herança e para a escolha de pais (Abreu, 1997). Com a finalidade de ilustrar a simulação foi adotado um sistema genético com os pais (P_1 e P_2) e com as gerações F_1 e F_2. Foi considerado um gene A controlando a característica quantitativa, com interação alélica de dominância completa. Foram simulados efeitos ambientais, os quais foram considerados como tendo distribuição (densidade) normal com média zero e variância determinada de tal forma que a herdabilidade (h^2) no sentido amplo, tomando-se por base a geração F_2, fosse de 80%. Foram gerados 10 indivíduos das populações P_1, P_2 e F_1 e 20 da F_2. Considerando P_1 com alelos favoráveis e contrastante a P_2, os possíveis genótipos das 4 populações, bem como os valores genotípicos, são:

P_1	X	P_2
AA		aa
(m + a)		(m-a)
	↓	
	F_1	
	Aa	
	(m+d)	
	↓⊗	
	F_2	
¼ AA	½ Aa	¼ aa
(m+a)	(m+d)	(m-a)

Considerando-se o valor de m=100, a=4 e d=4 (dominância completa), então, a variância genética total ($\sigma^2_{GF_2}$) em F_2, é:

$$\sigma^2_{GF_2} = \frac{1}{2}a^2 + \frac{1}{4}d^2 = 8 + 4 = 12$$

Denominando a variância dos efeitos ambientais por σ^2_e e considerando uma herdabilidade (h^2) no sentido amplo na F_2, estipulou-se o valor paramétrico por meio da definição apresentada a seguir:

$$h^2 = \frac{\sigma^2_{GF_2}}{\sigma^2_{F_2}} = \frac{\sigma^2_{GF_2}}{\sigma^2_e + \sigma^2_{GF_2}}$$

em que, $\sigma^2_{F_2}$ é a variância fenotípica paramétrica em F_2.

Dessa expressão pode-se explicitar σ^2_e, uma vez que $\sigma^2_{GF_2}$ e h^2 são conhecidas (por definição) nesse estágio. Assim:

$$\sigma^2_e = \frac{1-h^2}{h^2} \times \sigma^2_{GF_2}$$

Portanto, para o exemplo, a variância residual paramétrica será:

$$\sigma^2_e = \frac{1-0,8}{0,8} \times 12 = 3$$

Para gerar os valores fenotípicos dos pais e da F_1 para 10 diferentes indivíduos, é necessário lembrar que o valor fenotípico (F) é dado por:

$$F = G + \varepsilon$$

em que, G é o valor genotípico (m+a, m+d ou m-a) e ε é o efeito ambiental.

Assumindo que e tem distribuição normal, com média zero e variância σ^2_e, como já comentado anteriormente, foi possível gerar os valores fenotípicos de P_1, P_2

e F_1. Para isso utilizou-se a função Rannor do SAS Institute (1995), a qual gera valores da distribuição normal padronizada (Z). Assim, esses valores devem ser transformados para que possuam ainda média zero, mas variância igual a σ_e^2. Para isso basta multiplicar os valores gerados pelo desvio padrão ambiental (σ_e). Os resultados desse procedimento estão apresentados na Tabela 1, para herdabilidade de 0,80.

Os efeitos ambientais apresentados na Tabela 1, são obtidos multiplicando-se o desvio padrão residual ($\sigma_e = \sqrt{3} = 1,7321$) pelo escore da distribuição normal padronizada, obtidos usando o comando Rannor(semente) do SAS Institute (1995). Assim, para a planta 1 do P_1, tem-se que o efeito ambiental é de $\sqrt{3}$ x(-0,924) = -1,6. Da mesma forma para os outros indivíduos dessa e das demais populações foram gerados os efeitos ambientais associados. Verifica-se que as variâncias fenotípicas observadas entre os indivíduos, é de natureza ambiental, uma vez que os genótipos das plantas P_1, ou das plantas P_2, ou ainda das F_1, são idênticos, produzindo valores genotípicos idênticos. Por se tratar de uma amostra aleatória de 10 indivíduos de populações com variância 3, os valores estimados nos três casos oscilam em torno do valor paramétrico (3). Observa-se que as variâncias para P_1, P_2 e F_1 foram 3,632, 1,361 e 6,020, respectivamente. Se for tomado a média dessas estimativas têm-se 3,671, que é uma estimativa melhor, ou ainda, tomando-se a média geométrica, como é sugerido muitas vezes, tem-se $\sqrt[3]{3,632 \times 1,361 \times 6,020} = 3,099$. Essa última estimativa, nesse exemplo, mostrou ser uma excelente estimativa da variância paramétrica (3). É natural que a nesse momento sejam levantadas dúvidas de qual dos dois estimadores seria o melhor, ou se essa tendência observada nesse exemplo será verificada em outros experimentos dessa natureza. A resposta a esses questionamentos pode ser dada por meio de

TABELA 1. Valores fenotípicos (F) das populações P_1, P_2 e F_1, obtidos a partir dos valores genotípicos (G) acrescidos do valor ambiental e, gerados por um valor (Z_i) da distribuição normal padronizada N(0, 1) multiplicado pelo desvio padrão ambiental ($\sigma_e = \sqrt{3} = 1,7321$), de tal forma que a h^2 na F_2, no sentido amplo, seja de 0,80.

	P_1		P_2		P_3	
Ind.	Fen.	$=G_i + \sigma_e xZ_i$	Fen.	$=G_i + \sigma_e xZ_i$	Fen.	$=G_i + \sigma_e xZ_i$
1	102,4	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,92)	94,2	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-1,02)	100,5	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-2,00)
2	101,2	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-1,63)	95,0	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-0,59)	102,3	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,97)
3	106,2	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+1,29)	94,8	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-0,67)	108,0	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+2,31)
4	106,6	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+1,50)	94,2	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-1,02)	107,5	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+2,00)
5	102,6	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,78)	96,5	$= -4 + \sqrt{3}$ x (+0,29)	105,4	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,79)
6	104,8	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,47)	96,6	$= -4 + \sqrt{3}$ x (+0,33)	104,9	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,51)
7	102,6	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,83)	93,7	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-1,31)	104,2	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,13)
8	101,6	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-1,41)	96,9	$= -4 + \sqrt{3}$ x (+0,51)	105,3	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,75)
9	105,1	$= 4 + \sqrt{3}$ x (+0,65)	96,3	$= -4 + \sqrt{3}$ x (+0,16)	101,6	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-1,37)
10	104,0	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,20)	95,9	$= -4 + \sqrt{3}$ x (-0,05)	102,9	$= 4 + \sqrt{3}$ x (-0,62)
Média	103,7		95,4		104,3	
Var. Fenot.	3,632		1,361		6,020	

simulação repetindo inúmeras vezes o processo descrito e comparando as propriedades dos dois estimadores da variância residual. Essas propriedades seriam a existência ou não de viés, a eficiência dos estimadores, ou seja, saber qual é o estimador de menor variância dentre alguns disponíveis, e a consistência dos mesmos, ou seja, se a sua variância converge para zero se o tamanho amostral aumenta. É oportuno chamar a atenção que numa situação real, o valor paramétrico é desconhecido, e que na simulação o oposto se dá, o que é um fator positivo a seu favor, quando da comparação de métodos ou da avaliação das propriedades dos estimadores.

O próximo passo é gerar uma amostra da população F_2. Como a autofecundação da população F_1, no caso de um gene pela primeira lei de Mendel, gera genótipos de forma aleatória, nas diferentes classes genotípicas F_2 na proporção de ¼ AA, ½ Aa e ¼ aa. É fácil ver que a distribuição dos indivíduos nas respectivas classes é a multinomial. Assim, num primeiro estágio, será gerado uma amostra de 20 indivíduos de acordo com esta distribuição. O processo consiste em gerar uma escala arbitrária de 0 a 1, subdividida em faixas. A primeira faixa, será dada pelos limites 0 e 0,25, que corresponde a freqüência de ¼ da classe genotípica AA de F_2. A segunda classe vai de 0,25 a 0,75 (¼ de AA + ½ de Aa) e a terceira e última classe vai de 0,75 a 1. Essa escala total corresponde a escala da distribuição uniforme (0, 1). Assim um número aleatório uniforme (U) será gerado em seguida. Se o valor de U estiver no intervalo [0; 0,25], o indivíduo em questão pertencerá a classe genotípica AA. Se este valor estiver em (0,25; 0,75] o indivíduo será da classe Aa, e se estiver em (0,75; 1] o indivíduo terá o genótipo aa. Procedendo-se dessa forma 20 vezes, será simulado a constituição genotípica da amostra da população F_2, a qual procura se equiparar com o modelo real que obedece a primeira lei de Mendel. Em média, espera-se ¼ de indivíduos AA, ½ de Aa e ¼ de aa.

A Tabela 2 apresenta os 20 números aleatórios gerados, os genótipos de cada indivíduo, determinada pelo modelo relatado anteriormente, os valores genotípicos e fenotípicos, gerados conforme descrito para as populações P_1, P_2 e F_1. Estimou-se a média e a variância fenotípica da população F_2 ($\hat{\sigma}^2_{F_2}$).

Usando a estimativa da variância fenotípica da F_2, que foi de $\hat{\sigma}^2_{F_2}$ =14,602, e a estimativa da variância residual (3,099), dada pela média geométrica das variâncias das populações não segregantes, P_1, P_2 e F_1, estimou-se a variância genética total da F_2. Este valor foi $\hat{\sigma}^2_G$ =11,503, sendo que o valor paramétrico é igual a 12. A herdabilidade no sentido amplo, tomando-se por base a população F_2, estimada foi $\hat{h}^2$ =0,788, sendo a paramétrica igual a 0,80. É conveniente salientar que as freqüências esperadas dos genótipos AA, Aa e aa são 5, 10 e 5, respectivamente, e a simulação gerou freqüências de 6, 10 e 4, respectivamente, o que corresponde a um χ^2_c =0,42, o qual é não significativo. Variações entre as freqüências observadas e esperadas, com relação as classes genotípicas, são quase certas de ocorrerem. Isso se deve ao fato de se tratar de um fenômeno aleatório, que envolve a primeira lei de Mendel (como no exemplo em questão), e até mesmo a segunda lei, nos casos em que existem dois ou mais genes independentes envolvidos no controle da característica. Para genes ligados a distribuição das frequências das diferentes classes genotípicas é mais complexa.

TABELA 2. Números aleatórios uniformes (0, 1) gerados pelo SAS Institute (1995), comando Ranuni, genótipos associados de acordo com a escala multinomial estipulada, valores genotípicas (m + a, m + d e m - a) e valores fenotípicos (F = G + ε), com erros normais de média zero e variância três.

Indivíduo	Número aleatório	Genótipo	Valor Genotípico (G) (m+a, m+d, m-a)	Valor Fenotípico (F = G + e)
1	0,88	aa	96	95,6
2	0,45	Aa	104	101,6
3	0,50	Aa	104	104,2
4	0,20	AA	104	103,1
5	0,20	AA	104	102,3
6	0,28	Aa	104	104,3
7	0,34	Aa	104	103,1
8	0,45	Aa	104	104,4
9	0,83	aa	96	97,0
10	0,11	AA	104	101,9
11	0,77	aa	96	92,5
12	0,54	Aa	104	107,0
13	0,07	AA	104	104,9
14	0,43	Aa	104	102,1
15	0,19	AA	104	103,7
16	0,53	Aa	104	102,9
17	0,34	Aa	104	104,3
18	0,39	Aa	104	103,7
19	0,83	aa	96	94,7
20	0,01	AA	104	104,1
			Média	101,870
			Variância fenotípica	14,602

O próximo passo é considerar o modelo de Mather & Jinks (1984) e utilizar o método dos quadrados mínimos para estimar os efeitos de (m, a e d). Assim, têm-se:

$$E(\bar{P}_1) = m + a$$

$$E(\bar{P}_2) = m - a$$

$$E(\bar{F}_1) = m + d$$

$$E(\bar{F}_2) = m + \tfrac{1}{2} d$$

Essas equações podem ser expressas na forma de matriz por:

$$Y = X\theta + \varepsilon$$

$$\begin{bmatrix} \bar{P}_1 \\ \bar{P}_2 \\ \bar{F}_1 \\ \bar{F}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & \frac{1}{2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} m \\ a \\ d \end{bmatrix} + \varepsilon$$

Assim pode-se obter as equações normais por:

$$X'X\hat{\theta} = X'Y$$

$$\begin{bmatrix} 4 & 0 & 3/2 \\ 0 & 2 & 0 \\ 3/2 & 0 & 5/4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{m} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{F}_1 + \bar{F}_2 \\ \bar{P}_1 - \bar{P}_2 \\ \bar{F}_1 + \frac{1}{2}\bar{F}_2 \end{bmatrix}$$

Cujas soluções (estimadores) são:

$$\hat{m} = \frac{5}{11}(\bar{P}_1 + \bar{P}_2) + \frac{1}{11}(2\bar{F}_2 - \bar{F}_1)$$

$$\hat{a} = \frac{1}{2}(\bar{P}_1 - \bar{P}_2)$$

$$\hat{d} = \frac{2}{11}(\bar{F}_2 + 5\bar{F}_1) - \frac{6}{11}(\bar{P}_1 + \bar{P}_2)$$

Para o exemplo simulado, as estimativas são:

$$\hat{m} = \frac{5}{11}(103{,}71 + 95{,}41) + \frac{1}{11}(2 \times 101{,}87 - 104{,}26) = 99{,}55$$

$$\hat{a} = \frac{1}{2}(103{,}71 - 95{,}41) = 4{,}15$$

$$\hat{d} = \frac{2}{11}(101{,}87 + 5 \times 104{,}26) - \frac{6}{11}(103{,}71 + 95{,}41) = 4{,}69$$

Estimativas da variância desses estimadores podem ser obtidas, considerando que existe heterogeneidade das variâncias entre as populações P_1, P_2 e F_1 com a F_2, uma vez que nessa última existe um componente de natureza genética, além do componente de natureza ambiental. Esses estimadores são:

$$\hat{V}(\hat{m}) = \frac{25}{121}[V(\bar{P}_1) + V(\bar{P}_2)] + \frac{1}{121}[4V(\bar{F}_2) + V(\bar{F}_1)]$$

As variâncias $V(\bar{P}_1)$, $V(\bar{P}_2)$, $V(\bar{F}_1)$ e $V(\bar{F}_2)$, são aquelas associadas às médias das correspondentes gerações. É conhecido na estatísticas que variâncias associadas a médias são iguais a variância amostral, no caso, entre plantas dentro de populações, divididas pelo tamanho da amostra, no caso, número de plantas de cada geração. Assim as estimativas de $V(\bar{P}_1)$, $V(\bar{P}_2)$ e $V(\bar{F}_1)$ são dadas por:

$$\hat{V}(\bar{P}_1) = \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_1}$$

$$\hat{V}(\bar{P}_2) = \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_2}$$

$$\hat{V}(\bar{F}_1) = \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_3}$$

em que n_1, n_2 e n_3 são os tamanhos amostrais das 3 populações e $\hat{\sigma}_e^2$ é a estimativa da variância residual. A variância da média de F_2 por sua vez é:

$$\hat{V}(\bar{F}_2) = \frac{\hat{\sigma}_{F_2}^2}{n_4}$$

em que n_4 é o tamanho amostral da F_2.

Assim, a estimativa da variância de $\hat{m}$ é:

$$\hat{V}(\hat{m}) = \frac{25}{121}\left[\frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_2}\right] + \frac{1}{121}\left[4\frac{\hat{\sigma}_{F_2}^2}{n_4} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_3}\right]$$

$$= \frac{25}{121}\left[\frac{3{,}099}{10} + \frac{3{,}099}{10}\right] + \frac{1}{121}\left[4 \times \frac{14{,}602}{20} + \frac{3{,}099}{10}\right]$$

$$= 0{,}1548$$

Para os demais estimadores os estimadores das variâncias são dados por:

$$\hat{V}(\hat{a}) = \frac{1}{4}\left[\frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_2}\right]$$

$$\hat{V}(\hat{d}) = \frac{25}{121}\left[\frac{\hat{\sigma}_{F_2}^2}{n_4} + 25 \times \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_3}\right] + \frac{36}{121}\left[\frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{n_2}\right]$$

Cujas estimativas são:

$\hat{V}(\hat{a}) = 0{,}1550$ e $\hat{V}(\hat{d}) = 0{,}4647$

Outros processos de estimação existem na literatura (Rowe & Alexander, 1980; Mather & Jinks, 1984). Alguns deles envolvendo método dos quadrados mínimos ordinários ponderados. Saber qual procedimento é o mais eficiente, muitas vezes, é difícil. Trabalhos de simulação podem ser planejados e executados com a finalidade de compará-los entre si. Nesse caso, procedimentos semelhantes ao relatado anteriormente para a geração de várias gerações e populações seriam executados milhares de vezes usando recursos computacionais para isso. Após cada repetição do processo os vários métodos que serão comparados são empregados para estimar os componentes de médias. Diversos tamanhos das populações, grau médios de dominância, diferentes herdabilidades e números de genes, entre outros fatores de interesse seriam considerados. Os resultados obtidos pelos diversos métodos seriam comparados por meio das propriedades estatísticas de seus estimadores, quais sejam, eficiência, não tendenciosidade, entre outras. O melhor método seria aquele com propriedades ótimas de seus estimadores.

Por meio desse exemplo, gerando diversas populações com número variados de indivíduos, considerando apenas um gene, com herdabilidade de 0,80, procurou-se demonstrar como a simulação pode ser empregada para imitar o sistema real. As estimativas dos parâmetros genotípicos e fenotípicos propiciaram uma forma de averiguar que o sistema simulado apresentava valores compatíveis com os modelos e delineamentos teóricos que nortearam a construção do sistema simulado. A finalidade maior, no entanto, foi apresentar ao leitor os procedimentos e etapas da realização de um processo de simulação, bem como apresentar as formas de conexão entre as gerações de números e variáveis aleatórias com a simulação. Os processos que envolvem variáveis aleatórias em simulação são conhecidos como método de Monte Carlo.

3.2 SIMULAÇÃO PARA AVALIAR QUALIDADE DE ESTIMADORES

Como já foi comentado, diversos estimadores existem e são propostos a cada dia pelos melhoristas para estimar parâmetros genotípicos e fenotípicos. Um parâmetro de muito interesse para o melhoristas, é o número de genes que controla algumas características, tais como reação a doença, cujo fenótipo é medido de forma quantitativa. Para estimar o número de genes, os melhoristas dispõem de vários estimadores que têm a necessidade de que avaliações das populações genitoras (P_1 e P_2), das filiais (F_1 e F_2) e dos retrocruzamentos (RC_1 e RC_2) sejam feitas. Dentre eles, destacam-se os estimadores de Burton (1951), modificado por Aguiar (1999) e o de Mather & Jinks (1984). O estimador ($\hat{K}_1$) de Burton (1951) modificado por Aguiar (1999) é:

$$\hat{K}_1 = \frac{\frac{1}{4}\left(3/4 - \mu + \mu^2\right) \times D^2}{\hat{\sigma}^2_{F_2} - \hat{\sigma}^2_e}$$

em que,

$$\mu = \frac{\left(4\overline{F}_2 - 3\overline{P}_1 - \overline{P}_2\right)/2}{\overline{P}_2 - \overline{P}_1}$$

$$D = \overline{P}_2 - \overline{P}_1$$

O estimador ($\hat{K}_2$) de Mather & Jinks (1984) é:

$$\hat{K}_2 = \frac{(\overline{P}_1 - \overline{P}_2)^2}{8\hat{\sigma}^2_A}$$

em que $\hat{\sigma}^2_A$ é o estimador da variância aditiva.

Para verificar qual é o estimador mais eficiente, foi realizada uma avaliação por meio de simulação, uma vez que não são apresentadas na literatura informações sobre medidas de precisão desses estimadores. Para isso considerou-se uma situação com K=3 genes independentes, de mesmo valor genotípico e com dominância completa (a_i=4, d_i=4 e m=100, i=1, 2, ..., 3). Considerou-se uma situação com h^2=0,80, e as populações P_1, P_2, F_1, F_2, RC_1 e RC_2. Os tamanhos amostrais foram de 20 plantas para as populações P_1, P_2 e F_1 e de 80 plantas para RC_1 e RC_2. A fim de ilustrar o efeito do tamanho da amostra na estimativa do número de genes,

considerou-se três tamanhos de amostra para a geração F_2, de 80, 100 e 200 plantas. Em todos os casos foram computadas a média e a variância da geração. Com base nos resultados obtidos em cada repetição, foram estimados os componentes de variância (aditiva e ambiental) pelo método dos quadrados mínimos ordinários. Esse não é, obviamente, o melhor método de estimação de componentes de variância, no entanto, será usado assim mesmo, uma vez que os estimadores de ambos os genes usam os mesmos resultados, o que não afetará o processo de comparação.

Para comparar os resultados foram realizadas 1.000 simulações, estimado-se o número de genes utilizando ambos estimadores. Foi calculado o viés, que é a média de todas as 1.000 estimativas obtidas subtraída do valor paramétrico, e também estimado o erro padrão para se avaliar a eficiência dos estimadores.

Os estimadores da variância aditiva (σ_A^2) e da variância ambiental (σ_e^2) são dados por:

$$\hat{\sigma}_A^2 = 2\hat{\sigma}_{F_2}^2 - \hat{\sigma}_{RC\bullet}^2$$

$$\hat{\sigma}_e^2 = \frac{1}{3}\left(\hat{\sigma}_{P_1}^2 + \hat{\sigma}_{P_2}^2 + \hat{\sigma}_{F_1}^2\right)$$

em que, $\hat{\sigma}_{RC\bullet}^2 = \hat{\sigma}_{RC_1}^2 + \hat{\sigma}_{RC_2}^2$ é a soma das estimativas das variâncias fenotípicas entre plantas do RC_1 e RC_2, respectivamente; $\hat{\sigma}_{P_1}^2$, $\hat{\sigma}_{P_2}^2$ e $\hat{\sigma}_{F_1}^2$ representam as variâncias fenotípicas entre plantas das populações P_1, P_2 e F_1, respectivamente.

Estipuladas as condições e os estimadores, foram geradas as populações mencionadas anteriormente, por meio de simulação, a qual foi realizada de forma semelhante a relatada no item 3.1. É conveniente salientar que para gerar o genótipo de um indivíduo de uma população segregante, para cada gene é efetuada uma escala conforme relatado anteriormente e gerado um número aleatório. O próximo gene depende dessa escala e de um novo número aleatório gerado. Assim, o processo é repetido até que todos os genes sejam considerados. O genótipo gerado dessa forma, obedece necessariamente a primeira e a segunda lei de Mendel. Os estimadores são aplicados em cada repetição da simulação, sendo que ao término do processo foram obtidas 1.000 estimativas de cada estimador. Em seguida é calculado a média, desvio padrão, que se constitui numa estimativa do erro padrão, o viés e os valores mínimos e máximos obtidos. Os resultados estão apresentados na Tabela 3, considerando diferentes números de plantas da população F_2. Pode-se verificar que o estimador $\hat{K}_1$ tem melhores propriedades estatísticas do que o estimador $\hat{K}_2$. Os valores médios das 1.000 estimativas aproximaram consideravelmente do valor paramétrico (K=3) para o estimador $\hat{K}_1$, mesmo nas situações de menor número de indivíduos na F_2 (n_{F2}=80). Os erros padrão estimados foram de pequena magnitude (18 a 27%) quando comparados com o valor médio, para o estimador de $\hat{K}_1$, o que não ocorreu para o $\hat{K}_2$. O estimador de Mather & Jinks (1984), $\hat{K}_2$, por sua vez, apresentou viés positivo variando de 1,33 a 2,34 genes, bem como apresentou grande variação entre suas estimativas, o que pode ser observado pelos elevados erros padrão e pela estimativas de mínimo e máximo valores entre os 1.000 simulados.

É conveniente salientar que os estimadores apresentaram tendência de reduzir o viés, o erro padrão e amplitude (máximo - mínimo) das estimativas obtidas, com o

TABELA 3. Estimativas médias do número de genes, do erro padrão, viés, mínimo e máximo em 1.000 simulações, utilizando os estimadores de Burton (1951) modificado por Aguiar (1999), $\hat{K}_1$ e o de Mather & Jinks (1984), $\hat{K}_2$, considerando os valores paramétricos, de cada um dos k=3 genes, a_i=4, d_i=4, m=100, com i=1, 2, 3, e herdabilidade no sentido amplo tendo como referência a população F_2 de 0,80.

	Estimador de Burton (1951) - $\hat{K}_1$					Estimador de Mather & Jinks (1984) -$\hat{K}_2$				
n_{F2}	$\hat{K}_1$	$S(\hat{K}_1)$	Viés	Min.	Max	$\hat{K}_2$	$S(\hat{K}_2)$	Viés	Min.	Max
80	3,16	0,86	0,16	1,6	8,4	5,34	36,74	2,34	-347	615
100	3,15	0,74	0,15	1,6	7,5	5,02	36,23	2,02	-587	699
200	3,05	0,54	0,05	1,4	5,0	4,33	12,34	1,33	-44	344

aumento do tamanho da população F_2 de 80 para 200 indivíduos. Isso reflete a propriedade denominada de consistência simples dos estimadores. Outras propriedades, tais como verificar a pressuposição de normalidade, ou de pelo menos, normalidade assintótica poderiam ser checadas. Pressuposições como essas, se aceitas, garantiriam a realização de testes de hipóteses estatísticas de interesse para o melhoramento.

Mather & Jinks (1984) ressaltam que algumas condições são necessárias para que os estimadores do número de genes sejam eficientes e possam ser aplicados. Essas restrições são bastantes restritivas, no entanto, a mensuração analítica do seu efeito nas estimativas tem grande dificuldade de ser realizada. A simulação novamente pode ser empregada para avaliar tais efeitos e alertar os melhoristas quanto aos aspectos restritivos de se usar alguns desses estimadores. As condições de uso podem ser enumeradas por: a) genótipos dos genitores totalmente contrastantes, sendo que um dos genitores possuem constituição genotípica contendo todos os alelos favoráveis e o outro com os desfavoráveis; b) efeitos alélicos aditivos iguais com relação a todos os genes segregantes na geração F_2; c) ausência de epistasia; e d) ausência de ligação.

Algumas dessas condições como a (a) e a (b) foram checadas para avaliar os seus efeitos, usando o programa de simulação utilizado e descrito anteriormente. Numa primeira etapa buscou avaliar-se o efeito de diferentes valores genotípicos com relação a todo os genes controladores da característica. A Tabela 4 apresenta as estimativas médias do número de genes, do erro padrão, viés, mínimo e máximo em 1.000 simulações, utilizando os estimadores de Burton (1951) modificado por Aguiar (1999), $\hat{K}_1$, e o de Mather & Jinks (1984), $\hat{K}_2$, considerando diferentes valores paramétricos para cada um dos k=3 genes, ou seja, $0 \leq a_i \leq 4$ ($a \neq a_{i'}$, $i \neq i'$), d_i=a_i e m=100, sendo que ainda se considerou uma situação em que todos os alelos favoráveis estavam concentrados no P_1. Verificou-se que todos os estimadores apresentaram subestimativas do número de genes em cada uma dos tamanhos amostrais da geração F_2 considerados. Novamente, verificou-se que o estimador $\hat{K}_2$ foi o pior, pois apresentou um erro padrão elevado e demais estatísticas descritivas reafirmando sua péssima qualidade. Os valores genotípicos dos locos foram gerados como sendo pertencentes a distribuição uniforme U(0, 4). Dessa forma espera-se que em cada situação simulada o viés possa apresentar uma magnitude maior ou menor do seu efeito. A investigação desse efeito poderia ser feita tentando realizar uma série de simulações de 1.000 repetições cada e correlacionar o viés com a variabilidade

(variância) dos efeitos genotípicos entre os diferentes genes segregantes. Mather & Jinks (1984) destacam que quanto maior for essa variabilidade, maior será o viés das estimativas em magnitude. Se esse processo fosse realizado e repetido algumas centenas ou milhares de vezes poderia se estabelecer uma relação, entre essa variação e o viés de tal sorte que o melhorista poderia fazer conjecturas a respeito do efeito diferenciado dos valores genotípicos.

Numa segunda etapa buscou-se verificar o efeito diferenciado dos valores genotípicos dos diferentes genes e ainda considerando que um dos pais não continha todos os alelos favoráveis concentrados em sua constituição genotípica. A Tabela 5 apresenta essa situação, e o que se pode verificar é que as estimativas do número de genes é grandemente afetada por esses fatores. Como o efeito isolado das diferenças dos valores genotípicos foi avaliado anteriormente, pode-se inferir que, apesar da complementaridade existente entre os genótipos dos pais, a não concentração dos alelos favoráveis em um deles, causa grandes viés no sentido de subestimar o número de genes, tanto para o estimador $\hat{K}_1$, considerado melhor em todas as outras situações, quanto para o estimador $\hat{K}_2$. Esse resultado está de acordo com o esperado por Mather & Jinks (1984), e pode ser considerado uma séria restrição para os estudos onde se pretende estimar o número de genes, uma vez que essa situação no melhoramento, do ponto de vista probabilístico, é bastante freqüente. Novamente, apesar das pobres estimativas de ambos os estimadores, verificou através das diversas estatísticas associadas (Tabela 5), que o estimador de Mather & Jinks (1984) foi o que apresentou as piores propriedades.

TABELA 4. Estimativas médias do número de genes, do erro padrão, viés, mínimo e máximo em 1.000 simulações, utilizando os estimadores de Burton (1951) modificado por Aguiar (1999), $\hat{K}_1$ e o de Mather & Jinks (1984), $\hat{K}_2$, considerando diferentes valores paramétricos de cada um dos k=3 genes $0 \leq a_i \leq 4$ ($a_i \neq a_{i'}$ i ≠ i') (alelos favoráveis concentrados no P_1), $d_i = a_i$ e m=100, com i=1, 2, 3, e herdabilidade no sentido amplo tendo como referência a população F_2 de 0,80.

	Estimador de Burton (1951) - $\hat{K}_1$					Estimador de Mather & Jinks (1984) - $\hat{K}_2$				
n_{F2}	$\hat{K}_1$	$S(\hat{K}_1)$	Viés	Min.	Max	$\hat{K}_2$	$S(\hat{K}_2)$	Viés	Min.	Max
80	2,71	0,78	-0,29	1,2	7,5	2,62	111,26	-0,38	-2798	1557
100	2,63	2,89	-0,37	1,2	2,9	2,69	113,01	-0,31	-315	186
200	2,61	3,94	-0,39	1,4	4,6	35,1	979,29	32,1	-92	30751

TABELA 5. Estimativas médias do número de genes, do erro padrão, viés, mínimo e máximo em 1.000 simulações, utilizando os estimadores de Burton (1951) modificado por Aguiar (1999), $\hat{K}_1$, e o de Mather & Jinks (1984), $\hat{K}_2$, considerando os valores paramétricos, de cada um dos k=3 genes diferentes $0 \leq a_i \leq 4$ ($a_i \neq a_{i'}$ i ≠ i') (alelos favoráveis não concentrados no P_1), $d_i = a_i$ e m=100, com i=1, 2, 3, e herdabilidade no sentido amplo tendo como referência a população F_2 de 0,80.

	Estimador de Burton (1951) - $\hat{K}_1$					Estimador de Mather & Jinks (1984) -$\hat{K}_2$				
n_{F2}	$\hat{K}_1$	$S(\hat{K}_1)$	Viés	Min.	Max	$\hat{K}_2$	$S(\hat{K}_2)$	Viés	Min.	Max
80	0,15	0,09	-2,85	0,02	0,75	0,19	1,00	-2,81	-11,0	11,5
100	0,15	0,20	-2,85	0,02	0,71	0,22	1,53	-2,78	-13,6	25,3
200	0,14	0,26	-2,86	0,02	0,51	0,04	3,37	-2,96	12,5	-68,5

Trabalhos de simulação para avaliar a fórmula de Wright como estimadora do número de genes afetando uma característica quantitativa foram realizados por Zeng *et al.* (1990). Avaliou-se a influência da diferença dos efeitos alélicos, da ligação, dos tamanhos populacionais nas estimativas e na variância das estimativas do número de genes. As conclusões obtidas levam a afirmação de que as diferenças dos efeitos alélicos e que a ligação conduzem a subestimativas do número de genes e que em geral as estimativas estavam associadas a grandes variâncias amostrais. Modificações do método, incluindo a inclusão de gerações F_3 ou posteriores e repetições dos experimentos podem melhorar as estimativas dos números de genes. O estimador de Wright, é semelhante ao de Mather & Jinks (1984), diferindo apenas no denominador da sua expressão, onde a variância genética da F_2 é usada integralmente. Isso pode conduzir, na presença de dominância, à subestimativas do número de genes, situação desconsiderada pelos autores na avaliação do estimador.

É conveniente salientar que o uso de simulação nesse caso propiciou comparar propriedades dos estimadores, com alguns resultados analíticos apresentados, bem como verificar pressupostos que dificilmente seriam elucidados pelos procedimentos analíticos. O trabalho apresentado por Thoday & Thompson Jr. (1976) simulando populações com herdabilidades de 100%, demonstrou segundo os autores que uma distribuição fenotípica normal, não necessariamente representa a segregação de um grande número de genes. Mesmo com 2 ou 3 locos segregantes a distribuição pode não ser distinguida da normal, com tamanhos amostrais utilizados nas situações experimentais práticas.

4. USO DE SIMULAÇÃO NO MELHORAMENTO

Como já foi apresentado nos exemplos simples da seção anterior, a simulação pode ser facilmente implementada para solucionar problemas de elevadas complexidade, os quais envolvem grande número de variáveis ou fatores. Para ilustrar alguns desses casos será discutido e apresentado a seguir alguns exemplos do uso da simulação aplicados ao melhoramento. Os primeiros trabalhos de simulação usando recursos computacionais, relacionados a genética e melhoramento de plantas, são apresentados por Fraser (1957a,b). Esses trabalhos avaliaram o efeito da ligação nas taxas de ganho com a seleção massal e nos avanços dos ganhos genéticos.

Comparação de métodos de melhoramento tem sido uma preocupação para os melhoristas de plantas autógamas e de alógamas. A comparação desses métodos é difícil de ser realizada de forma experimental, nos programas de melhoramento, uma vez que os custos são elevados, além de exigir o manuseio de grandes quantidades de genótipos ao longo de vários anos. Assim os trabalhos de simulação podem ser realizados visando identificar os métodos mais eficientes. Nesse sentido, Casali & Tigchelaar (1975) compararam por simulação cinco métodos de melhoramento aplicados a plantas autógamas: bulk (população), genealógico e o descendente de uma única semente (SSD) e combinações deles. Para isso consideraram 20 locos de dois alelos, com efeitos iguais, sem dominância, ligação ou epistasia. Consideraram ainda, diferentes herdabilidades que variaram de 0,10 a 0,75. O método genealógico foi o mais efetivo com alta (0,75) e moderada (0,50) herdabilidades. Com baixa (0,25) e muito baixa (0,10) herdabilidades o SSD derivou na F_6 a melhor linhagem.

A seleção assistida por marcadores não tem sido utilizada rotineiramente no melhoramento de plantas, pelo fato de sua eficiência ser desconhecida e do seu elevado custo. Para elucidar esses aspectos, da eficiência e, portanto, da viabilidade econômica do uso da seleção assistida por marcadores moleculares, vários autores (Lande & Thompson, 1990; Zangh & Smith, 1992, 1993; Edwards & Page, 1994; Ferreira, 1995; Bearzoti, 1997) realizaram estudos utilizando simulação computacional. Todos os casos mostraram que com o decréscimo do desequilíbrio de ligação, a partir do terceiro ciclo seletivo, os ganhos com a seleção assistida por marcadores não era viável a sua exploração.

Zangh & Smith (1992) simularam populações obtidas a partir do cruzamento de duas linhagens endogâmicas, do qual sucessivas gerações foram avançadas pela troca de gametas ao acaso. Comparam três métodos entre si: seleção fenotípica baseada no valor reprodutivo usando a predição BLUP (melhor predição linear não-tendenciosa); uso da informação molecular para estimar o valor reprodutivo; e uma combinação dos dois métodos anteriores combinando-os em um índice semelhante ao proposto por Lande & Thompson (1990). Os resultados de simulação mostraram que essa última metodologia foi a mais eficaz, e que o uso da informação molecular isolada foi a menos eficiente.

É conveniente salientar que as simulações realizadas nesses casos, modelaram os sistemas genéticos de formas mais simplificadas que o sistema real. No entanto, as restrições impostas não prejudicam de forma a inviabilizar as inferências realizadas ou a qualidade das mesmas. Trabalhos reais utilizando a seleção assistida permitirão que sejam validados os resultados obtidos nos sistemas simulados. Dessa forma, a simulação terá o seu uso justificado no melhoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.F.B. **Predição de potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais.** Lavras: UFLA, 1997. 80p. Tese, Doutorado.

AGUIAR, A.M. Controle genético do 'Stay Green' no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA, 1999. 55p. Dissertação, Mestrado.

BEARZOTI, E. Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 230p. Tese, Doutorado

BURTON, G.W. Quantitative inheritance in pearl midlet (*Penisetum glaucum*). **Agronomy Journal**, v.43, p.409-417, 1951.

CASALI, V.W.D.; TIGCHELAAR, E.C. Computer simulation studies comparing pedigree, bulk, and single seed descent selection in self pollinated populations. **Journal of American Society of Horticulture Science**, v.100, p.364-367, 1975.

DACHS, J.N.W. **Estatística computacional:** uma introdução ao Turbo Pascal. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1988. 236p.

EDWARDS, M.D.; PAGE, N.J. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.376-382, 1994.

FERREIRA, D.F. Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. 210p. Tese, Doutorado.

FRASER, A.S. Simulation of genetic systems by automatic digital computers: I. Introduction. **Australian Journal of Biological Science**, v.10, p.484-491, 1957a.

FRASER, A.S. Simulation of genetic systems by automatic digital computers: II. Effects of linkage on rates of advance under selection. **Australian Journal of Biological Science**, v.10, p.492-499, 1957b.

HOEL, P.G.; PORT, S.C.; STONE, C.J. **Introdução à teoria da probabilidade.** Rio de Janeiro: Interciência, 1978. 269p.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. **Genetics**, v.124, p.743-756, 1990.

MATHER, K.; JINKS, L.L. **Introdução a genética biométrica.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984. 242p.

MORGAN, B. J.T. **Elements of simulation.** London: Chapman & Hall, 1995. 351p.

NAYLOR, T.H.; BALINTFY, J.L.; BURDICK, D.S.; CHU, K. **Técnicas de simulação em computadores**. Petrópolis: Vozes, 1971. 402p.

ROWE, K.E.; ALEXANDER, W.L. Computations for estimating the genetic parameters in joint-scaling tests. **Crop Science**, v.20, p.109-110, 1980.

SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures:** usage; version 6. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1995. 373p.

SMITH, J.M. **Mathematical modeling and digital simulation for engineers and scientists**. New York: John Wiley, 1977. 332p.

THODAY, J.M.; THOMPSON JR., J.N. The number of segregating genes implied by continuous variation. **Genetica**, v.46, p.335-344, 1976.

ZANGH, W.; SMITH, C. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.813-820, 1992.

ZANGH, W.; SMITH, C. Simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium: the effects of several additional factors. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.492-496, 1993.

ZENG, Z.B.; HOULE, D.; COCKERHAM, C.C. How informative is Wright's estimator of the number of genes affecting a quantitative character? **Genetics**, v.126, p.235-247, 1990.

36

GESTÃO DE DIREITOS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL APLICADA AOS PRODUTOS E PROCESSOS DO SETOR AGRÍCOLA

MARIA JOSÉ AMSTALDEN SAMPAIO[1]
MARCIO DE MIRANDA SANTOS[2]

[1]Embrapa Sede, C.P. 040315 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.
[2]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

O processo de inovação tecnológica faz uso de uma grande massa de conhecimento científico e tecnológico na geração de novas tecnologias. Aumentar esta base de conhecimentos e incentivar a geração de novas tecnologias se constitui em fator estratégico para o desenvolvimento econômico-social em bases competitivas e sustentáveis nas economias modernas. A habilidade de criar, distribuir e explorar o conhecimento e a informação está, rapidamente, tornando-se a melhor ferramenta para aumentar a vantagem competitiva, criar riquezas e melhorar a qualidade de vida.

Neste processo, o Estado joga um papel da maior importância em pelo menos duas áreas. Primeiro, ao financiar parte substancial da pesquisa científica. Segundo, ao criar, regulamentar e monitorar incentivos ao desenvolvimento tecnológico e uso comercial da tecnologia gerada. A maior beneficiária da ação do Estado neste processo deverá ser sempre a sociedade, usuária final da diversidade de produtos acabados colocados à sua disposição.

A emergente indústria da biotecnologia, se constitui em um exemplo atual e marcante deste processo, onde o conhecimento gerado a partir da pesquisa científica em genética e biologia molecular, tem sido intensivamente utilizado no desenvolvimento de produtos e processos de interesse comercial, principalmente nas áreas agrícola e farmacêutica.

O progresso tecnológico, nestes dois setores, tem-se caracterizado pelos seguintes aspectos principais[1]:

- indústria e serviços baseados em intenso uso do conhecimento, implicando em maior pressão sobre a comunidade científica por maior produtividade e eficiência;
- formação de redes de pesquisa e trabalho em maior colaboração;
- maior interação com o setor privado, levando à exploração mais direta e rápida dos resultados da pesquisa científica e tecnológica[2].

A proteção à propriedade intelectual aplicada às inovações tecnológicas, envolvendo o todo ou parte de seres vivos e novos processos biológicos, apresenta-se neste contexto como um dos aspectos mais dinâmicos e controvertidos do estágio atual de desenvolvimento de regimes de propriedade intelectual. Trata-se de um tema extremamente polêmico, no qual muitas questões encontram-se ainda sem solução, matéria-prima para debate acalorado envolvendo interesses conflitantes no âmbito econômico, político, social, cultural e técnico, para não falar nos igualmente importantes aspectos morais e religiosos.

A indústria da moderna biotecnologia é usuária intensiva de novos conhecimentos[3]. Em média, o setor privado reinveste em pesquisa e desenvolvimento (P&D) 45% de seu lucro anual. Portanto, parte significativa do valor das empresas deste setor está imobilizado na forma de capital intelectual. O problema é que o

capital intelectual é facilmente dilapidado, podendo ser subtraído, copiado ou vendido, sem autorização dos seus proprietários.

Esta indústria encontra no sistema de patentes uma das únicas formas de evitar o uso não autorizado das invenções produzidas, uma vez reveladas a potenciais competidores. Isto parece ser de fundamental importância para que pequenas empresas possam se firmar neste mercado, reconhecidamente competitivo e demandante de significativos investimentos em equipamentos, tecnologia e pessoal. É justamente nesta indústria que se obtém um alto retorno da proteção à propriedade intelectual dado que algumas tecnologias são facilmente reproduzíveis, como, por exemplo, a reutilização de sementes a cada nova geração[4].

Por outro lado, reações contrárias ao patenteamento de organismos vivos apontam para:

- possíveis efeitos negativos sobre a disponibilidade e uso sustentável da diversidade biológica e dos recursos genéticos;
- não qualificação para o patenteamento de seqüências genéticas, mesmo quando isoladas de seres vivos;
- efeitos adversos sobre o fluxo de informações e intercâmbio científico[5];
- concessão de patentes extremamente abrangentes em setores estratégicos, favorecendo a formação de extensos monopólios, com crescente pressão sobre preços e bloqueio do processo de inovação tecnológica;
- aspectos éticos, morais e religiosos associados ao patenteamento da vida.

É neste contexto que se insere o presente desenvolvimento dos regimes de propriedade intelectual aplicados aos produtos e processos de interesse para o agronegócio.

2. NATUREZA DA PROPRIEDADE INTELECTUAL

Direitos de propriedade intelectual são concedidos em reconhecimento a contribuição intelectual na criação de, entre outros, novos produtos e processos de interesse industrial, como variedades vegetais melhoradas, com o propósito de incentivar o desenvolvimento econômico e social e de proteger os investimentos incorridos no processo de pesquisa e desenvolvimento.

A matéria viva pode ser submetida à propriedade corpórea, pública ou privada, e à propriedade intelectual. O todo ou parte de uma planta pode ser considerado propriedade de um indivíduo (na forma do resultado de uma colheita, por exemplo), assim como um cultivo perene ou anual é propriedade do legítimo dono ou arrendatário da terra em que for cultivado. Propriedade intelectual, genericamente, "se refere a toda espécie de propriedade que se origine ou provenha de qualquer concepção ou produto da inteligência, para exprimir um conjunto de direitos, que competem ao intelectual (escritor, artista ou inventor) como autor da obra imaginada, elaborada ou inventada[6]".

Pelo menos três diferenças principais podem ser apontadas entre a propriedade corpórea e a propriedade intelectual[7]. A primeira diz respeito ao fato de que a propriedade material do todo ou parte de um produto é perpétua, enquanto que a propriedade intelectual é um direito temporário. Direitos de propriedade intelectual

são concedidos por períodos da ordem de 20 anos na maioria das legislações sobre patentes e de 20 a 25 anos para direitos de melhorista, de acordo com a versão revisada, em 1991, da UPOV.

Segundo, a propriedade intelectual se refere ao conteúdo intangível de bens e processos. No caso de patentes sobre seres vivos ou matéria biológica, o direito de propriedade intelectual recai sobre a informação contida nos genes de um determinado organismo e não sobre o organismo *per se*. Neste caso, o detentor da patente exerce o direito de excluir terceiras partes de produzirem ou de comercializarem um determinado organismo ou algum de seus componentes, por um período determinado. No caso de direitos de melhorista, os direitos são exercidos sobre material propagativo, fazendo-se uma distinção entre grão (produto utilizado para consumo ou industrialização) e semente (normalmente definida como qualquer estrutura biológica utilizada para a propagação de uma dada variedade).

Terceiro, em contraste com a propriedade física "absoluta", a propriedade intelectual só pode ser exercida nos países aonde o título de propriedade foi concedido, de acordo com o princípio da territorialidade.

3. UM POUCO DA EVOLUÇÃO DO SISTEMA DE PATENTES NA ÁREA BIOTECNOLÓGICA

A patente é uma concessão que o Estado faz em reconhecimento à contribuição intelectual na invenção de novos produtos e processos específicos de aplicação industrial, com o propósito de criar incentivos e estimular o desenvolvimento de inovações tecnológicas, de modo a se obter retorno financeiro pelos investimentos realizados. Como mencionado anteriormente, o detentor da patente exerce o direito de excluir terceiras partes de produzirem ou de comercializarem um determinado organismo ou algum de seus componentes, por um período determinado.

Anteriormente a 1977 o *United States Patent and Trade Office* (USPTO) considerava produtos e processos naturais como "produtos da natureza" e, portanto, não elegíveis para o patenteamento. A partir deste ano a *Court of Customs and Appeals* estabeleceu que patentes poderiam ser solicitadas para "novas" formas ou composições de produtos naturais, ainda que patentes não poderiam ser concedidas para produtos naturais, na forma como se encontravam na natureza. Como conseqüência desta decisão[8], produtos naturais purificados (extraídos de matéria viva) passaram a ser considerados "novos" e, portanto, passíveis de patenteamento. A partir de então, patentes para organismos vivos passaram a ser concedidas nos Estados Unidos da América, procedimento que foi seguido pela maior parte dos países industrializados e em vias de ser adotado por países em desenvolvimento.

Outra decisão importante foi tomada pela Suprema Corte Americana em 1980, decidindo favoravelmente pelo patenteamento de bactéria geneticamente engenhada (naquele que ficou conhecido como o caso "Diamond v. Chakrabarty") e estabelecendo que microrganismos engenhados poderiam ser patenteados como *manufacture* ou *composition of matter*, constituindo-se no marco judicial que permitiu ao USPTO seguir concedendo patentes para microrganismos[9] que, por definição, podem incluir células de plantas e animais.

Apesar de que a base legal para o patenteamento de inovações biotecnológicas esteja estabelecida, vários problemas relacionados com a adaptação do sistema de patentes para produtos e processos biotecnológicos ainda persistem, especialmente quando o sistema tem abrangência para o todo ou parte de seres vivos, aí incluídas as seqüências genéticas.

A revelação da invenção é a moeda de troca recebida pela sociedade na concessão deste direito, fator que, além de estimular a competição imediatamente após a revelação do passo inventivo, permite que se forme um estoque de tecnologias que de outra forma não seria constituído por estarem protegidas por segredo industrial. Patentes na área biológica são concedidas para produtos, misturas de substâncias ou organismos, usos e métodos de utilização. Enquanto que a descrição plena de processos de criação e uso de produtos biotecnológicos seja na maioria das vezes possível, a descrição plena do todo ou de parte de seres vivos se constitui em um sério problema para a revelação de invenções nos regimes de patentes, face à complexidade dos sistemas biológicos envolvidos[10]. Ademais, a repetibilidade do processo de obtenção de um organismo não pode ser assegurada pela descrição escrita da inovação, por estar sujeito a mudanças aleatórias, fruto de processos biológicos naturais inerentes, anulando o principal item da contrapartida do inventor.

Outra questão de difícil solução se refere ao desenvolvimento e aplicação de critérios de obviedade para produtos biotecnológicos, fatores determinantes do critério de novidade para a concessão de uma patente. Caracterizar o passo inventivo, diferenciando o novo do que já existia, não é uma tarefa necessariamente de fácil exame pelos escritórios de patentes, exigindo grande conhecimento do estado da arte em biotecnologia e o estabelecimento de um conjunto mínimo de critérios capazes de orientar a atuação dos examinadores nesta questão. Quanto que um processo biotecnológico deve diferir de outro já patenteado de modo a ser considerado novo? Quanto que uma variedade precisa ser diferente de outra para ser patenteada ou protegida? (Como aplicar eficientemente o conceito de derivação essencial, introduzido pela UPOV 91?) Que percentagem de homologia uma seqüência genética precisa apresentar, abaixo da qual a mesma possa ser considerada nova? Estas questões serão muitas das vezes resolvidas por decisões dos tribunais ou por competentes advogados, já que dificilmente um biólogo se arriscaria a precisar conceitos e respostas definitivas para as mesmas, criando enorme potencial de litígio na administração dos direitos de propriedade intelectual nesta área.

Para complicar substancialmente esta situação, patentes de processos biológicos com alcance muito amplos têm sido solicitadas e concedidas por escritórios de patentes dos EUA e Europa[11], contribuindo para aquecer ainda mais o debate sobre esta questão, gerando incerteza e desconfiança no meio científico e na sociedade quanto a eficácia do sistema de patentes como promotor de inovação tecnológica na área de biotecnologia e abrindo as portas para a construção de monopólios legais sem precedentes no setor agrícola.

Adicionalmente, observa-se um relaxamento da aplicação do requisito "aplicação industrial", informação a ser especificada claramente em todo processo de solicitação de patente. O relaxamento deste requisito, como no caso de pedidos de patentes para seqüências genéticas sem especificação de função ou uso industrial,

pode conduzir a criação de monopólios sobre produtos e processos biológicos de amplo interesse para a pesquisa científica[12].

Em tese, a oposição ao patenteamento do todo ou de parte de seres vivos não encontra sustentação legal na maior parte dos países desenvolvidos. Esta questão está amparada em acordos internacionais sobre esta matéria. O *General Agreement on Trade and Tariffs* (GATT) define como patenteável "qualquer invenção, de produto ou processo, em todos os setores tecnológicos, desde que seja nova, envolva processo inventivo e seja passível de aplicação industrial"[13], fazendo clara menção a obrigatoriedade dos países signatários no que diz respeito ao patenteamento de microrganismos[14].

Os dispositivos do acordo TRIPS[15, 16] (*Trade Related Intellectual Property Rights Agreement*), acordo sobre propriedade intelectual integrante do GATT, têm provocado mudanças substanciais nos regimes de propriedade intelectual nos países signatários do mesmo, particularmente no que tange à proteção de produtos e processos resultantes da aplicação da biotecnologia moderna e do melhoramento genético. Como conseqüência, novos padrões passam a ser observados, a saber[17]:

- a propriedade intelectual foi rapidamente estendida para plantas[18] na maior parte do mundo, e para componentes dos seus genomas em países desenvolvidos;
- regimes de proteção à propriedade intelectual aplicável às variedades vegetais passam a ser implementados em países em desenvolvimento por força da entrada em vigor nestes países do acordo TRIPS, na sua maioria por força de sistema efetivo de proteção *sui generis* na linha da UPOV;
- poucas companhias passaram a dominar a capacidade mundial de produção de sementes[19, 20];
- companhias farmacêuticas, químicas e do agronegócio estão se agrupando, dando origem à industria da ciência da vida, altamente concentrada. Estima-se que cinco ou seis grandes grupos estarão controlando mais de 80% do mercado de sementes ao nível global na virada do século;
- maiores investimentos são realizados pelo setor privado em universidades nos Estados Unidos, Canadá e em alguns países da Europa, justamente para continuar aumentando sua plataforma intelectual;
- crescente interesse na apropriação da informação derivada do seqüenciamento do genoma humano e de plantas de grande interesse agrícola.

No cenário agrícola internacional as políticas sobre a proteção à propriedade intelectual são, direta e indiretamente, influenciadas pelas discussões no âmbito da Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica[21, 22] (CBD), a Organização Mundial de Comércio[23] (OMC), a Organização Mundial de Propriedade Intelectual[24] (OMPI), a União para a Proteção de Obtenções Vegetais[25] (UPOV), o Grupo Consultivo para Pesquisa Agrícola Internacional[26] (CGIAR) e seus centros internacionais de pesquisa, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação[27] (FAO) – principalmente no que tange ao intercâmbio de germoplasma[28] – e algumas outras entidades que recentemente incluíram a propriedade intelectual

no rol de suas atividades. Muitas organizações não-governamentais[29] (ONGs) e escritórios particulares se envolveram na discussão da propriedade intelectual, com posições a favor e contra o estabelecido nas regras de TRIPS, em muito contribuindo para a situação polêmica desta questão no âmbito internacional.

De acordo com a FAO[30], direitos de propriedade intelectual são críticos para o crescimento da indústria de biotecnologia. De acordo com esta organização, a falta de proteção intelectual apropriada nos diferentes países tem sido apontada como fator limitante para a transferência de resultados alcançados nos países desenvolvidos, bloqueando, inclusive, investimentos locais. A matéria tem implicações no comércio, no investimento em tecnologia e no acesso aos produtos biotecnológicos. Assim, a FAO recomenda aos países uma avaliação cuidadosa de suas posições e, conforme apropriado, a criação e revisão de legislações nacionais de propriedade intelectual de conformidade com o previsto no acordo TRIPS. Em particular, recomenda uma avaliação criteriosa sobre a melhor forma de proteção à propriedade intelectual a ser dada às novas cultivares.

Os questionamentos sobre a aplicação prática da propriedade intelectual e, em particular, das patentes, têm sua principal origem na tentativa de se adaptar o sistema vigente de propriedade intelectual à proteção de organismos vivos, genes e processos biológicos. No cenário criado pela indústria da moderna biotecnologia aplicada à agricultura, predominantemente ocupado pelo setor privado multinacional, é difícil equacionar, sob as mesmas regras, os resultados e interesses das grandes empresas, dos centros internacionais de pesquisa, da pesquisa pública nacional e das comunidades locais.

Teme-se que a apropriação da criação intelectual destrua a natureza publica da agricultura, especialmente no que se refere às necessidades dos mais pobres. Teme-se, ainda, que a privatização do DNA[31] sirva ao benefício de poucos (monopólios[32]) as expensas da maior parte da sociedade[33].

Uma questão central quando se discute biotecnologia de plantas é o que deve ser patenteado. O que é o todo e o que é parte do todo? O USPTO aprova, por exemplo, pedidos de patente de marcadores genômicos EST[34] (*expressed sequence tags*) e SNPs[35] (*single nucleotide polymorphisms*) ou polimorfismos de base única existentes no DNA de organismos. Ocorre que os SNPs são, na verdade, construções existentes na natureza, tratando-se de descobertas e não de invenções. Portanto, é válido questionar-se sobre os limites da proteção à propriedade intelectual e apropriação por estes tipos de direito do genoma[36, 37]. Aonde deve ser passada a linha divisória entre a descoberta e a invenção?

Em todo o mundo a pressão da sociedade tem sido muito grande para que o genoma humano não seja patenteado. Em decorrência dessa acalorada discussão anunciou-se, recentemente[38], uma proposta a ser discutida entre os governos dos Estados Unidos e da Inglaterra no sentido de que, se acordado internacionalmente, as informações obtidas pelos dois países no projeto Genoma Humano serão colocadas a disposição da pesquisa científica internacional.

Os Estados Unidos da América é, atualmente, o único país a usar patentes para proteger cultivares. Exatamente por isto, surgem ali os primeiros conflitos de aplicação da proteção dupla na área vegetal[39]. Existem inclusive chances de que o

patenteamento de cultivares nos EUA venha a ser rediscutido, dada a possibilidade de proteção efetiva das novas cultivares de sistema alternativo de proteção da propriedade intelectual, na linha da UPOV.

Enquanto o cenário de proteção intelectual não for suficientemente esclarecido, as grandes firmas de biotecnologia estarão disputando a proteção de seus investimentos nos países onde as cultivares geneticamente modificadas estão sendo plantadas[40, 41]. De acordo com a Firma *Prudential Securities* de *New York* (EUA), serão necessários cerca de dez anos para serem resolvidos legalmente todos os processos instaurados nos dois últimos anos, após a introdução de híbridos transgênicos no mercado. A indústria internacional parece aceitar normalmente este fato, tanto nos Estados Unidos como em países em desenvolvimento onde mantêm suas subsidiárias. Mas como reagirão as instituições de pesquisa pública em países em desenvolvimento, que entraram recentemente nessa área, e que colocam seus produtos diretamente ao alcance do agricultor? Haverá recursos suficientes para defender seus produtos (inclusive cultivares) e processos protegidos do uso indevido por terceiros, no Brasil e no exterior? Essa é uma nova fronteira que está apenas começando a se descortinar perante os administradores de P&D em todo o mundo, mas que se avizinha como um grande desafio para aqueles em países em desenvolvimento.

Outras duas questões que interferem com o agronegócio e com o patenteamento de produtos e processos biotecnológicos, e que devem ser analisadas pelos responsáveis por desenhar a política de propriedade intelectual dos países em desenvolvimento são apresentadas abaixo.

A primeira se refere à "exaustão de direitos"[42] e à "restrição à importação de certos produtos". A pergunta a ser feita neste caso é: deve o país desenhar sua legislação de modo a permitir a livre importação de produtos que tenham sido legitimamente comercializados pelo detentor dos direitos intelectuais em terceiros países?

A Seção 6 do GATT/TRIPS deixa em aberto para cada um dos países membros da OMC a determinação de sua política nacional sobre mercado paralelo. Entretanto, de acordo com Barton (1999), se todos os países membros da OMC decidissem permitir a importação paralela, os detentores de direitos proprietários poderiam concluir ser mais vantajoso financeiramente determinar uma política uniforme de preços em todos os mercados, o que provavelmente causaria um acréscimo substancial de preços de tais invenções em países em desenvolvimento.

A segunda diz respeito às restrições à importação impostas por países desenvolvidos, aí incluídos os produtos manufaturados a partir de processos patenteados, e que infringiriam os direitos do detentor se fabricados no país de importação. Além disso, o país pode proibir a importação de produtos feitos sob licença compulsória ou em situações em que a patente (mesmo que legitimamente) tenha sido negada. Portanto, o país em desenvolvimento que tem a expectativa de exportar produtos para os países desenvolvidos deve levar em consideração os detalhes da legislação nacional daqueles países, e claramente terá menor liberdade de decisão do que quando determinar as regras para produtos produzidos para o consumo interno.

4. A PROPRIEDADE INTELECTUAL APLICADA ÀS INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS APLICADAS AO SETOR AGRÍCOLA NOS ESTADOS UNIDOS

No que se refere ao setor agrícola, as políticas de propriedade intelectual adotadas pelo Departamento de Agricultura americano (USDA), por meio do seu Serviço de Pesquisa Agrícola (ARS), pelas universidades americanas e pela indústria da biotecnologia se entrelaçam no que se refere aos direitos autorais, de marcas, do segredo industrial, das patentes e da proteção de cultivares.

De acordo com sua política interna, o USDA/ARS "utiliza a proteção intelectual para promover a utilização de invenções que se originem da sua pesquisa, assegurando que direitos suficientes sobre as invenções sejam obtidos para garantir as necessidades do Governo e para que a invenção venha a ter uma aplicação prática em benefício da sociedade"[43]. O ARS deposita pedidos de patente após preenchidos alguns critérios[44], e sempre que as invenções tenham sido devidamente descritas, tenham sido testadas, tenham tido seu potencial comercial avaliado. Adicionalmente, este procedimento é adotado quando a proteção influenciar positivamente no processo de transferência da tecnologia e for necessária para preservar os direitos de propriedade do governo americano.

No momento, o USDA/ARS não solicita patentes de plantas, a menos que se determine a necessidade da patente para a difusão mais rápida da tecnologia no mercado. Por outro lado, os melhoristas do ARS vêm utilizando a proteção de cultivares de forma crescente. Faz parte, também, da política do ARS não depositar pedidos de patentes envolvendo animais transgênicos.

Toda e qualquer pesquisa colaborativa do USDA/ARS, com instituições públicas e privadas, é realizada mediante formalização de contrato (*Cooperative Research and Development Agreement* – CRADA[45]), que é gerenciado pelo Escritório de Interações Cooperativas (OCI).

O Escritório de Transferência de Tecnologia[46] (OTT) negocia com o setor privado o licenciamento de tecnologias patenteadas pelo USDA em consonância com os objetivos das emendas *Bayh-Dole Act*[47] (1980) e *Federal Technology Transfer Act* (1986). O custo da licença e os *royalties* são negociados, caso a caso, e dependem de vários fatores que incluem a abrangência dos direitos, o tamanho do mercado potencial, o tempo e os recursos a serem investidos pelo licenciado para levar a invenção até o mercado[48].

As invenções decorrentes da pesquisa são licenciadas de forma exclusiva, parcialmente exclusiva ou não-exclusiva aos interessados. Geralmente a licença parcialmente exclusiva é negociada com um pequeno número de interessados e é feita para uma região geográfica determinada ou para um campo específico de aplicação da tecnologia.

Não é comum para o OTT envolver-se com a transferência de tecnologia e licenciamentos de patentes com outros países. O principal canal é o repasse da tecnologia protegida para a iniciativa privada, que por sua vez fará o trabalho de negociação com terceiros[49] ou para os escritórios de transferência de tecnologia das universidades que possuam maior contato direto com terceiros, tanto no país quanto no exterior.

Baseando-se no fato de que a função primária da Universidade é a de ensinar, pesquisar e servir ao público, a maioria das Universidades Americanas gerencia a propriedade intelectual dos processos, produtos e demais itens passíveis de proteção à propriedade intelectual que emergem do trabalho de pesquisa e desenvolvimento, por meio de escritórios de transferência de tecnologia[50] (estruturas relativamente pequenas, contando com 6–10 funcionários) que gerenciam os processos de proteção e negociam os contratos com terceiros[51]. Geralmente, as tarefas relacionadas com o depósito, sua posterior manutenção e defesa, que precisam de acompanhamento por advogados especializados, são contratadas a parte e realizadas por vários escritórios particulares.

A regra mais geral é que os escritórios devem buscar sustentação financeira, tornando-se independentes do subsídio universitário. Tal determinação coloca uma pressão bastante forte sobre os administradores do portifólio de tecnologias protegidas da Universidade, implicando na busca constante do melhor contrato de licenciamento. Desta forma, qualquer discussão sobre o uso de tecnologia proprietária passa a ser vista como parte do negócio. A menos que exista uma fonte de recursos externa para alavancar a transferência de uma certa tecnologia, o repasse de tecnologia livre de custos e sem cláusula de recebimento de *royalties*, tem-se tornado ocorrência cada vez mais rara.

As universidades americanas mantêm políticas de propriedade intelectual bastante semelhantes[52] desde a década de 80, quando incorporaram as modificações promovidas pelo *Bayh-Dole Act*, as quais determinam que as Universidades podem solicitar direitos de propriedade intelectual sobre as sua próprias invenções (produtos e processos) oriundas de projetos financiados com recursos do Governo Federal. Por outro lado, somente nos últimos anos estas instituições estão dedicando maior atenção para o setor agrícola, dada a possibilidade crescente de retorno das aplicações da propriedade intelectual na biologia molecular/biotecnologia, no mapeamento de genomas, na bioprospecção, na proteção de cultivares e nos processos de biorremediação, entre outros.

Os Escritórios de Transferência de Tecnologia e Propriedade Intelectual definem tecnologia no sentido amplo, englobando, neste conceito, as inovações técnicas, invenções, descobertas, e a produção escrita ou em outras formas, inclusive *software*. As diretrizes sobre propriedade intelectual das universidades americanas incluem, além da distribuição e comercialização da propriedade intelectual, o acesso a produtos tangíveis como microrganismos, cultivares e *software*, os quais são sempre acompanhados, desde as fases iniciais, dos acordos de transferência de material (*Material Transfer Agreement*) e acordos de confidencialidade.

Os pesquisadores/inventores se comprometem a enfrentar as várias etapas de proteção da tecnologia, desde que haja compromisso legal institucionalizado por parte dos escritórios de transferência de tecnologia sobre retorno financeiro para o seu laboratório e, também, para si próprios[53]. De fato, todas as Universidades mantêm, embora com algumas diferenças nos valores e nas porcentagens, uma política bastante transparente de divisão de *royalties* com os inventores/autores nas diferentes áreas. Esse comprometimento da Universidade, além de outras facilidades que apoiam o desenvolvimento de incubadoras tecnológicas por parte dos próprios inventores (*start-ups*), é tido como elemento altamente motivador da maior produtividade científico/tecnológica observada nas últimas duas décadas[54].

Assim, a proteção intelectual dos produtos da pesquisa por instituições acadêmicas tem crescido exponencialmente. De acordo com avaliação feita pela AUTM, as 100 melhores Universidades receberam 177 patentes em 1974, 408 em 1984 e 1.486 em 1994. Em 1997, as 158 universidades mapeadas neste estudo depositaram mais de 6.000 pedidos de patente. As universidades americanas, que em 1991 assinaram 1.000 contratos de licenciamento, subiram esse número para 3.000 em 1998, gerando aproximadamente 500 milhões de dólares em *royalties*. Nessa corrida, a relação com a indústria floresceu como uma fonte alternativa de recursos e um portal ideal para a transferência de tecnologias.

Por outro lado, começam a aparecer trabalhos monstrando que a universidade americana transformou-se numa fábrica de inovação tecnológica e que uma reavaliação das políticas de propriedade intelectual e da legislação (*Boyh-Dale Act* e lei de patentes) se faz necessária, em vista da grande importância da Universidade como geradora de talentos e de conhecimento básico, componentes imprescindíveis para se enfrentar a nova fase econômica baseada em conhecimento (*knowledge economy*)[55].

Uma reavaliação do sistema universitário certamente trará questionamentos por parte da indústria, que nunca investiu tanto no apoio dos pesquisadores das instituições públicas/governamentais como nos momentos atuais. Procurando sempre consolidar cada vez mais sua plataforma intelectual, a nova indústria fundamentada nas ciências biológicas, conhecida como *Life Science Industry*, tem sido apoiada e beneficiada pelos cérebros atuando no setor acadêmico. Este apoio tem crescido muito nos últimos anos, incluindo o USDA (Florida,1999). Este fenômeno é também verdadeiro na Europa, por razões similares.

Em paralelo, esta mesma indústria vem investindo, diretamente, bilhões de dólares por ano na descoberta de novos processos e produtos, na sua proteção à propriedade intelectual e na salvaguarda de seus direitos, envolvendo-se, ainda, em inúmeras disputas judiciais que podem atingir valores astronômicos.

É nesse cenário que devem inserir-se as instituições de pesquisa dos países em desenvolvimento, cujo trabalho dependa das mesmas ferramentas tecnológicas.

5. A PROPRIEDADE INTELECTUAL APLICADA ÀS INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS APLICADAS AO SETOR AGRÍCOLA NO BRASIL

O Brasil tem vinculação muito antiga com o tema direitos de propriedade intelectual. O país foi pioneiro na adesão à Convenção de Paris, de 1883, e que até recentemente constituiu-se no documento internacional que balizou a legislação nacional de todos os países signatários em matéria de propriedade industrial. A Convenção de Paris estabeleceu parâmetros mínimos para harmonização de procedimentos concernentes à propriedade industrial e assegurou considerável liberdade para que cada país membro modulasse sua lei interna de acordo com seu grau de desenvolvimento tecnológico.

O GATT/TRIPS foi ratificado pelo Congresso Nacional em dezembro de 1994, um ano depois da entrada em vigor da Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, em 29 de dezembro de 1993. Desde então, tanto o Poder Executivo quanto o Poder Legislativo têm formulado, discutido, aprovado e implementado legislação para o amparo, dentro do território nacional, às diretivas constantes do GATT/

TRIPS, além de tomar as iniciativas necessárias para adesão aos acordos internacionais relevantes. O resultado desse esforço é mostrado abaixo:

- Dezembro, 1993 - Congresso Nacional ratifica a CDB;
- Dezembro, 1994 - Congresso Nacional ratifica o GATT/TRIPS que entra em vigor em janeiro de 1995;
- Maio, 1996 - Congresso Nacional aprova a Lei de Propriedade Industrial (Lei 9.279), regulamentada por vários decretos publicados pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, nos anos de 1997 e 1998;
- Maio, 1997 - Entrada em vigor da Lei 9.279;
- Abril, 1997 - Congresso Nacional aprova a Lei de Proteção de Cultivar (Lei 9.456);
- Novembro, 1997 - Publicado Decreto Regulamentador 2.366, regulamentando a Lei de Proteção de Cultivares, criando o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, no âmbito do Ministério da Agricultura e do Abastecimento;
- Novembro, 1997 - Submetida ao Congresso Nacional petição para a adesão do Brasil à Convenção da UPOV;
- Abril, 1998 - Conselho da UPOV aprova os dispositivos da Lei de Proteção de Cultivar nacional e de seu decreto regulamentador, de conformidade com os termos da versão 1978 da Convenção da UPOV;
- Junho, 1998 - Submetida ao Congresso Nacional proposta da nova lei de sementes, adaptada aos termos da Lei de Proteção de Cultivares. Esta proposta encontra-se em discussão no Poder Legislativo;
- Maio, 1999 - Brasil torna-se membro da UPOV, de acordo com os termos da versão 1978 desta Convenção.

Trata-se de um esforço muito grande realizado em parceria pelo executivo e legislativo nacional, no sentido de adaptar-se ao ambiente legal internacional e aos avanços tecnológicos observados, principalmente, na área biológica. Este esforço deu origem a ambiente legal nacional sobre o qual as relações de parceria do setor público e do setor privado poderão operar, no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos e processos, especialmente no que se refere àqueles de interesse para o setor agrícola nacional.

6. O TRATAMENTO DA PROPRIEDADE INTELECTUAL NA EMBRAPA

Desde 1995 a Embrapa vem se estruturando para acompanhar as mudanças observadas no Brasil e no exterior na área de propriedade intelectual. Este trabalho implicou: a) no envolvimento da empresa na preparação e defesa de legislação nacional apropriada aos interesses do país; b) na preparação e implementação de política interna; c) na criação e implementação, em 1999, de secretaria de propriedade intelectual, diretamente ligada à Presidência da empresa, especializada no gerenciamento do portifólio de tecnologias proprietárias. O desempenho da Embrapa na área de

propriedade intelectual vis-à-vis pesquisa agropecuária nacional, tem sido mencionado como modelo e usado como estudo de caso em várias instâncias no Brasil e no exterior.

Entretanto, considerando-se a experiência vivida nesse período pela Embrapa, em comparação com a dinâmica proporcionada pelos profissionais da área nos Estados Unidos, não e difícil visualizar a necessidade de urgente aprimoramento, pois o cenário internacional é complexo e está se modificando rapidamente, uma vez que a utilização da propriedade intelectual como ferramenta para o melhor desempenho da missão da Embrapa foi priorizado pela atual administração.

Desta forma, em adição às ações já implementadas, urge a necessidade de se dar maior ênfase na gestão de direitos de propriedade intelectual: a) na preparação dos pesquisadores sobre a gestão de direitos de propriedade intelectual, especialmente para líderes de projetos em áreas na fronteira do conhecimento; b) revisão dos projetos em andamento no que se refere ao *freedom to operate* e adequação das medidas tomadas pelos seus gestores no sentido de possibilitar e garantir a proteção futura, de acordo com a legislação nacional vigente, de produtos e processos derivados dos mesmos. Deve-se destacar que estas atividades estão previstas para a fase de implementação da política interna da Embrapa, aprovada em 1996.

Uma vez construída a plataforma legal de proteção à propriedade intelectual para cada nova tecnologia gerada, cabe à Secretaria de Propriedade Intelectual negociar seu licenciamento comercial para terceiros ou usá-la na negociação de tecnologia produzida por terceiros e de interesse para o país.

Reconhece-se que este e um processo de internalização lenta, uma vez que a Embrapa foi criada nos anos 70, muito antes da globalização da informação e da integração de mercados, de acordo com filosofia corrente de disponibilização livre de custos de todas as tecnologias geradas para seu usuário final, em benefício da sociedade. Foi criada, portanto, em época em que não se discutia a apropriação da atividade intelectual na área biológica e muito menos de seres vivos, como cultivares ou microrganismos transgênicos. No entanto, sua sobrevivência como instituição pública de P&D demanda sua rápida e contínua adaptação a este ambiente legal, na forma de políticas e procedimentos institucionalizados, que permita à Empresa se relacionar de forma competitiva com seus parceiros no Brasil e no exterior, dos setores público e privado que detenham tecnologia protegidas de interesse para o país.

A competitividade do setor agrícola nacional será alcançada por meio da incorporação em nossos produtos e processos agrícolas de tecnologia de ponta, na sua maioria protegida por direitos de propriedade intelectual. O futuro da agropecuária nacional dependerá, fundamentalmente, do repasse aos usuários finais deste tipo de tecnologia.

NOTAS DE RODAPÉ

[1]OECD - I (1999)

[2]A inovação tecnológica tem sido cada vez mais um produto do esforço cooperativo entre firmas, instituições científicas e outras organizações. Muitas destas "matrizes de conhecimento" têm agora natureza global. A inovação é cada vez mais necessária uma vez que vem crescendo, também, a demanda dos consumidores por qualidade e pela proteção do meio ambiente, forçando as instituições públicas e privadas a serem mais eficientes e a enfrentarem uma completa mudança de paradigma.

[3]OECD - II (1999)

[4]Barton (1999)

[5]All rights reserved. Science, 144:154-157, Sep 1993; The patent craze and academia. The Lancet, 342:1435-36, Dec 1993.

[6]In: De Placido e Silva. Vocabulario Juridico, volume III. Ed. Forense. Página1244.

[7]Correa, Carlos M. Sovereign and Property Rights Over Plant Genetic Resources. FAO Comission on Plant Genetic Resources. First Extraordinary Session, Rome, 7-11November 1994. Background Study, Paper Nº 2, Nov 1994.

[8]O resultado da votação dos Juízes da Suprema Corte foi de 5 a 4, ressaltando o caráter polêmico desta questão.

[9]Intellectual Property Protection of Biotechnology. In: Intellectual Property Rights for Agricultural Biotechnology. Options and Implications for Developing Countries. ISNAR Research Report #3, page 4. 1993.

[10]No caso de microrganismos, este problema foi parcialmente resolvido pelos dispositivos do Tratado de Budapeste, inteiramente dedicado a esta questão, que estabelece um sistema internacional de depósitos e procedimentos que devem ser seguidos por depositantes e depositários. Além disso, este Tratado reconhece algumas coleções de cultura como *International Depositary Authorities* (IDA's). Depósitos feitos em qualquer um dos IDA's são aceitos por qualquer um dos paises signatários do Tratado como tendo atendido aos requerimentos da sua legislação nacional. Desta forma, a impossibilidade de se descrever um dado microrganismo é ultrapassada, na prática, pelo depósito do mesmo em um dos IDA's, onde permanecerá à disposição de interessados em conhecê-lo.

[11]Broad biotechnology patents hamper innovation. Biotechnology and Development Monitor, 25: 15-16, Dec 1995.

[12]Schneider, João Elmo Patentes ou biotecnologia: estímulo ou obstáculo a produção de conhecimentos e inovações? Ciência Hoje, 15 (88). Março, 1993.

[13]GATT/TRIPS, Art. 27.1.

[14]O USPTO, na classe 435, define microrganismo como *bacteria, actinomycetales, cyanobacteria (unicellular algae), fungi, protozoa, animal cells or plant cells or virus.*

[15]TRIPS foi o primeiro acordo de âmbito legal internacional sobre propriedade intelectual a cobrir a área de biotecnologia agrícola. Está em vigor no Brasil desde janeiro de 1995.

[16]O Acordo TRIPS impôs requisitos mínimos ao nível global para os direitos de propriedade intelectual a serem reconhecidos e implementados pelos 134 países signatários – membros da OMC. Para a maioria dos países, entre os quais se inclui o Brasil, a data limite para implementação das exigências do artigo 27 foi janeiro de 2000. O padrão internacional para a proteção intelectual a ser implementado domesticamente pelos países signatários, no que tange à área biológica, pode ser assim sumarizado:

Artigo 27(1) – "a proteção pelo sistema de patentes deve estar disponível para qualquer invenção, qualquer que seja o produto ou processo, em todos os campos da tecnologia, desde que esses produtos ou processos sejam comprovadamente novos, envolvam um passo inventivo e sejam passíveis de aplicação industrial";

Artigo 27(2) – prevê que certas invenções poderão ser excluídas do processo de proteção por patentes, quando estiverem contra a *ordre public* ou a moralidade, incluindo-se também como motivos para exclusão da proteção a vida ou saúde humana, animal ou vegetal e sérios prejuízos ao meio ambiente";

Artigo 27(3) – permite aos países signatários excluir do sistema de patentes "plantas e animais outros que microrganismos e processos essencialmente biológicos para a produção de plantas ou animais outros que processos não-biológicos ou microbiológicos". Adicionalmente, é necessário que "os membros providenciem meios para a proteção de cultivares, ou por meio de patentes ou por mecanismo *sui generis* ou por uma combinação de ambos".

[17]Herdt (1999)

[18]Agris (1999)

[19]Quadro demonstrativo da fusão/aquisição das empresas de semente pelas novas corporações multinacionais que passaram a se chamar empresas de "Ciências da Vida" (www.oilseeds.org/asa/documents/seedindustry.htm)

[20]Jones (1998)

[21]www.biodiv.org

[22]IUCN (1999)

[23]www.wto.org

[24]www.wipo.org

[25]www.upov.org

[26]CGIAR (maio,1999)

[27]www.fao.org

[28]Ver discussões em torno do International Undertaking – http://web.icppgr.fao.org/gsmap_e.htm

[29]Entre outras instituicões listam-se Rockefeller Foundation (www.rockfound.org), National Center for Food and Agricultural Policy (www.ncfap.org), The Institute for Agriculture and Trade Policy

(www.iatp.org), Trade and Development Center (www.itd.org), Food and Agricultural Policy Research Institute (www.ag.iastate.edu), Genetic Resources Action International (www.grain.org), International Institute for International Development (http://iisd.ca), World Foundation for Environment and Development (www.wfed.org), International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (www.isaaa.org), Rural Advanced Foundation International (www.rafi.org), Association of University Technology Managers ,Inc. a qual estão associados todos os escritórios de transferência de tecnologia e manejo de propriedade intelectual vinculados as Universidades Americanas (www.autm.net), The World Conservation Union (www.iucn.org)

[30]Biotechnology (1999) – http://www.fao.org/unfao/bodies/COAG/COAG15/x0074e.htm

[31]Ácido Desoxirribunucleico (DNA)

[32]Poder de mercado : mercados para os quais há um único provedor (monopólio) ou poucos provedores (oligopólio) e que tendem a operar de maneiras específicas que decorrem de sua própria estrutura. Com a finalidade de aumentar o lucro, os provedores de tais mercados podem aumentar os preços e reduzir as quantidades disponíveis do produto em relação a um mercado mais competitivo. A concentração da produção de sementes nas mãos de poucas empresas de âmbito internacional deve levar nessa direção e tem sido motivo de preocupação mesmo entre os agricultores dos Estados Unidos, que começam a demandar do governo medidas publicas para dissolver tais monopólios (Herdt,1999).

[33]Nature (junho,1999)

[34]Um EST é uma pequena seqüência de DNA complementar a que é expressa pelo gene completo

[35]Um SNP é um polimorfismo, uma variação de uma seqüência de DNA em alguns membros da espécie

[36]Segundo a lei de patentes americana, as seqüências de DNA são consideradas matérias isoladas ou purificadas ou composições de matéria. Em outras palavras, são produtos da genialidade humana e tendo um nome distinto, estando caracterizada em uso industrial, são passíveis de patenteamento. Para que as seqüências de DNA sejam distintas daquelas que ocorrem na natureza e que portanto não podem ser patenteadas, o pedido de patente deve mostrar que a invenção foi purificada ou isolada ou é parte de uma molécula recombinante ou é parte integrante de um vetor.

[37]Doll (1998)

[38]The Guardian (setembro 20,1999)

[39]Kilman (1999)

[39]Nature (junho,1999)

[39]OECD Observer (1999)

[40]Des Moines Register (maio,1999)

[41]Asgrow Seed Co (1995)

[42]Se os direitos forem de exaustão nacional, um comprador é livre para revender os produtos somente no território onde ele o adquiriu (e em territórios onde o produto não seja protegido por patente), mas não pode levá-lo para outros mercados onde o produto seja protegido por patente. Se os direitos forem de exaustão internacional, os produtos distribuídos no mercado de um país membro da OMC, com a autorização do detentor dos direitos de propriedade intelectual, podem também ser distribuídos em outro mercado (de outro país – membro da OMC) sem que seja necessária nova autorização do detentor dos direitos de propriedade intelectual.

[43]www.ars.usda.gov/afmz/ppweb/

[44]Dentre outros, os critérios de avaliação de um pedido de patente são: atual interesse comercial, possibilidade de comercialização futura, tamanho do mercado em relação ao custo da comercialização, custo da comercialização *versus* necessidade de proteção (custo do parque industrial para produção ou custo da avaliação de risco ambiental e de consumo/custo de registro), possibilidade de comercialização sem proteção – aceitação do mercado (perdas significativas ?), possibilidade e custo da manutenção do direito após comercialização, amplitude da invenção (muito pouco abrangente?), necessidade de maior desenvolvimento do produto.

[45]CRADA – acordo firmado entre o Governo Federal Americano e a indústria, Fundações ou Universidades para colaboração em projeto de pesquisa sob os auspícios do *Federal Technology Transfer Act Amendment* (1986). Dá ao cooperante o direito de primeira recusa no licenciamento de patente desenvolvida no âmbito do acordo. Possui regras pré-estabelecidas e que devem ser obrigatoriamente seguidas por todo o corpo técnico do ARS – haja vista a comunicação interna recentemente encaminhada (Julho,1999) aos pesquisadores recordando-os que, no que tange a propriedade intelectual, os acordos de colaboração não podem desviar-se da missão pública da Agência. Um guia está sendo preparado para melhor informar os pesquisadores sobre a tramitação necessária no processo de negociação dos contratos. Alerta o documento que o ARS deve manter o processo transparente de tal maneira que não haja

o favorecimento desse ou daquele colaborador. A propriedade intelectual e a missão pública da Agência devem ser sempre salvaguardados.

[46]http://ott.ars.usda.gov/licence.html

[47]http://infoserv.rttonet.psu.edu/spa/tech.htm

[48]A partir de novembro,1995 o USDA iniciou um programa agressivo de parceria com os Estados, sob coordenação do OTT, com a finalidade de aumentar a competitividade dos negócios locais e expandir as oportunidades comerciais através do uso de novas tecnologias. Na maioria dos casos, a proteção intelectual do produto ou da cultivar facilita a negociação pois pré-estabelece algumas regras do contrato.

[49]Como exemplo, o USDA - ARS News Service anunciou em 15 de novembro de 1999, a disponibilidade de tecnologia patenteada que permite bloquear a formação de glicoalcalóides em tubérculos de batata. Essa tecnologia foi licenciada para uma firma de Wisconsin - Small Potatoes Inc. - que fará a negociação com terceiros, incluindo países em desenvolvimento.

[50]Endereços URL (108 ou mais) listados em www.autm.net/scripts/TTOffices/showunioffices/cfm

[51]Em alguns casos, a mera publicação dos resultados de pesquisa pode ser suficiente para transferir os resultados para o público. Mas em outros casos, é necessário encorajar a indústria, por meio da possibilidade de proteção dos direitos de propriedade intelectual e posterior concessão de licença de exploração, a investir no desenvolvimento dos produtos e processos para uso pelo público.

[52]Para exemplos veja: Office of Collaborations & Licensing – University of Arizona (http://reseachnet.asu.edu/techcoll/), Cornell Research Foundation – Cornell University (www.research.cornell.edu/CRF/), Office for Technology and Tradémark Licensing – Harvard University (www.techtransfer.harvard.edu/Research-Discovery.html), Technology Licensing Office – Massachusetts Institute of Technology (http://web.mit.edu/tlo/www/guide.1.html), Patent Foundation – University of Virginia (www.uvapf.org/main.cfm)

[53]Comunicações pessoais de pesquisadores de algumas universidades contatadas, como *Cornell, Michigan State* e *Maryland*.

[54]Johnsen & Brewen (1998)

[55]Florida(1999).

LITERATURA CONSULTADA

AGRIS, C.H. Intellectual property protection of plants. **Nature Biotechnology**, v.17, 1999. Asgrow Seed Co. v. Winterboer,513 U.S. 179 (1995). <http://supct.cornell.edu/supct/html/92-2038.2S/html>

BARTON, J.H.; LESSER,W.; WATAL, J. Intellectual property rights in the developing world: implications for agriculture. In: WORLD BANK MEETING ON IPR AND BIOTECHNOLOGY, Washington, 1999.

BLAKENEY, M.; COHEN, J.; CRESPI, R.S. Intellectual property rights and agricultural biotechnology. In: MANAGING agricultural biotechnology: adressing research programs and policy implications for developing countries. s.l.: ISNAR/CABI, 1999.

CGIAR. Center Statements on Genetic Resources. **Intellectual property rights, and biotechnology**. China, 1999. <www.cimmyt.cgiar.org>

CRESPI, R.S. Patenting for the research scientist; bridging the cultural divide. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.450-455, 1998.

Des Moines Register Lawsuits follow introduction of hybrid seeds. 1999. www.biotech-info.net/lawsuit_follow.html

DOLL, J.J. The patenting of DNA. Science, v.280, n.5364, 1998.

DUCOR, P. Research tool patents and the experimental use exemption – a no-win situation? **Nature Biotechnology**, v.17, p.1027-1028, 1999.

FAO. Biotechnology Committee on Agriculture, 15th Session, January, Rome, 1999. <www.fao.org/unfao/bodies/COAG/COAG15/x0074e.htm>

FLORIDA, R. The role of the University: leveraging talent, not technology. Issues in Science and Technology on line, Summer, 1999. <www.nap.edu/issues/15.4/florida.htm>

FOX, J. US okays patent reform bill. **Nature Biotechnology**, v.17, n.10, 1999.

HERDT, R.W. Enclosing the global plant genetic commons. Lecture delivered at the China Center for Economic Research. May, 1999.

IUCN. The relationship between intellectual property rights and the relevant provisions of TRIPS and the Convention on Biological Diversity. Intersessional Meeting, Agenda item 3.8 ,1999.

JOHNSEN, P.B.; BREWEN, J.G. Public-Private Partnership Boosts Public Benefits. Agirultural Research, March, 1998.

JONES, E. Peformance consequences of vertical and horizontal structural change: Inter-organizational relationships in the seed/genetics/biotechnology sector. 1998. <www.ag.uiuc.edu/famc/program98/jones.htm>

LYONS-JOHNSON, D. BREWEN, J.G. Public-private partnership boosts public benefits.- Agriculture Research March, 1998. <www.ars.usda.gov/is/AR/> Nature Patent rules should include a defense against monopolies. June, 1999.<www.biotech-info.net/monopoly_defense.html>

OECD. Intellectual property: rights and wrongss. Observer. April, 1999 www.oecdobserver.org/news/fullstory.pnp3?aid=86)

OECD. I. Fostering scientific and technological progress; policy brief. June, 1999. <www.cecd.org/publications/Pol_brief/>

OECD. II. Modern Biotechnology and the OECD; policy brief. June, 1999. www.oecd.org/publications/Pol_brief/

PERKO, J.S.; NARIN. F. The transfer of public sciencee to patented technology: a case study in agriculturaal science. **Journal of Technology Transfer**, v.22, p.65-72, 1997. <www.nps.ars.usda.gov>

SANTOS, M.de M. Direitos de propriedade intelectuaal na área biológica: alguns pontos a serem consideradoos na preparação de legislações nacionais. base de dadoos tropical. Campinas, 1996 <http://www.bdt.org.br/paper/padctbio.cgi/>.

SANTOS, M.de M.; LEWONTIN, R.C. Genetics, plant breeding and patents: conceptual contradictions and practical problems in protecting biological innovations. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.112, p.1-8, 1997.

HENCKE, D.; ROB EVANS, R.; TIM RADFORD, T. The guardian blair and clinton push to stop gene patents. London. Sep. 1999 <www.newsunlimited.co.uk/guardian/ >

WATAL, J. Intellectual property rights and agriculture: interests of developing countries; contents from the book by the author: "Intellectual Property Rights in the World Trade Organization: The way forward for developing countries". India: Oxford Univeristy Press, 2000. /In Press/

37

PARCERIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA EM MELHORAMENTO NO BRASIL: O EXEMPLO DA SOJA

JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO[1]
ROMEU AFONSO DE SOUZA KIIHL[1]
LEONES ALVES DE ALMEIDA[1]
LUIS CARLOS MIRANDA[2]
CARLOS ALBERTO ARRABAL ARIAS[1]

[1]Embrapa Soja, C.P. 231 - CEP: 86001-970 - Londrina, PR.
[2]Embrapa Negócios Tecnológicos, Parque Estação Biológica - PqEB S/N - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.

1. UM CENÁRIO DE MUDANÇAS

Nos últimos anos, aconteceram grandes transformações nos cenários social, político e econômico mundiais, em função das facilidades de comunicação, de transportes e da abertura dos mercados. Houve um processo de internacionalização das economias que trouxe maior demanda por produtos e serviços de alta qualidade, por parte de cidadãos cada vez mais cientes de seus direitos. As transformações trouxeram, também, exigências de sustentabilidade para a atividade econômica, com garantias de preservação do meio ambiente e da qualidade de vida.

A abertura dos mercados aumentou a competitividade nas economias, expôs as deficiências do setor produtivo e dificultou a manutenção de privilégios de Países, regiões, grupos políticos ou agentes econômicos. Interligou os mercados nacionais de produtos e serviços e fez despontar, imediatamente, as unidades produtivas mais eficientes. A eficiência decorreu de menor custo ou de outras vantagens estratégicas como escala de produção, facilidade de transporte e, principalmente, tecnologia disponível. Houve significativa melhoria na quantidade e na qualidade de bens e serviços ofertados ao consumidor.

O desenvolvimento científico e tecnológico sem precedentes no mundo tem sido fator preponderante de suporte a essas mudanças e, como não poderia deixar de ser, a pesquisa agropecuária está profundamente inserida nesse contexto. Por sua vez, o melhoramento genético, na atividade de criação de cultivares e incorporação dos avanços da biotecnologia, tem participado como agente modificador de paradigmas importantes relacionados à propriedade intelectual, ao relacionamento entre parceiros públicos e privados e ao financiamento das atividades de pesquisa.

A internacionalização trouxe alterações profundas no tratamento da propriedade intelectual relativa ao melhoramento genético no Brasil. Em 1993, o País firmou a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) e em 1994 ratificou o Acordo dos Assuntos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (TRIPS). A partir de então, foi criada legislação nacional para dar amparo às diretrizes do CDB e TRIPS, sendo elaboradas e aprovadas as Leis e promulgados os Decretos reguladores a seguir: a) Lei nº 8.974 de janeiro de 1995 – Lei de Biossegurança; b) Lei nº 9.456 de abril de 1997 – Lei de Proteção de Cultivares; c) Dec. nº 1.752 de dezembro de 1995 – Regulamenta a Lei de Biossegurança; d) Dec. nº 2.366 de novembro de 1997 – Regulamenta a Lei de Proteção de Cultivares.

Essas leis abriram espaço para investimentos privados na geração de cultivares das principais culturas econômicas. Também ampliaram a perspectiva de negócios resultantes da introdução de genes por técnicas de transformação genética nas cultivares brasileiras. Esse cenário atraiu a atenção das grandes empresas internacionais vinculadas ao melhoramento genético. A ação das gigantes do melhoramento foi fulminante no caso do milho. Com a aquisição de companhias de genética e melhoramento nacionais, essas empresas rapidamente dominaram mais de 90% do mercado brasileiro de sementes do cereal.

No caso da soja, a situação foi diferente em função de algumas parcerias estratégicas entre o setor público e o privado, que já estavam em andamento quando o Brasil adotou a legislação atual. Esse sistema mostrou ser extremamente eficiente e competitivo, e as cultivares de soja da Embrapa e parceiros foram responsáveis por cerca de 70% do mercado em 1999, exibindo excelentes qualidade, produtividade e adaptação às regiões produtoras.

2. ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES E DESAFIOS DO TRABALHO DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE SOJA

A grande extensão territorial do Brasil sempre foi um desafio à atuação dos Centros Nacionais de Pesquisa da Embrapa. A cultura da soja, com seus 13 milhões de hectares de cultivo abrangendo do Rio Grande do Sul a Roraima e de Rondônia à Bahia, é um bom exemplo das dificuldades enfrentadas. A Embrapa Soja, entretanto, desenvolveu mecanismos de atuação ao longo de sua existência que permitiram atender às demandas por cultivares e outras tecnologias para a cultura no País.

Até o final da década de 70, quando a soja era cultivada principalmente no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e no Paraná, havia desafios à atuação da pesquisa de soja, pois a diversidade ecológica dos ambientes de cultivo já era significativa. As cultivares predominantes à época eram provenientes dos programas de melhoramento realizados no sul dos Estados Unidos. Assim, as cultivares Hill, Hood, Paraná (linhagem americana), Bragg e Davis foram testadas e selecionadas, pois mostraram adaptação para cultivo na Região Sul. Nessa época, a pesquisa de melhoramento era realizada em parceria com unidades de pesquisa pública dessa região.

A partir dos anos 80, quando, através do melhoramento genético brasileiro, a soja transpôs os limites estabelecidos pelas estreitas faixas de adaptação das cultivares tradicionais e foi incluída nos sistemas de cultivo do Centro-Oeste, a dimensão e a diversidade das áreas de cultivo se constituíram em importante barreira. Desenvolver novas cultivares adaptadas, produtivas e resistentes a diversas doenças mostrou ser tarefa extremamente complexa. Os trabalhos iniciaram-se integrando várias unidades de pesquisa pública dessa região.

O sucesso de um programa de melhoramento depende de uma série de fatores, mas os principais são: a) a disponibilidade de um bom banco de germoplasma; b) a capacidade técnica dos pesquisadores envolvidos e c) a quantidade de trabalho aplicada. Considerando que no Brasil a disponibilidade de material genético no banco de germoplasma de soja é adequada e que a Embrapa e outras instituições do País possuem pesquisadores altamente qualificados, a extensão territorial que se pretende cobrir com o programa de melhoramento e o progresso genético anual esperado determinam o esforço a ser empregado no programa. Isso porque, em princípio, quanto maior o número de locais e épocas dos experimentos, maior a precisão na avaliação do germoplasma, maior a chance de adaptação ampla dos materiais selecionados e a maior a possibilidade de sucesso do trabalho de criação de novas cultivares.

Ao se desenhar um programa de melhoramento de soja é importante determinar sua área de abrangência, ou seja, os ambientes onde se pretende que as cultivares obtidas sejam cultivadas com sucesso. Essas áreas precisam ser muito bem

caracterizadas com base em critérios como latitude, altitude e variáveis climáticas e de solo. De modo geral, essa caracterização deve permitir o agrupamento de ambientes e a conseqüente racionalização do número de locais para teste de avaliação do germoplasma, sem perder a representatividade do macroambiente alvo. Com freqüência, o número de ensaios realizados e, portanto, a representatividade dos mesmos resultam de um compromisso entre precisão técnica e a disponibilidade de recursos. No caso do Brasil, onde cerca de 13 milhões de hectares são cultivados, definir esses testes é um verdadeiro desafio.

Existem três opções de programa de melhoramento para a soja: a) programa de melhoramento pequeno e de escopo limitado; b) vários programas independentes que, no conjunto, atendem ampla área de cultivo e c) programa amplo, que visa criar cultivares adaptadas a grandes áreas. Os primeiros são geralmente programas isolados, apropriados para criar cultivares para áreas restritas. Podem ser adequados para alguns tipos de culturas, mas, no caso da soja, esses programas têm pouco sucesso, pois cultivares para uso em regiões específicas esbarram em estratégias técnicas e comerciais de produção de semente. O segundo exemplo, ter um sistema constituído por vários programas de melhoramento independentes localizados em áreas restritas, é uma opção economicamente cara e, conseqüentemente, desinteressante por ser pouco competitiva no mercado. O resultado é preço elevado da semente para os produtores. Esses programas podem coexistir no caso das culturas sem grande expressão, onde a competição entre programas ainda não atingiu patamares elevados, ou podem sobreviver em culturas importantes através de acordos que limitem a competição e criem "reservas" de mercado. No caso da soja, têm poucas chances de sobreviver, porque o ambiente é altamente competitivo. O terceiro exemplo é o de maior complexidade, mas também é o de maior interesse pela racionalização dos trabalhos envolvidos, pela eficiência no uso da estrutura, pela troca de informações estratégicas e, principalmente, pelos resultados que tem produzido.

O atual programa de melhoramento de soja da Embrapa é um bom exemplo de um programa amplo e ambicioso e que tem gerado bons resultados. É bastante dinâmico, apresentando ganho genético anual de cerca de 2%, e tem dimensão nacional, abrangendo praticamente todas as áreas de cultivo da soja. As cultivares produzidas são altamente produtivas, resistentes às principais doenças e pragas e têm representado grande contribuição à sojicultura brasileira. O processo de busca de eficiência foi longo, mas os excelentes resultados dos últimos anos mostram que a estratégia adotada e as soluções encontradas foram adequadas.

A forma encontrada para o desenvolvimento dos trabalhos na magnitude desejada e necessária, ditadas pelos objetivos traçados em consonância com a missão da Embrapa Soja, foi integrar os agentes públicos e privados envolvidos no "negócio" soja, propondo ações conjuntas e integradas através de parcerias para o desenvolvimento de cultivares de soja nas várias regiões ecológicas produtoras. Apoiar a produção dessas novas cultivares com tecnologias, serviços e produtos que garantissem segurança e retorno econômico ao produtor, qualidade ao consumidor e sustentabilidade ambiental, foi outro grande desafio que também exigiu a busca de soluções criativas para promover uma integração ainda mais ampla entre os vários agentes da cadeia produtiva e a pesquisa. As novas cultivares foram utilizadas como

veículo para as demais tecnologias e apresentadas como componentes de um sistema que incluía manejo do solo, manejo da cultura e aspectos econômicos de comercialização.

3. AS PARCERIAS

Ao longo dos anos, várias formas de cooperação foram buscadas: a) entre Unidades da Embrapa; b) entre a Embrapa e as Empresas Estaduais de Pesquisa; c) com cooperativas agropecuárias; d) com produtores de sementes; e e) com outras empresas privadas. Essas formas de cooperação não eram excludentes e podiam ocorrer entre um grupo de entidades.

Os resultados alcançados mostram que esses esforços foram muito benéficos à sojicultura e, por conseqüência, ao País. A produção de soja no Brasil aumentou 29% nos últimos dez anos, passando de 24 milhões para 31 milhões de toneladas, entre as safras de 1988/89 e 1998/99. Esse aumento de produção se deveu, essencialmente, a um significativo aumento da produtividade que passou de 1940 kg ha^{-1}, em 1988/89, para 2360 kg ha^{-1}, em 1998/99, enquanto a área cultivada evoluiu de 12,2 para 13,0 milhões de hectares, no mesmo período. Todas as regiões, Sul, Centro-Oeste, Sudeste, Nordeste e Norte, apresentaram aumento de produção. No entanto, o principal incremento ocorreu no Centro-Oeste onde passou de 8,8 milhões para 13 milhões de toneladas. Nesse mesmo período, soluções para doenças e pragas importantes como o cancro-da-haste e o nematóide de cisto foram encontradas. Também, como resultado do trabalho da Embrapa e dos parceiros, pode-se afirmar que o nível tecnológico da soja brasileira é hoje bastante semelhante ao norte-americano que, além de ser o maior produtor mundial, possui muito mais tempo de pesquisa e experiência com a cultura.

Alguns exemplos de criação e de evolução das parcerias para o desenvolvimento de cultivares de soja são dados a seguir.

1. No Estado do Mato Grosso, com início em novembro de 1993, entre a Embrapa Soja, a Embrapa Serviços Tecnológicos, a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso (EMPA-MT), a Associação dos Produtores de Semente do Mato Grosso (APROSMAT) e a Fazenda Itamaraty Norte. O contrato entre as partes delineava normas gerais para a integração de esforços na execução de pesquisa em melhoramento genético e na produção de sementes genética e básica de soja para o estado. Em dezembro de 1994, a Fundação MT, uma associação criada pelos produtores de semente de soja do Mato Grosso, substituiu a APROSMAT na parceria. Nos anos seguintes, a Itamaraty Norte e, posteriormente, a EMPA MT deixaram de participar dos trabalhos que foram continuados pela Embrapa e Fundação MT. No Mato Grosso, o sucesso da parceria é facilmente mensurável pela participação das cultivares da Embrapa e dos parceiros na área cultivada com soja: mais de 83%, em 1999;

2. No Estado de Minas Gerais, com início em abril de 1996, entre a Embrapa Soja, a Embrapa Serviços Tecnológicos, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), a Associação dos Produtores de Sementes de Minas Gerais (APSEMG), a COOPAMIL, a COOPADAP, a Agropecuária Carlos Kage e a

Agropecuária Boa Fé, com a gestão da Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAP). O contrato entre as partes delineava normas gerais para uma integração de esforços na execução de pesquisa em melhoramento genético e na produção de sementes genética e básica de soja para o Estado. Após dois anos de funcionamento, a parceria sofreu alterações, como a desistência da COOPADAP, a transformação da APSEMG em colaboradora e a mudança de gestão, que passou a ser realizada pela Fundação Triângulo, formada por produtores de semente de soja. Um exemplo positivo da atuação dessa parceria foi a criação da cultivar soja MG/BR 46 (Conquista), que é a mais cultivada no Brasil.

3. No Estado de Goiás, com início em setembro de 1994, entre a Embrapa Soja, a Embrapa Serviços Tecnológicos, a Embrapa Cerrados, a Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária (EMGOPA) e a Associação Goiana de Produtores de Sementes (AGROSEM), que criou o Grupo Tecnológico em Agropecuária (GTA) para fazer a gestão da parceria. O contrato entre as partes delineava normas gerais para uma integração de esforços na execução de pesquisa em melhoramento genético e na produção de sementes genética e básica de soja para o Estado de Goiás e o Distrito Federal. Nos anos seguintes a Embrapa Cerrados se desligou da parceria para iniciar outra, no Distrito Federal, e a EMGOPA foi incorporada pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Goiás (EMATER-GO). O GTA da AGROSEM também deixou o convênio e foi substituído pela empresa CTPA, constituída pelos produtores de semente de soja de Goiás. Pela primeira vez, antes da promulgação da Lei de Proteção de Cultivares foi prevista em contrato a cobrança de uma contribuição (*royalties*) sobre a produção de sementes registrada, certificada e fiscalizada, que seria revertida para a pesquisa. A cultivar BRSGO Jataí, essencialmente derivada da EMGOPA 313, com resistência ao cancro-da-haste e estabilidade de produção em várias épocas de semeadura, é um bom exemplo da qualidade dos trabalhos desenvolvidos pela parceria de Goiás.

4. Outras parcerias foram criadas no Distrito Federal, em Rondônia, no Mato Grosso do Sul, na Bahia, no Maranhão, no Rio Grande do Sul e no Paraná. Da mesma forma os principais envolvidos são a Embrapa e os produtores de sementes de soja de cada região.

A execução dos trabalhos propostos, as dificuldades enfrentadas e a experiência adquirida levaram a um aperfeiçoamento das formas de relacionamento e à seleção dos participantes. As parcerias mais óbvias, entre Unidades da Embrapa com empresas do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária – SNPA, foram capazes de suprir as demandas por pesquisa durante alguns anos. Logo ficou evidente que as restrições orçamentárias, as diferenças de visão dos dirigentes e os limites impostos à contratação de pesquisadores e de apoio nas empresas públicas eram fatores limitantes ao desenvolvimento dos trabalhos. Formas híbridas de cooperação, envolvendo unidades da Embrapa, empresas do SNPA e cooperativas ou outras formas de associações de empresas privadas, foram tentadas. Diversos problemas surgiram e diversas arestas tiveram que ser aparadas durante o exercício dos trabalhos a que as parcerias se propuseram a fazer. A partilha das responsabilidades das tarefas, o dinamismo na busca das soluções, a conciliação do interesse público com o interesse privado, a

garantia dos direitos das partes, tudo isso teve que ser equacionado. Vários parceiros desistiram no meio do caminho e a reformatação dos acordos foi necessária em vários casos. Por último, a aprovação da legislação brasileira de propriedade intelectual, que traz no seu bojo a Lei de Proteção de Cultivares, e a conseqüente aprovação da política da Embrapa sobre proteção intelectual, forçaram novas revisões dos contratos das parcerias. As negociações para realizar as modificações contratuais e inserir o trabalho sob a égide dessa Lei e das novas normas da Embrapa estão em andamento.

As parcerias foram consolidadas, principalmente pela sensibilidade dos produtores de semente que visualizaram as perspectivas de crescimento trazidas pelo trabalho conjunto com a Embrapa. O produtor de semente é um cliente direto da pesquisa, interessado na existência de cultivares produtivas e bem adaptadas às várias regiões, capazes de garantir o seu negócio, que é a multiplicação e a venda de sementes. Esses produtores de semente associados em fundações privadas de apoio à pesquisa formaram as melhores parcerias para a criação e o desenvolvimento de novas cultivares de soja em troca da co-propriedade das mesmas ou da exclusividade na produção de semente. A Embrapa ganhou parceiros experientes e agressivos em comercialização, interpretadores das demandas por tecnologia, que apoiaram decididamente os trabalhos através do financiamento das despesas de custeio e investimento.

Atualmente as parcerias estão evoluindo para outras áreas da pesquisa, porque logo ficou claro que as cultivares deveriam ser ofertadas junto com um conjunto de tecnologias como manejo da fertilidade do solo e das doenças e pragas, por exemplo, que garantissem o sucesso do produtor de grãos. Através da união dos esforços das instituições parceiras em cada estado, está sendo possível a implementação desses trabalhos nas dimensões necessárias, agregando a iniciativa privada envolvida com máquinas agrícolas, defensivos, fertilizantes, transporte e comercialização.

A experiência adquirida permitiu sintetizar os objetivos, as diretrizes e as vantagens mais aparentes dos trabalhos realizados. Os objetivos gerais das parcerias podem ser resumidos em: a) apoiar as atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) na busca de soluções tecnológicas demandadas pela cadeia produtiva; b) transferir e acompanhar o impacto causado pelas novas tecnologias; c) coletar e eleger prioridades para a pesquisa; d) captar recursos; e) mobilizar suporte político institucional. As parcerias foram regidas por diretrizes destinadas a criar um arcabouço legal para facilitar o trato da "coisa pública". Essas diretrizes podem ser resumidas: a) adesão à missão da Embrapa Soja; b) valorização da tecnologia; c) inserção da instituição no mercado; d) interação com o cliente; e) redução de custos; f) integração dos participantes da cadeia produtiva; g) proteção do conhecimento. As vantagens das parcerias ficaram logo aparentes: a) a iniciativa privada viabilizou recursos para financiar o custeio e o investimento da pesquisa; b) o quadro de pesquisadores, experiente e bem treinado, sentindo-se livre de restrições financeiras pôde expressar toda sua criatividade; c) o pesquisador foi colocado em contato direto com seu cliente e obteve, rapidamente, informações precisas que permitiram a criação de produtos que atendessem as expectativas/necessidades da cadeia produtiva; d) a capacidade de pesquisa da Embrapa Soja foi associada à agressividade do *marketing* do produtor de semente.

4. RESULTADOS

A formação de equipes de melhoramento genético em regiões ecológicas estratégicas, como os Cerrados, foi essencial para vencer as barreiras conhecidas como as interações entre os genótipos e os ambientes e gerar cultivares produtivas, resistentes a doenças e de adaptação ampla.

Cultivares bem adaptadas e altamente produtivas foram obtidas. Os benefícios para a sojicultura brasileira foram muito expressivos. A Tabela 1 mostra a evolução da produtividade da soja brasileira nos 25 anos agrupados por quinquênios. É notório o significativo aumento da produtividade nos dois últimos períodos de cinco anos, comparativamente aos anteriores. Esse aumento coincide com o período de amadurecimento e forte ação das parcerias que, mesmo enfrentando problemas fitossanitários importantes como o cancro-da-haste e o nematóide de cisto, foram capazes de criar cultivares que proporcionaram ganhos observados.

A área com cultivares geradas pelas parcerias atinge hoje cerca de 70% dos 13 milhões de hectares de soja, garantindo a sobrevivência de cerca de 550 empresas tipicamente nacionais no ramo de produção de semente de soja. A produtividade brasileira é, com exceção do Estado do Rio Grande do Sul, semelhante à dos Estados Unidos.

A competição entre os produtores de semente garante aos agricultores brasileiros o benefício de semente a preços acessíveis: US$ 20-25 por saca de 50kg, cerca de metade do que paga um sojicultor norte-americano.

Para a Embrapa Soja, houve como benefício extra o aporte de R$ 954.804,00 em recursos diretos e R$ 2.069.000,00 em recursos indiretos somente em 1993. Esses valores são significativos quando comparados com o total de R$ 1.517.150,05 de recursos do tesouro nacional alocados para o custeio (exceto pessoal) da Unidade, no mesmo período.

TABELA 1. Produtividade da soja brasileira em cinco qüinqüênios sucessivos compreendendo o período entre 1975 e 1999.

Período	Produtividade kg ha^{-1}	Principais cultivares
1975 a 1980	1541	Bragg, Bossier, BR-1, Davis, IAS-4, IAS-5, Paraná, Planalto, IAC 4, Santa Rosa e UFV-1
1981 a 1985	1714	BR 4 e 6, Cobb, Cristalina, Doko, Emgopa 301, IAC-6, 7 e 8, Ivaí e Tropical
1986 a 1990	1728	BR 15, 16 e 27 (Cariri), Emgopa 305e 306, FT - Estrela e Abyara, MG/BR-22 (Garimpo), OCEPAR 4 - Iguaçu e RS7 - Jacuí
1991 a 1995	2033	BR/EMGOPA 314 (Garça Branca), CAC-1, Embrapa 1, 4, 20 e 48, Emgopa 313, MG/BR-46 (Conquista) e MT/BR-45 (Paiaguás),
1996 a 1999	2319	COODETEC 201, BR/IAC-21, BRS Celeste, BRSGO Jataí, BRSMG Segurança, BRSMT Pintado e Uirapuru, Embrapa 59, 66, 133 e 137, Emgopa 315, FT-106 e MG/BR 48 (Garimpo-RCH)

Os resultados provenientes da agregação de setores tão distintos como pesquisa e produtores de semente permitiu que os produtores enxergassem nitidamente as vantagens de estarem organizados. Formas subseqüentes de associação e parcerias foram ou estão sendo buscadas. Empresas produtoras de insumos e de máquinas e empresas de transporte e de comercialização estão sendo chamadas para compor as parcerias. Os primeiros resultados estão aparecendo na forma de sensível redução de custos e aumento da eficiência.

O desenvolvimento desse modelo de atuação coletiva vai possibilitar ao agronegócio uma mudança estrutural, que se formalizará através de instrumentos contratuais que não sirvam apenas de controle às ações desenvolvidas, mas também de incentivo e efetivação de novas alianças e parcerias.

Ganha o País, que se mantém competitivo no estratégico setor agrícola e ganham as regiões que se desenvolvem através do maior dinamismo dos vários outros setores que se beneficiam do aumento da renda local.

O agronegócio da soja talvez seja aquele em que o Brasil possui a maior capacidade de competir num mercado globalizado. Há disponibilidade de tecnologia, há capacidade instalada e há grande integração entre os vários setores da cadeia produtiva. A atuação da pesquisa, Embrapa e parceiros, foi fator determinante desse sucesso, e da continuidade desse trabalho dependerá o desempenho futuro.

LITERATURA RECOMENDADA

BATHRICK, D. D. **Fostering global well-being**: a new paradigm to revitalize agricultural and rural development. Washington: IFPRI, 1998. p.27. (Discussion Paper, 26.)

EMBRAPA SOJA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil**: 1999/ 2000. Londrina, 1999. 226p.

NASSAR, A. M.; KUKIDOME, K.; ZYLBERSZTAJN, D. **Fundação MT**: um caso de ação coletiva no agribusiness. Águas de São Pedro: USP, 1998. (Documento para Discussão, 44)

NORTH, D. C. **Institutions**: institutional change and economic performance. Cambridge: University Press, 1990. p.152.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LELE, U.; PORTUGAL, A.D. Brazil: investing in knowledge for development. In: PERSLEY, G.J. (Ed.) **Investment strategies for agriculture and natural resources**. New York: Cab Internacional, 1998. p.117-129.

TOLEDO, J. F. F.; ALMEIDA, L. A; KIIHL, R. A. S.; PANIZZI, M. C. C.; KASTER, M.; MIRANDA, L. C.; MENOSSO, O. G. Genetics and breeding. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome: FAO, 1994. p.19-36. (Plant Production and Protection Series, 27)

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abacaxi 17-18, 285-286, 289
Abóbora 15, 316, 328-329, 341, 345
Abobrinha 309, 316
Abortamento de gemas florais 459-460
Acácia-negra 414
Acaso 59, 61, 63, 66-67, 77
Acerola 17, 399
Acilação 1064
Acurácia 377-378, 380-387, 408
Adaptabilidade 1091, 1109-1110
  fenotípica 691, 693, 695, 699
AFLP 236, 950, 953-956, 969-972, 975, 985-986, 988
Agrobacterium 916, 933, 1014-1017
Agrobacterium tumefaciens 472
Agronegócio 2-4, 14-16, 18-19, 21, 24
Aleloquímicos 749-751, 760
Alelos
  favoráveis 205, 209, 211-214, 218-219, 225-227
  múltiplos 624
Alface 15, 202, 299, 301-302, 305, 307-308, 311
Alfafa 550, 552-554, 586-591, 786, 789, 816-817, 824, 839
Algodão 107-108, 115, 117, 232, 244, 246-247, 253, 270-272
Allium cepa 301, 620
Alógamas 102, 107-108, 160-164, 170, 172, 188, 199 172, 188, 199, 211, 225, 227, 232-233, 235, 238, 240, 243-249, 253, 264, 277-278, 610, 630-631, 636
Alogamia 298-300, 558, 577, 588
  auto-incompatibilidade 300, 304, 315
  ginoicismo 315-316
  macho-esterilidade 300, 314-315, 320
  monóica 233, 235, 245, 275, 300, 302, 315-316
  protandria 300-301
Alomônios 747, 749
Alopoliploidia 887-890
Alporquia 285
Alternaria dauci 16
Alternaria porri 15
Alumínio
  tolerância ao 784-840
  toxidez de 10, 784-840
Amazônia 82, 84, 90, 93, 95-96, 150
Ambiente 2-24, 80-86, 89, 92-97
Ameixeira 444-448, 462-463, 465, 469, 474
Amendoim 105, 202, 819, 836-837
Aminoácidos 854-865
  ácido aspártico 859-861, 863
  análogos 861
  arginina 865
  isoleucina 859
  lisina 858-865
  metionina 859
  ornitina 865
  prolina 865
  treonina 858-862, 864-865
Amostragem 115
  aleatória 652, 655, 657, 664
  de Gibbs 402
Amplified Fragment Length Polymorphism ver AFLP
Análise
  AMMI 706-707, 710, 712
  de trilha 1092, 1096, 1099-1100, 1102, 1111-1112
  dialélica 1106, 1114
  multivariada 210, 1092, 1112-1113
Ananas comosus 482
Anatomia *in vitro* 915
Ancestral comum 630, 632-633
Androgênese *in vitro* 927
Andromonóicas 235, 245, 275
Andropogon 551-552, 555
Aneuploidias 878, 897, 902
Antibiose 745, 747, 749

Anticorpos 1060, 1062, 1068-1074
Antixenose 745-747, 749
AP-PCR 951, 956
Aplicativos computacionais 1089-1090, 1092, 1097, 1107, 1114-1115
Apomixia 551-586, 906-908
Aposporia 564, 567-568, 570, 583
Arabidopsis 855, 805, 816
Arabidopsis thaliana 1066
Arachis pintoi 553
Arbitraryed Primed Polymerase Chain Reaction ver AP-PCR
Arboreto 135-136
Armazenamento a frio 460
Arquitetura 207
Arroz 9-10, 103, 105, 115, 202, 207, 225, 228, 608, 618-619, 859, 861, 865, 786-787, 793 800, 804, 808, 813, 819-823
Aspargo 7
Aspergillus niger 1065
Assincronia fenológica 748
Auto-incompatibilidade 161, 567, 588, 617, 624
Autofecundação 82-83, 91, 97, 202-205, 223, 228, 630-645
  gerações de 242-243, 248
Autógamas 107-108, 202-225, 232-278, 609-610, 618-619, 630-631, 636
Autogamia 299, 301, 556, 558
Auxinas 913, 923-924
Aveia 202, 225, 808, 812-813, 820

B

Bacillus licheniformis 1065
Bacillus thuringiensis 770, 1024
Bactérias 718, 727, 1058, 1073, 1075-1077
Bacteriose 446-448
Bactris gasipaes 428, 434
Baixa latitude 11-12, 24
Banana 18, 124, 139, 285, 289
Batata 105, 115, 124, 139, 1065-1066, 1076-1077
Batata-doce 124, 129, 139, 799, 837-838
Bazuca 742, 775
Berinjela 15, 202, 302, 304, 307, 328, 330-331
Best Linear Unbiased Prediction ver BLUP
Biobalística 770-771, 933, 1015, 1017
Biodiversidade 30-31, 38, 124-126, 150-151, 155-156
Biologia
  molecular 22, 1144, 1152
  reprodutiva 593, 594
Biomas florestais 150
Biorreatores 1058, 1060, 1073
Biorremediação 1073
Biotecnologia 124-126, 130-131, 471-472, 503, 507, 529, 531, 535, 569, 595, 930, 933-935, 1144, 1147-1152, 1156, 1162
Biótipo 719, 730, 754-756, 758, 766
BLUP 363-364, 373, 375, 377-378, 397, 399, 400, 403, 1140
Brachiaria 551-552, 554-556, 561-568, 570-573, 582-583, 586
Brachiaria arrecta 562
Brachiaria brizantha 562-568, 570
Brachiaria decumbens 562, 565-568
Brachiaria dictyoneura 562, 566-567
Brachiaria humidicola 562, 566-567
Brachiaria mutica 562-563
Brachiaria ruziziensis 562-563, 566-568, 571
Brassica 299-300, 304, 311, 315, 320
Brassica napus 1066
Brassica oleracea 348-349, 624-625
Brassicáceas 347
Budjump 460
Bulk 724-726
  dentro de famílias F_2 221
Bulked segregant analysis 999

C

Caatinga 17
Cacau 126, 139, 386, 399, 416
Cadeia produtiva 3-6, 9-24, 440
Café 115, 399, 415-416
Caiauê 623-624
Cairomônios 749
Caju 3-4, 7, 19-24, 286, 399, 416
Calo 912-913, 916-926, 932
Calose 804-805
Cana-de-açúcar 105, 115
Canola 864-865
Capacidade de combinação 651, 655, 661, 816, 827, 829-830, 848
  específica 165, 172, 370, 386, 406, 413-414, 416, 656-657, 661, 669, 1095
  geral 244, 247, 370, 406-407, 414, 656, 667-669, 1095, 1106-1107
Capim-colonião 582
Capim-elefante 554, 561, 572-581
CAPS 956
Capsicum annuum 332
Capsicum spp. 336
Caracteres
  qualitativos 182
  quantitativos 165, 209, 217
Carga genética 162, 170, 191, 245, 248, 278
Carica papaya 521
Cassete de expressão 1062
Catalase 856-857
Caupi 202, 786, 819, 838
Cebola 8, 15, 299-314, 328, 339-340, 620-621
Cenchrus 552, 556
Cenoura 16, 24, 299-300, 308-314
Centeio 606, 619, 800-801, 806-813, 819, 826
Centro de origem 482, 496, 509, 522, 532
Centrosema 556, 838
Cercospora sojina 719
Cereais 858, 861, 864-865
Cerrados 7-12, 16, 23-24
Cevada 792, 794, 798, 800-801, 804-808, 812, 818, 820, 826, 855-856, 859, 864-865
Chá-da-Índia 415

Chamaecrista 556
Citocininas 912-913
Citogenética 557, 564, 574, 583, 588, 593
Citros 5, 284-285, 288-289, 507-517
Citrus ver Citros
Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ver CAPS
Clonagem 913, 929, 934-935
Clone 4, 19-24, 164-167, 183-198, 284-285, 366, 369-370, 375-378, 383-416, 561, 568, 571-572, 575-581, 589-590, 928
Coccus nucifera 622
Cochliobolus miyabeanus 717
Coco 399, 416, 622
Coeficiente
  de coancestralidade 250-251, 253
  de determinação 1096
  de dominância 250-251
  de endogamia 161-162, 164, 179-180, 187, 190, 206, 238-239, 241, 246, 251, 253-255, 257, 260, 263, 271, 278, 632-637, 639, 641, 643-645
  de herdabilidade 185, 191
  de parentesco 209, 249-251, 254
  F 239-244, 255, 263
Coix lacryma-jobi 1065
Colchicina 567, 586
Coleção
  ativa 39, 51, 140
  de base 51, 130, 140
  de campo 142
  de germoplasma 555, 563, 592
  de trabalho 44, 141, 143
  dinâmica 142
  genômica 39
  in vivo 39
  nuclear 39, 50-52, 143
Coleta 32-43, 127-129, 133, 142
Colinearidade 260-261, 275, 278
Colletotrichum gloeosporioides 15, 591
Competência 919-920
Componente
  da variância 358, 362, 390, 397-400, 403, 659-670
  da variância genética 240, 245, 249, 253-278
  de média 1128, 1134
Compostos 610
Computação 1086
Conjunto
  aleatório 656-658
  fixo 655
  gênico 104
Consangüinidade 632
Conservação
  ex situ 32, 38-41, 88-89, 125-127, 131-139, 142
  in situ 32, 38-39, 88, 150-156
  in vitro 138-140, 914, 927
  no campo 138
  pós-colheita 338, 346-347
  unidades de 156
Controle
  de doenças 719-720, 726
  integrado 720
Core collection ver Coleção: nuclear
Correlação 1099-1101, 1110-1112, 1117
  canônicas 1092, 1099, 1112
  genética 206
  matriz de 1099
Couve-flor 15, 328, 347-350, 608, 625-626
Covariância 227
  entre parentes 254, 261, 264, 659, 662
  funções de 399
  genética 253, 267, 269, 277, 667
Crestamento 824
Crinipellis perniciosa 718-719
Criopreservação 39, 131, 140-141, 914-915
Crioprotetores 915
Cromossomos 872
  eliminação de 872, 883, 895-898, 905
  rearranjos 873, 893
Crucíferas 347, 349
Cruzamento 82-83, 90-97
  biparental 164, 172, 213, 237
  dialélico 119, 210, 370, 377, 382-383, 650, 656, 660-664
  dialélico parcial 656
  intercruzamento 203, 210, 225-229
  interespecífico 471, 474, 567
  interploídicos 567
  multiparental 20, 164
  sistema de 988
  topcross 650-651, 655
  trialelo 815
Cucumis melo 346
Cucumis sativus 341
Cucurbita 298, 308-309, 311
Cucurbita maxima 342-345
Cucurbita moschata 342-343, 345
Cucurbita pepo 342-346
Cucurbitáceas 340-341
Cultivar 163, 167, 171, 175, 202, 207, 210, 222-245, 277-278
Cultivares resistentes 717-719, 721
Cultivos novos 436, 440
Cultura
  de antera 927
  de calos 862
  de células em suspensão 862
  de embriões 502, 925-926
  de ovários 927
  de óvulo 468-469, 926
  de protoplastos 930
  de tecidos 489, 498, 503-504, 530, 534, 546, 862, 911-913, 922, 925, 928-930
Cupuaçu 399
Custo
  de caracterização 433
  de coleta 432
  de manutenção 432-435
  de seleção 433
Cynodon 552-553

D

DAF 951, 956
Deficiências 873-875, 900
Delineamento
de cruzamento 358, 389
em faixas 268, 272
experimental 267
genético 257, 267, 270, 278
I 815
II 661-665, 815
Dendê 399, 416, 623-624, 839
Densidade 82, 85, 91
discreta 1123, 1127
Deriva genética 644-645
Descritores 36, 38, 559, 563, 576-577, 584
Desequilíbrio 239-240, 255, 262, 266, 274-275, 278
Desinfestação 913
Desmodium 556
Determinação de paternidade 988
DGGE 957
Dialelo 815, 830
parcial circulante 657, 664, 666
Differential Gradient Gel Electrophoresis ver DGGE
Dioecia 161
Direitos de propriedade intelectual 1145-1158
Dispersão 83-87
Distribuição
binomial 204, 644
de probabilidade 1122-1126
normal padronizada 210, 212
uniforme 1122, 1131, 1137
Divergência genética 164-165, 182, 209-210
Diversidade 83-85, 92-96, 124-128, 133, 137, 142-144, 551-555, 563, 570-580, 588, 593-595
biológica 30, 32
de ecossistemas 30
de espécies 30
genética 30-36, 50-52, 105, 107, 152-156, 286-287, 290, 730, 947, 951, 953, 958
DNA 928-934
DNA Amplified Fingerprinting ver DAF
DNA recombinante 1058
Doenças 85, 89-96, 716-731
Domesticação 80-82, 93, 286, 424-433, 437, 483, 508, 550, 558, 563
de paisagens 425
de plantas 58, 69, 426-427
Dominantes 236-238, 260
Domínios 1070-1071
Duplicações 874-879

E

Ecossistema 82-85, 89-92, 95-97
Efeito
aditivo 253
aleatório 363, 373, 375, 397-403, 1095-1096
de dominância 253, 256, 643
de variedade 656
do fundador 66
epistático 215
fixo 373-376, 397, 399, 402-403, 1096
gênico críptico 1005
genotípico 364-377, 380-381
materno 807, 815
médio de substituição gênica 654
Elaeis guineensis 623-624
Elaeis olerifera 623-624
Eletroporação 933
Emasculação 461-467, 610, 612, 617, 620, 623
Embrião
resgate de 925
somático 915, 922, 925
zigótico 922
Embriocultura 468-469, 472
Embriogênese
in vitro 516
somática 914-916, 922-925, 936
Encapsulação 141
Endogamia 82, 90-92, 97, 204-206, 214-221, 630-646
depressão por 110, 112, 119, 162-165, 170-174, 181, 188-194, 233-234, 240-248, 254-278, 612, 642-643
gerações de 206, 214-221
incremento da 240
níveis de 241-242, 277
percurso 633-634
sistemas irregulares de 636
sistemas regulares de 640
Enfermidades ver Doenças
Engenharia genética 492, 497-498, 505-507, 530-531, 930-934, 1058
Enxertia 285
Epistasia 245-246, 249, 253, 256, 264, 1002-1003
Equação
de modelo misto 373-376, 397-402
matricial 658
normais 658
Equilíbrio 82-85, 92-97
com endogamia 240, 253, 263, 274-277
de Hardy-Weinberg 641-643, 1103, 1106
de Wright 239, 242, 253, 277-279
Erva-mate 362, 367, 386-388, 396, 399, 415
Ervilha 202
Escaldadura 444-447
Escherichia coli 864, 1059, 1064, 1077
Espécies 60, 65-66, 69-75, 81-96
arbóreas 358-359, 405
florestais 3, 13, 23
frutíferas 16, 286-287, 290, 358, 373, 405, 481, 606-608
hermafroditas 233
medicinais 3, 23
modelo 153, 155-156
nativas 126, 133, 136, 423-425, 430-440
ornamentais 606-608
selvagens 80-81, 88
Espécies-chave 155

Esperanças dos quadrados médios 659, 664, 668, 1097
Esquema
  genético 258, 261
  seletivo 265
Essências florestais 358
Estabilidade 1091, 1109-1110
  fenotípica 688-689, 693, 712
Estaquia 285
Estatística
  descritiva 1108, 1117
  F 1093, 1097-1098
Esterilização 913
Estilosantes 553, 556, 591-595
Estimação 232, 236-238, 245, 257-261, 266-270, 275-278
  de parâmetros 232, 236, 277-278
  do número de genes 1135, 1137
  negativas 1093
Estratégia "k" 71
Estratégia "r" 71
Estresse
  biótico 6, 8
  hídrico 865
  in vitro 914, 928
Eucalyptus 378, 390, 392, 396, 399, 413-416, 968-990
Eucariotos 1059, 1064-1068
Euploidia 882
Evasão hospedeira 748
Evolução 58-75, 482-483, 496, 521
  coevolução 68-70, 154
  isolamento reprodutivo 61, 68, 72
  macroevolução 66
  mecanismo evolutivo 61, 63
  microevolução 66
Exigência em frio 448, 450-451, 454-455, 459, 461, 467
Explante 913-919, 922-928, 933
Exserohilum turcicum 49

F

Fabraea maculata 459
Fatoriais 370, 377, 382-385, 388, 410, 414
Fecundação cruzada (t) 232
Feijão 9-11, 15, 861, 865, 786-789, 818-819, 823, 836-837
Feijão-fava 202
Fingerprinting 969-970
Fissão cêntrica 877
Fitoalexina 748
Fitorreguladores 8-9, 19, 912-914, 928, 931
Flora microbiana 790
Florescimento 91
Florestas tropicais 82-92, 150-157
Fluxo gênico 61-66, 71, 233-234
Forrageira 3, 23, 550-561, 573, 577, 583, 593, 595, 606-607, 609, 838-839
Fosforilação 1064
Fósforo 784, 791, 798-800, 830-831
Fotoperíodo 6, 7, 11-12
Fotorrespiração 855-858
Freqüência
  alélica 202-203, 216, 237, 255-257, 266, 275, 635
  gênica 644
Fruteiras nativas ver Espécies: nativas
Função
  de densidade exponencial 1123, 1125
  Rannor 1130
Fungos 716-719, 722, 727, 1058, 1073
Fusão
  cêntricas 877
  de protoplastos 915, 929-930
Fusariose 490-492

G

Ganho ver Progresso
Gene pool 126, 574
Genes 1058-1066, 1069-1071, 1076
  de resistência 719, 722-723, 730
  deletérios 631, 642
  letais 631, 642
  piramidamento de 997
  semiletais 631
Genética
  erosão 129-133, 137-142
  transformação 490, 505-506, 527, 530, 916, 926, 930-933, 1013-1015, 1032
  uniformidade 284, 289, 328, 334, 337-339, 344, 347-348
  variabilidade 81-96, 107-119, 286-290, 480-485, 493-504, 511-518, 526, 532-536, 784, 812, 817, 821, 826, 833, 983-984
  vulnerabilidade 105-107
Genitor
  não recorrente 223-224
  recorrente 223-225
Genoma 1060, 1062, 1076
  unicidade do 74-75
Genotipagem seletiva 1004-1005
Genótipo
  contrastante 821
  tolerante 789, 794, 808, 813, 821-823, 833-836
Germinação
  in vitro 463
  in vivo 462-464
Germoplasma
  acesso 35-52, 129-144, 559, 563-572, 576-584
  avaliação 32, 36-52, 124, 127, 131-134, 141-144
  banco de 11, 17-18, 22-23, 731
  caracterização 32, 36, 38, 43, 51-52, 126-134, 141-143, 461
  conservação 136-137, 140
  curadoria 134
  documentação 32, 38, 43-44, 127, 132-134, 143-144
  duplicação 131, 138, 142

exótico 46-49, 102-104, 109-114, 118-119, 610
incorporação 109, 113-114, 117
intercâmbio 33, 43, 103, 108, 115, 129-133, 136
introdução 36, 39, 43, 114-117, 289, 444, 449, 460-461, 474, 554, 557-559, 563, 576-578, 595
introgressão 109, 930
multiplicação 132, 142
prospecção 126-127
quarentena 34, 129-130, 142
regeneração 132, 140-142
utilização 143-144, 550, 554-563, 572-53
Girassol 616-617
Glicosilação 1059, 1064, 1067-1069
Glomerella cingulata 457
Glutamato Desidrogenase (GDH) 867
Glutamato sintase (GOGAT) 857
Glutamina sintetase (GS) 857
Goiaba 286
Gramíneas 550-555, 558, 561, 564, 581, 594
Grupo
de vizinhança 65
heterótico 111
sucessional 153

H

Haplóides 882, 922, 926-927
Helianthus annuus 616
Helminthosporium maydis 106, 117, 718
Helminthosporium oryzae 717
Hematoxilina 801-804, 808, 811, 834
Hemileia vastatrix 717
Herança 450, 455, 457, 461, 469, 718, 722-726, 784, 793, 798, 805-816, 820-823, 832
apomixia 567-568, 582-585
qualitativa 209, 224
resistência 722-723, 726
Herbário 135-136
Herdabilidade 205-206, 210-217, 227, 270, 278, 360-369, 380, 388-393, 402-405, 413, 801, 813-823, 832
Heterodera glycines 719, 723
Heterose 109-111, 119-120, 165, 170-173, 193-196, 300, 307-308, 328-347, 393, 406, 412-416, 604, 610-611, 656-657
de variedades 656
em relação à média dos pais 604
em relação ao pai superior 604
específica 657, 1095
média 656, 1095
padrão 604
varietal 1095, 1106-1107, 1114
Heterozigose 204-205, 211, 219
Heterozigosidade 245-246
Heterozigoto 87, 97
Hevea brasiliensis 106, 288, 716
Hibridação 202, 206-209, 214, 285, 289-290, 445-447, 460-462, 472-474, 650
interespecífica 537, 579, 605-609
intra-específica 517, 578
somática 497, 504-507, 513, 518, 537, 930-931
Híbrido 294-296, 300-320, 328- 350 792, 796, 801-836
de famílias 616
de linhagens 170-173, 182, 193, 198
de linhagens parcialmente endogâmicas 176
dominância 329, 331, 341-342
duplo 172-175, 179-180, 604, 614, 650-651
epistasia 329, 336
interespecífico 345
interpopulacional 653, 662, 670
intervarietais 611, 624
modificados 181
múltiplo 213, 615
recíproco 656
simples 172-181, 612-615, 650-651
simples modificado 614
sobredominância 329, 345
tipos de 172-182
topcross 615
triplo 172-181, 615
vigor de 328-329, 332, 604, 609-611, 618
Histologia *in vitro* 916
Homozigose 202-205, 214-215, 219-221, 631, 635-645
Homozigoto
em estado 633
por descendência 633
Hortaliças 294-300, 305-310, 314-321, 328-332, 338, 341, 347, 353, 606, 608
Hyparrhenia rufa 552

I

Identidade gênica 251
Ideotipo 429-435
IMA 957
Imunização 1072-1075
Incompatibilidade 485
Índice
ambiental 688-690, 693, 698, 702, 712
de fixação 239, 635
de panmixia 635
multiefeitos 363-364, 367-371, 375
Inferência bayesiana 400
Infestação artificial 742, 744-746, 772, 774
Informática 132, 1088-1090, 1102, 1113, 1116-1117
Inibidor
de alfa-amilase 773
de protease 771
de proteinase 1031-1032, 1046
enzimático 747, 749
reprodutivo 749
Inovações 1144-1147, 1151-1153, 1156
Instabilidade
fenotípica 928
meiótica 883, 898-900
na divisão celular 872, 897
Inter Microsatellite Amplification ver IMA

Interação genótipo x ambiente 6, 163, 186, 278, 560, 591, 675-688, 702, 706-708, 713, 1000, 1108-1109
Invenção 1146-1151, 1156-1157
Inversões 874, 876
Irmãs
  maternas 265
  perfeitas 245, 257-259, 264-266
Isocromossomos 877, 881
Isoenzima 236, 769

J

Jardim botânico 135-138
Jiló 330-332

L

Lactuca sativa 302
Landraces ver Raças locais
Lectina 770, 772
Leguminosas 550-558, 591, 593
Lei de Proteção de Cultivares 21, 202, 206-207, 1154, 1162, 1166-1167
Leucaena leucocephala 553
Leveduras 1058-1059, 1075
Ligação gênica 249, 256
Limpeza clonal 913
Linguagem 1086-1087
Linhagem 1071, 1077
  A, B, R 611, 618
  elite 176, 182-183, 196, 651
  endogâmica 172-173, 179-182, 192, 249, 278, 279, 612-615, 650, 663, 666
  introdução de 206-207
Linhas
  de adição 893-898, 905
  de substituição 893-897
  de translocação 893, 896
  irmãs 614
  puras 206-208, 218, 631, 635-637, 641-642
  semi-isogênicas 810, 813-815
Lisina
  biossíntese 860
  degradação 860-861, 864
Lotus corniculatus 553
Lycopersicon esculentum 298-300, 306, 336

M

Maçã ver Macieira
Macho-esterilidade 227-228, 339, 348-350, 872, 885, 896, 900-905
  citoplasmática 618, 620
  esporogênica 903
  genético-citoplasmática 610, 616-617
  genético-nuclear 902
Macieira 18-19, 24, 399, 416, 444, 452-453, 456, 460-462, 469-474
Macroambiente 7, 10
Malécot 632
Malpighia punicifolia 493
Malus atrosanguinea 452, 456
Malus baccata jackii 452
Malus domestica 452, 472
Malus floribunda 452, 456, 461, 474
Malus micromalus 452, 456
Malus robusta 456
Malus sargentii 452
Malus sieboldii 456
Malus zumi 456
Mandioca 124-126, 129, 139-141, 786, 791, 797-799, 819, 837
Manga ver Mangueira
Mangueira 8, 18, 285, 289
Mapa
  genético 945-947, 950-951, 955, 958-960, 983, 990, 1004, 1008
  referência 978-980
Maracujá 17, 286
Marcador
  candidato 998, 1008
  genético 37, 236, 238, 278
  molecular 210, 224, 769, 942, 961, 968-974, 979-990, 996-1008
  morfológico 769
  seleção assistida por 958, 961, 968, 976, 980-983, 990
  totalmente informativo 973, 979
Mata Atlântica 150-153, 156
Máxima verossimilhança 236, 397
Médias de gerações 815
Medicago sativa 553, 587-588
Meio de cultura 912-915, 924, 931
Melancia 7-8, 14-15, 23, 232-235, 244, 247-248, 253, 272-277, 316-317
Melão 14, 304, 310, 316, 346-347
Melhoramento
  apomíticas 584
  de populações 191-192
  do híbrido 193, 196
  interpopulacional 406-407, 412-413, 589
  intrapopulacional 581, 589
  para resistência a doenças 720-721
Melinis minutiflora 552
Mercado 437-438
  razão benefício/custo 429-436
Meristemóide 914, 917-922
Método
  da congruência 1121
  de avaliação da resistência 726
  de estimação 1136
  de Monte Carlo 1120, 1135
  dos quadrados mínimos 270, 658, 1132-1136
Métodos de melhoramento 109, 222-223, 310, 486, 497, 524, 536, 720-722
  condução das populações segregantes 203, 214
  cultura de anteras 312-313
  genealógico 215-217, 311-312, 594, 609, 722-725
  introdução 294, 310
  população - BULK 217

progênies 311-312, 318
retrocruzamento 114, 182-183, 203, 224, 310, 609, 639, 722-725
seleção massal 294, 297, 311
seleção recorrente 311-314
SSD 211, 312, 725, 609
Micoplasma 727
Micorriza 791, 837
Micosferela 8
Microcyclus ulei 716
Micropropagação 495, 503, 527, 530, 912-914, 927-929
Microssatélite 236, 947- 949, 952, 969- 970, 978-980, 984-990
Migração 234, 239
Milheto 574-581
Milho 6-10, 22-24, 31, 43-49, 52, 102-118, 604, 608-612, 616, 620, 786-797, 801-808, 814-820, 826-832, 836, 859-867, 1063, 1162
Modelo
aleatório 1097
biométrico 1091, 1095
desvios do 658
fatorial 667
fixo 1097
genético 266, 277-278
misto 373-375, 397-399, 403, 1097
reduzido 664-667
Monoecia 161
Monossomia 879-880
Moranga 342
Morango 139
Mosaico dourado 997, 1005
Mucuna 838
Multicolinearidade 1092, 1099-1102
Multilocus Estimation of Outcrossing with Dominant Markers ver Programa MLDT
Musa spp. 495
Mutação 83, 87, 285, 289, 470-473
Mutagênese 489-490, 804
Mutantes 855-867
gene ask1 862
Hiproly 859
indução de 858
mutagênico 861-862
opaco-2 859, 862, 864
QPM 859
revertentes 862
seleção de 861

N

N-glicosilação 1067-1068
Não-preferência 745
Nectarina 202
Negócio agrícola ver Agronegócio
Nematóides 490, 495, 500-502, 719, 723, 727-728
Nitrato redutase (NR) 867
Nitrogênio 854, 857, 866-867
bactérias endofíticas 866
ciclo do 857
fixação biológica do 866
produtividade 867
uso eficiente 866
Nitrogênio líquido ver Criopreservação
Nulissomia 879
Números aleatórios 1121-1132

O

O-glicosilação 1067
Off type 914
Oídio 8, 456, 473
Organogênese *in vitro* 916-920
Oryza glumaepatula 618
Oryza sativa 618

P

Packing 460
Padrões
heteróticos 119
resistentes 728
suscetíveis 728
Paisagem adaptativa 76
Panicum 551-556, 562-564, 567, 573, 581-584
Parâmetros genéticos 1090-1091, 1095, 1106, 1114
Parceria 1163-1169
Parentesco 234, 241, 249-254, 257-259, 271-273, 277
Paspalum 552-556, 582, 839
Passaporte 129, 133, 143
Passiflora 531-538
Patente 1146-1153, 1157
Patógeno 716-722, 727-729
Pedigree ver Métodos de melhoramento: genealógico
Pennisetum 551-552, 555, 573-577
Pennisetum glaucum 574-579
Pennisetum squamulatum 575-577
Pepino 300, 302, 307, 310, 315-316, 341-342
Pereira 458-460, 466-467, 471-473
Período de juvenilidade 11, 454-457, 469-470
Peronosclerospora sorghi 116
Pessegueiro 202, 444, 448-451, 460-464, 468, 471-472
pH 785, 789-792, 798-801, 818, 822-823, 829, 838-839
Phaeosphaeria maydis 49
Phaseolus vulgaris 10
Phyllosticta solitaria 457
Phylloxera 106
Physophela zeae 49
Phytophthora capsici 1003
Phytophthora infestans 105, 716
Pichia pastoris 1059
Pimenta 336
Pimentão 15, 302-309, 328-336
Pinus 396, 399, 414
Plantas transgênicas 506, 530, 1012-1049, 1058-1077
Plumcot 474
Poder germinativo 132-133, 138

Podosphaera leucotricha 456
Podridão amarga 457
Pólen
  análise do 462
  coleta de 461
Policruzamento ver Cruzamento: multiparental
Polimorfismo 941-960
Polinização 82, 86-87, 461-466
  controlada 303-307
  cruzada 300-301
Poliploidia 513, 556, 564, 583, 882-890, 899, 907
  autopoliploidia 884
  autotetraplóides 880, 885-886, 907
  autotriplóides 880, 884
População 80-97
  base 227, 635
  de referência 652, 657, 662, 670
  em equilíbrio 635
  estrutura genética 64, 236, 248
  idealizada 646
  mista 232, 238, 242, 248, 251-255, 258, 262, 266, 277-278
  panmítica 631, 635, 645
  segregante 208, 211
  semi-exótica 111-112
Porta-enxerto 285, 445, 448, 456, 470
Pragas 85, 89-90, 94-96
Pre-breeding ver Pré-melhoramento
Pré-melhoramento 22-23, 44-46, 114, 143
Predição de médias 651
Probabilidade 235-238, 242, 247-253, 984
Processamento
  de dados 1086, 1089-1093, 1096, 1099, 1108-1109, 1114
  pós-traducional 1064, 1078
  proteolítico 1064-1065
Processos biológicos 1144, 1147-1149
Progênies
  autofecundadas 246-248, 259-265, 271
  endogâmicas 185, 191-192
  irmãos germanos 181, 185, 191, 194, 266, 610, 616, 638, 639
  maternas 236, 241-243, 246-248, 259-267, 270-271, 276
  meios-irmãos 181, 185, 191-194, 259, 264-266, 610, 616, 623, 632, 639
  polinização aberta 244
  S_1 240, 260-261, 265, 270-273, 276
Programa MLDT 238
Programação 1086-1087, 1090-1091
Progresso
  esperado 264, 272, 654, 820, 1113
  genético 232, 246, 255-257, 262, 266, 272-278, 379-389, 402-415
  imediato 262-266, 272-276
  permanente 257, 261-264, 272, 276-278
Promotores 1059, 1062-1066
Propagação ver Reprodução
Propriedade corpórea 1145
Protandria 161
Proteínas 854-855, 858-862, 867
  acumulação 854
  heterólogas 1058-1066, 1069, 1078
  recombinantes 1059-1062, 1065-1070, 1078
  síntese 854
Protoginia 161
Protoplasto 770
Prunus americana 446
Prunus cerasifera 445
Prunus davidiana 448
Prunus domestica 445
Prunus espinosa 445
Prunus ferganensis 448
Prunus insititia 445
Prunus kansuensis 448
Prunus persica 444, 448
Prunus salicina 445, 463
Prunus simonii 445
Pseudo-resistência 748
Pseudocruzamento teste 972-976
Puccinia polysora 49
Pupunha 7, 399, 428-430, 433-437
Pyrus betulaefolia 457
Pyrus bretschneideri 457
Pyrus clareada 457
Pyrus communis 457, 459
Pyrus nivalis 457, 458
Pyrus pashia 457
Pyrus pyrifolia 457, 459
Pyrus serotina 458
Pyrus ussuriensis 457

Q

QRL 999
QTL 968, 971-983, 990, 999
Qualidade de estimadores 1135
Quality Protein Maize ver Mutantes
Quantitative Resistance Loci ver QRL
Quantitative Trait Loci ver QTL

R

Raças 716-719, 722-723, 730
  locais 35, 39, 44, 107, 449, 461
Random Amplified Polymorphic DNA ver RAPD
RAPD 236, 244, 950-957, 969-978, 982-988
Recursos genéticos vegetais 30-51, 102, 125-127, 130-137, 141-144
Regressão 1091-1092, 1102, 1111-1112, 1117
  aleatória 399-400
  linear segmentada 693
  múltipla 1096, 1112
  quadrática 698-699
REML 397-403
Repetibilidade 360-363, 367, 386-388, 395-397, 400
Repolho 15, 328-329, 347-350, 608, 624
Reprodução
  assexuada 88, 94-97, 160, 164, 183, 188, 284-285, 289-290, 361, 366-368, 380-382, 386-387, 403-405

modo de 555, 558, 564-572, 583-585
sexuada 93-94
sistema misto de 232-249, 253, 258-260, 266, 273, 358, 363, 392
vegetativa 107-108, 118, 283-285, 288-290, 551, 558, 561, 572-577, 580
Resistência
acidez do solo 1047
alumínio 504
doenças 446, 451-455, 461, 469, 473, 503, 526, 1040-1045
específica 753
genética 716-717, 720-721, 726
grau de 775
horizontal 1003
induzida 748
insetos 1012, 1031-1033, 1046
monogênica 996-997, 1003
múltipla 767-768
não específica 756
nematóides 1045-1047
patógenos 306
poligênica 999, 1004
pragas 500, 505, 523
seca 484
vertical 753-758, 764, 767, 1003
vírus 1035-1040
Resistência/tolerância
gomose de *Phytophthora* 515, 519
vírus da tristeza 519
Restricted Maximum Likelihood ver REML
Restriction Fragment Length Polymorphism ver RFLP
RFLP 236, 942-960
RGV ver Recursos genéticos vegetais
Rhizobium 1000-1001, 1004
Royalties 1151-1153

S

Saccharomyces cerevisiae 1059
Sarna 444, 452-456, 459-461, 472-474
SAS 1123, 1126, 1130
SCAR 957
Screening 784-785, 795-796, 799, 802, 817-820, 828, 833-834, 838
in vitro 471-473
Secale cereale 619
Seedling 449, 453
Seleção 20-23, 81-89, 93-97
assistida 1121, 1140
clonal 285, 289, 487, 537
de linhas puras 206-208
de progênies 263-265, 276
direcional 61-62
disruptiva 62
entre e dentro de famílias de meios-irmãos 535-539
entre e dentro de progênies 265
entre *topcrosses* 654
estabilizadora 62, 66
hospedeira 745-746, 749
in vitro 929
índice de 168-70, 186, 836
intensidade de 214
massal 214-215, 263-265, 487, 535-538
métodos de 262-263, 266
natural 59-64, 76, 207, 219-220
precoce 176-177, 968, 982
recorrente 203, 225- 228, 249, 266, 274, 277-279, 388, 405-406, 413- 416, 651-653, 814, 820, 823-832, 839
recorrente interpopulacional 184, 189, 193-194
recorrente intrapopulacional 184, 190, 195
recorrente recíproca 622-624
resposta esperada 193
visual 214, 217
Sementes 31, 35-36, 39-44, 48-49, 88
artificiais 527-529
conservação de 138
intermediárias 39-40, 130-131
ortodoxas 39-40, 130-131, 138-142
recalcitrantes 35, 39-40, 131, 138-141
Semi-árido 7-8, 14, 23
Septoria glycines 719
Sequence Characterized Amplified Region ver SCAR
Seqüência repetida 941
Seqüenciamento genômico 1008
Seringueira 139, 367, 396, 399, 415-416, 839
Setaria 552, 573
Severidade 722, 727-728
Sigatoka amarela 501-504
Sigatoka negra 501-506
Simple Sequence Repeats ver SSR
Simulação 1102-1106
computacional 1140
Single Nucleotide Polymorphisms ver SNP
Single Seed Descent ver Métodos de melhoramento: SSD
Single Strand Conformation Profile ver SSCP
Sintenia 73, 807
Sintéticos 610
Sistema
de expressão 1058-1060, 1065-1066, 1069-1070, 1073, 1078
endogamia-hibridação 604
reprodutivo 64, 67-68, 76
Sistema ABR ver Linhagem
Site Tagged Sequence ver STS
SNP 989
Software 1115-1118
Soja 7-12, 21, 24, 105-116, 202, 210, 225, 228, 858, 861, 864-865, 786-787, 790, 797, 800, 790, 797, 800, 816-819, 824-825, 873, 1163-1169
Solanáceas 330
Solanum gilo 331
Solanum melongena 302, 330
Solos ácidos 784-787, 790-793, 797-798, 800, 805, 815-832, 835-840
Solução nutritiva 784, 791-792, 797-801, 804-805, 808-817, 821-839

Sorghum bicolor 610
Sorgo 48, 202, 608-610, 616
SSCP 957
SSR 942, 947, 956-957, 965, 969-971, 978-979
Stone cells 474
STS 957
Stylosanthes 819, 838
Stylosanthes capitata 591, 593
Stylosanthes guianensis 553, 591
Stylosanthes hamata 591, 593
Stylosanthes humilis 591, 593
Stylosanthes macrocephala 591
Stylosanthes scabra 591-595
Subcultivo 929
Subpopulações 644-646
Substituição
  cromossômica 895-896
  genômica 896
Superóxido dismutases 857

T

Tabaco 115, 856-859, 864, 1064-1068, 1071-1076
Tabela dialélica 656-661
Tamanho
  de parcela 821
  efetivo populacional 115, 132, 185-194, 645-646
Taxa
  de autofecundação 232-249, 253-255, 260-261, 279
  de cruzamento 232-238, 266
Temperatura 792
  hibernal 452
Teorema da probabilidade integral 1122-1123
Teoria
  neutralista 63
  sintética da evolução 58, 61
Testador 651-655, 662-664
Teste
  de progênie 244, 264
  de viabilidade 462-463
  F 1097
  precoce 651
Tolerância
  a herbicidas 1012, 1018
  a insetos 741, 745-748
Tomate 8, 15-16, 24, 47, 115, 202, 297-301, 304, 307-312, 317, 328, 330, 336-339
Totipotência 912-913
Transformação de dados 1094
Translocações 874-877, 881, 893
Tranzschelia pruni-spinosa 447
Trevo branco 786, 789
Trifolium pratense 553
Trifolium repens 553
Trigo 2, 9-10, 103-108, 114-115, 202, 225, 228, 606-610, 619, 784-786, 789- 794, 800-813, 818-820, 824-826
Trissomia 880-882
Triticale 619-620
Triticum aestivum 619

U

Ultra-estrutura 920, 922
Umbuzeiro 17
Urochloa 555, 562
Uva 7-8

V

Vacinas 1060-1062, 1069, 1074-1077
Valor
  fenotípico 631, 641, 1129
  genético 358-363, 368, 371-372, 377-380, 389-405
  genotípico 253, 255, 1129, 1135
Variabilidade intra-específica 819, 821, 826, 832
Variação
  fenotípica 269
  numérica 872, 877-878, 898
  somaclonal 804, 814, 922, 927-929
Variância
  aditiva 163, 178, 190-192, 211, 216-219, 227, 654, 660, 662
  dominante 163, 178, 660, 662
  entre híbridos 178-181, 653, 668-669
  entre progênies S1 273
  genética 163, 167-182, 190-192, 211, 215-219, 227, 230-232, 240, 245, 249, 253-263, 266-273, 276-278, 814-815, 820, 831-832, 1093, 1096
  homólogo 662
  interpopulacional 178
Variedade multilinha 279
Venturia inaequalis 454-455, 473
Venturia pirina 459
Vernalização 620
Via do ácido aspártico 859-863
Vias de regeneração 915-916, 927
Vibrio cholerae 1077
Vicia faba 1065
Vigna unguiculata 10
Vírus 718, 727-728, 1058-1062, 1072-1077
  da mancha anelar 528, 530
Vitrificação 141, 915, 928

W

Wright 632, 635

X

X Triticosecale 619
Xanthomonas 1000-1006
Xanthomonas axonopodis 718, 1003
Xanthomonas campestris 15, 447, 1001
Xylella fastidiosa 444, 447, 718

Z

Zea mays 611
Zoneamento ecológico 687

ÍNDICE AUTORES

Abreu, Ângela de Fátima Barbosa 201
Almeida, Leones Alves de 1161
Alves, Vera Maria C. 783
Appezzato-da-Glória, Beatriz 911
Arias, Carlos Alberto Arrabal 1161
Azevedo, Ricardo Antunes 853
Bahia Filho , Antônio F. C. 783
Barbosa, Luciana Veiga 479
Cabral, José Renato Santos 479
Camargo, Luis Eduardo Aranha 995
Cançado, Geraldo M. Almeida 783
Cardoso, Antonio Ismael Inácio 293
Chaves, Lázaro José 673
Clement, Charles R. 423
Coelho, Alexandre Siqueira Guedes 57
Crisóstomo, João Ribeiro 231
Cruz, Cosme Damião 1085
Cunha, Mario Augusto Pinto da 479
Dantas, Jorge Luiz Loyola 283, 479
Falco, Maria Cristina 1011
Ferreira, Daniel Furtado 1119
Ferreira, Francisco Ricardo 283
Ferreira, Maria Aldete J. da F. 231
Ferreira, Reinaldo de Paula 549
Gandara, Flávio B. 149
Goes, Marisa de 123
Gorgulho, Eliana Patrícia 649
Grattaplagia, Dario 967
Kageyama, Paulo 149
Kiihl, Romeu Afonso de Souza 715, 1161
Leite, Adilson 1057
Maluf, Wilson Roberto 327
Milach, Sandra K. 783
Miles, John W. 549
Miranda Filho, José B. 101, 603, 629, 649
Miranda, Luis Carlos 1161
Molina, Silvia Maria Guerra 853
Nakasu, Bonifacio H. 443
Nass, Luciano Lourenço 26, 101, 123, 603
Nishikawa, Marcelo Akira Naime 737
Oliveira, João Roberto Pereira 479
Pagliarini, Maria Suely 871
Paiva, João Rodrigues de 79, 283
Parentoni, Sidney Netto 783
Pereira, Antônio Vander 549
Pereira, Mauricio Ballesteiro 231
Queiróz, Manoel Abilio de 1
Ramalho, Magno Antonio Patto 201
Raseira, Maria do C. B. 443
Resende, Marcos Deon Vilela de 357
Ritzinger, Rogério 479
Sampaio, Maria José Amstalden 1143
Santos, João Bosco dos 201
Santos, Manoel Xavier dos 101
Santos, Marcio de Miranda 1143
Silva, Sebastião de Oliveira e 479
Silva-Filho, Marcio Castro 1011
Soares Filho, Walter dos Santos 283, 479
Souza, Anete Pereira de 939
Souza Jr., Cláudio Lopes de 159
Toledo, José Francisco Ferraz de 116
Valle, Cacilda Borges do 549
Valois, Afonso Celso Candeira 79, 123, 283
Valva, Fabrizio D'ayala 57
Vencovsky, Roland 149, 231
Vendramim, José Djair 737
Vieira, Maria Lucia Carneiro 911
Yorinori, José Tadashi 715

ISBN 85-88473-01-1